

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE

ISSN 0073-9855
RIALA6

1941
2001

60
ANOS



Volume 60 número 1, 2001

Medicina Laboratorial

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica



57 anos de atividades

Desde 1944, a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) vem atuando como entidade representativa da Patologia Clínica no Brasil.

Recentemente, ela incorporou a expressão "Medicina Laboratorial" à especialidade para destacar que o Patologista Clínico atua na área médica, utilizando-se de uma estrutura laboratorial realizando exames para diagnósticos, acompanhamento e monitoração dos pacientes.

O Patologista Clínico está no centro de grandes modificações científicas geradas por novos conceitos, novas tecnologias e metodologias.

Por este motivo, cada vez mais, o Patologista Clínico assume sua função de médico consultor, decodificando a informação básica e recodificando-a para a compreensão clínica. Essa parceria auxilia na orientação para a solicitação de exames, na interpretação dos resultados e conseqüentemente na decisão médica minimizando a relação custo benefício.

Para saber mais sobre a SBPC/ML, visite nosso [site](http://www.sbpc.org.br)
www.sbpc.org.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

DIRETOR RESPONSÁVEL

DR. CRISTIANO CORRÊA DE AZEVEDO MARQUES
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

PEDRO LUIZ SILVA PINTO - Presidente
MARIA ALICE DA SILVA TELLES - Secretária
CRISTINA ADELAIDE FIGUEIREDO
ELIANI DE ARAÚJO
JANETE ALABURDA
LUZ MARINA TRUJILLO
MARINA YOSHIÊ SAKAMOTO MAEDA
RAIMUNDA TELMA DE MACEDO SANTOS
THAÏS VALÉRIA MILANEZ
CLAYDES DE QUADROS ZAMBONI - Membro Emérito
MARIA LUISA BARBOSA - Membro Convidado

SETOR DE PUBLICAÇÕES

ROCELY APARECIDA DE SOUZA BUENO

ENDEREÇO/ ADDRESS

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
01246-902 – São Paulo – SP – Brasil
Caixa Postal 1783 – CEP 01059-970
Tel/Fax: 3082-9939

E-mail: biblioteca@ial.sp.gov.br
riala@ial.sp.gov.br

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

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

1941 - 2001,
2001, 60 (1)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.
Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas. São Paulo: Ed. Polígono; 1072.

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

Acesso on line/ on line access
Texto integral/ full text
www.ial.sp.gov.br

EDITORIAL

Ao comemorar o sexagésimo ano da criação da REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, não podemos deixar de resgatar alguns trechos do editorial, escrito por J. P. Carvalho Lima, então Diretor do Instituto, publicado no primeiro número.

“O Instituto Adolfo Lutz é o Laboratório Central de Saúde Pública do Departamento de Saúde de São Paulo. Criado pelo decreto-lei nº 11.522, de 26 de outubro de 1940, substituiu na organização sanitária do Estado o antigo e tradicional Instituto Bacteriológico, que desde sua fundação em 1892, vinha desempenhado, integralmente, as funções de laboratório de Saúde Pública. Além de suas antigas atribuições, teve novos encargos, com a incorporação do Laboratório Bromatológico do Estado.

A Lei nº 43, de 18 de julho de 1892, autorizou a despesa para a montagem dos Laboratórios Bacteriológicos, Vacinogênico, o de Análises Químicas e o Laboratório Farmacêutico. A direção foi confiada a Felix Le Dantec, biólogo francês, discípulo de Pasteur. Le Dantec iniciou a sua atividade não só no terreno das práticas, como no campo das investigações científicas. Foram seus assistentes Adolfo Lutz, Artur de Mendonça e Bonilha de Toledo. Promissores corriam os trabalhos quando Le Dantec teve que regressar à França, assumindo a direção Adolfo Lutz que, desde 1885, investigava diferentes ramos da biologia.

A nomeação de Lutz para o Instituto Bacteriológico, em 18 de Março de 1893, marcou o início da Microbiologia no Brasil. Dificilmente se penetra num assunto de microbiologia ou de protozoologia, sem que por aí tenha passado Lutz

Em Novembro de 1908 deixa Lutz o Instituto Bacteriológico de São Paulo e, a convite de Osvaldo Cruz, inicia nova e proveitosa fase de investigações experimentais em nosso país.

O Instituto Bacteriológico perdeu Lutz, mas a figura do mestre jamais se apagou do espírito dos seus discípulos. Seu amor ao trabalho, seu devotamento à ciência ficaram como exemplo.

Ao lado do papel altamente beneficiador dos interesses do Departamento de Saúde e das necessidades gerais que pela evolução normal do Estado lhe foram impostas, o Instituto Adolfo Lutz levará avante o seu programa científico. A lei que o reorganizou, conservou-lhe, além de outras, a responsabilidade do estudo da etiologia das epidemias e endemias e das epizootias que se transmitem ao homem, característica que fez do antigo Instituto Bacteriológico um estabelecimento de renome universal. E se o diagnóstico das moléstias infecciosas e os meios de defesa do organismo necessitam de cuidados especiais, não menos importantes são os estudos que se deverão realizar em torno da Bromatologia e da Química. As duas ciências - Bacteriologia e Química - marcham unidas nas investigações modernas.

Para divulgar essas pesquisas, apresentamos hoje a REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ que, preenchendo uma enorme lacuna, satisfaz, também, a uma das maiores aspirações dos discípulos de Lutz. Será, finalmente, o testemunho de que o espírito do grande biólogo ainda dirige a sua escola”.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz editou 120 volumes e publicou 897 artigos científicos, em sua grande maioria foram pesquisas desenvolvidas no próprio Instituto. O volume de trabalhos publicados pelos cientistas que passaram ou que ainda se encontram no Instituto, deixam claro que o espírito de Lutz continua vivo, sua dedicação e devotamento a pesquisa permanecem entre os que o sucederam e ficarão registradas na história da evolução da ciência. Como visualizado por Carvalho Lima “O Instituto Adolfo Lutz tem, portanto, mais um dever o cumprir - Pesquisar”. A Revista tem assim possibilitado a divulgação do grandioso trabalho desenvolvido pelo IAL, em benefício da ciência, da pesquisa, do diagnóstico laboratorial e, principalmente, a preocupação com a população do Estado de São Paulo e do Brasil.

COMISSÃO DE REDAÇÃO DAS PUBLICAÇÕES OFICIAIS DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Serão aceitos manuscritos em forma de artigos científicos, de revisões, de atualizações, relatórios técnicos, relatos de casos, comunicações científicas e resumos de teses e dissertações. Os autores devem escrever na carta de encaminhamento qual a natureza do trabalho. Os originais serão publicados em língua portuguesa ou inglesa preferencialmente. Deverão ser encaminhados em três vias, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. O trabalho, após aprovado, deve ser encaminhado ao Setor de Publicações, em uma cópia impressa e em disquete 3 ½ conforme instruções que serão enviadas após a aprovação.

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

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

Os **artigos de revisão, atualização e relatórios técnicos** devem apresentar:

Página de rosto: como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Deve ser dividido em seções

com títulos e subtítulos apropriados. Incluir title, abstract e key words antecedendo as referências.

O **relato de caso** deve ser elaborado com a seguinte estrutura:

Página de rosto: como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Deve ser dividido em introdução, relato de caso e discussão. Incluir title, abstract e key words antecedendo as referências.

A **comunicação científica** deve ser elaborada com a seguinte estrutura:

Página de rosto: como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Não deve dividi-lo, ou seja, introdução, métodos, dados experimentais e outros devem compor de único texto. Incluir no máximo duas tabelas ou figuras ou uma tabela e uma figura, title, abstract e key words antecedendo as referências.

Os **resumos de teses e dissertações** deverão conter o nome do autor, título da obra, nome da Instituição para a qual foi apresentado o trabalho e ano da defesa.

IMPORTANTE: os textos devem ser redigidos com processador de texto WORD for WINDOWS 6.0 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, letra Times New Roman e tamanho de letra 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf). Não serão aceitos arquivos compactados por ZIP, ARJ etc.

ABREVIATURAS – Devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

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

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

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

- (-) Quando pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;
- (z) Quando o dado for rigorosamente zero;
- (...) Quando não se dispuser de dado;
- (0,0) Quando a aplicação dos critérios de arredondamento não conseguir alcançar respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01, etc.;
- (x) Quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

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

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

da área de reprodução. As ilustrações coloridas estão sujeitas à confirmação. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para a reprodução.

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

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

No texto – As referências serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, escritas em versal. Assim, para um autor: “Taunay³¹ verificou”; para até dois autores todos deverão ser mencionados, separados pela letra e: “Pereira e Maia¹⁹, pesquisando...”. para mais de dois autores usar a expressão et al. : “no trabalho de Tsunoda et al.⁶⁹”; ou ainda...“ Segundo vários autores^{1,3,7,8}”.

Observação: nomes científicos somente em itálico.

As referências – terão numeração crescente e ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor (regra geral). Quando existirem mais de três autores, indicar o primeiro seguido da expressão et al.

Para artigos periódicos

Último sobrenome do(s) autor(s) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico em negrito e abreviado conforme estilo usado na Lista de Periódicos Indexados no Index Medicus, nº do volume, páginas inicial e final, ano da publicação.

Exemplo:

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

Livro no todo

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

Exemplo:

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

Capítulo de Livro

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

Exemplo:

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

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

Dissertações e Teses

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

Referência da Internet: último sobrenome do(s) autor(es) do “site” seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico (se for o caso), (em negrito e abreviado), nome do “site” entre colchetes. Data da consulta.

Exemplo:

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

DA PUBLICAÇÃO

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

2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Este original só será aceito quando tiver o visto desta comissão.

3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.

4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de nota prévia, que terá prioridade.

5. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no final do mesmo.

6. As provas tipográficas serão revisadas pela Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz. Essa Comissão se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

7. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

DA DISTRIBUIÇÃO

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

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo/Article

- 884 **Estudo de anticorpos IgM para vigilância epidemiológica da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade.**
IgM antibodies for epidemiological vigilance of schistosomiasis mansoni in a low endemic area.
Herminia Y. KANAMURA, Luiz C. S. DIAS, Carmen M. GLASSER, Rita M. SILVA, Vera L. F. de CAMARGO-NEVES, Sylvia A. G. VELLOSA, Cybele GARGIONI, Virgília L. C. LIMA, Vânia M. F. GUERCIO, Gisela R. A. M. MARQUES e Maria Esther de CARVALHO. 1-10
- 885 **Frequência de *Cryptosporidium* sp e *Isoospora belli* em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP – Brasil**
Frequency of *Cryptosporidium* sp and *Isoospora belli* in HIV-seropositives patients in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil.
Divani M. CAPUANO, Madalena H. T. OKINO e Maria José do C. B. BETTINI. 11-15
- 886 **Caracterização química parcial das sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.¹**
Partial chemical characterization of *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. seeds.
Maria Isabel VALLILO, Mário TAVARES, Sabria AUED-PIMENTEL e Maria Lima GARBELOTTI. 17-22
- 887 **Estudo do processo de refino do óleo de pescado**
Study of fish oil refining process
Marcilio M. MORAIS, Luiz A. de A. PINTO, Sheila C. A. ORTIZ, Valéria T. CREXI, Rodrigo de L. da SILVA e Janaína D. da SILVA. 23-33
- 888 **Propriedades físico-químicas das massas de pizza semiprontas e sua relação com o desenvolvimento de bolores e leveduras**
Physical-chemical properties of pre-made pizza dough and their relationship with the development of molds and yeast.
Beatriz Helena da Silva PINHO, Maria Ines F. MACHADO e Eliana B. FURLONG. 35-41
- 889 **Manutenção da fecundidade e oviposição em *Triatoma infestans* após décadas de criação em condições de laboratório**
Maintenance of fecundity and oviposition in *Triatoma infestans* after decades of breeding under laboratory conditions.
Oswaldo da Cruz OLIVEIRA JUNIOR, Elizabeth Visone NUNES, Carmem do Socorro GUILHERME, Sansão da Rocha WESTPHALEN, Maria Aparecida Moreira SANTOS, Helena Hilomi TANIGUCHI e José Eduardo TOLEZANO. 43-46

890	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo, Brazil. III. Anthropic action influence in the vectorial succession of ACL. José Eduardo TOLEZANO, Helena Hilomi TANIGUCHI, Carlos Roberto ELIAS e Rui LAROSA.	47-51
891	Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência Determination of cholesterol in meat: comparison of colorimetric and hplc methods Neura BRAGAGNOLO e Délia B. RODRIGUEZ-AMAYA.	53-57
892	Varição de alguns parâmetros do mel de melato em relação ao mel floral Comparison of some components between floral honey and honeydew honey Gisélia CAMPOS, Regina Célia DELLA MODESTA, Teófilo José Pimentel da SILVA e Délio Soares RASLAN.	59-64
893	Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos <i>Anopheles (kerteszia) cruzii</i> em Jquitiba – Estado de São Paulo – Brasil. Isolation of flavivirus Iguape from mosquitoes <i>Anopheles (kerteszia) cruzii</i> in Jquitiba - São Paulo State – Brazil. Esther Luiza BOCATO-CHAMELET, Terezinha Lisieux Moraes COIMBRA, Elza da Silva NASSAR, Luiz Eloy PEREIRA, Ivani Bisordi FERREIRA, Luiza Terezinha Madia de SOUZA e Akemi SUZUKI.	65-69
Artigo de Atualização/Up to date article		
894	Hepatite E: Atualização Hepatitis E: An update Alessandra Stilhano NASCIMENTO e Regina Célia MOREIRA.	71-77
Artigo Técnico/Technical Article		
895	Como obter resultados confiáveis em cromatografia How to obtain reliable results in chromatography Lucia M. VALENTE SOARES.	79-84
Comunicação Científica/ Brief Communication		
896	Nota sobre o ciclo evolutivo de <i>Triatoma infestans</i> Klug, 1834 (Hemiptera – Reduviidae) alimentados em ratos e sangue de ratos desfibrinado. Note of the life cycle of <i>Triatoma infestans</i> Klug, 1834 (Hemiptera-Reduviidae) reared in rats and defibrinated rats' blood Ana Maria MARASSÁ, Benedito Carlos PREZOTO e Lídia Mara CAETANO.	85-87
897	Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP – Brasil. Occurrence of <i>Cryptosporidium</i> spp. in vegetables commercialized in Ribeirão Preto City, São Paulo State, Brazil. Divani M. CAPUANO, Madalena H. T. OKINO, Maria José do C.B. BETTINI e Ana Célia S. MANGINI.	89-91

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

Circulação e caracterização de <i>Trypanosoma cruzi</i> isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil. Pinto, P. L. S.	93
---	----

Análise enantiosseletiva de atenolol em fluidos biológicos e formulações.	
Iha, Maria Helena.	93-94
Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo.	
Moreno, R.B.	94
Fibra alimentar e valor nutritivo de preparações servidas em restaurantes “por quilo” (Cerqueira César) São Paulo, SP.	
Garbelotti, Maria Lima.	94-95
ERRATA DO VOLUME ANTERIOR	96
Agenda de Eventos	3ª capa

EDITORIAL

Ao comemorar o sexagésimo ano da criação da REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, não podemos deixar de resgatar alguns trechos do editorial, escrito por J. P. Carvalho Lima, então Diretor do Instituto, publicado no primeiro número.

“O Instituto Adolfo Lutz é o Laboratório Central de Saúde Pública do Departamento de Saúde de São Paulo. Criado pelo decreto-lei nº 11.522, de 26 de outubro de 1940, substituiu na organização sanitária do Estado o antigo e tradicional Instituto Bacteriológico, que desde sua fundação em 1892, vinha desempenhado, integralmente, as funções de laboratório de Saúde Pública. Além de suas antigas atribuições, teve novos encargos, com a incorporação do Laboratório Bromatológico do Estado.

A Lei nº 43, de 18 de julho de 1892, autorizou a despesa para a montagem dos Laboratórios Bacteriológicos, Vacinogênico, o de Análises Químicas e o Laboratório Farmacêutico. A direção foi confiada a Felix Le Dantec, biólogo francês, discípulo de Pasteur. Le Dantec iniciou a sua atividade não só no terreno das práticas, como no campo das investigações científicas. Foram seus assistentes Adolfo Lutz, Artur de Mendonça e Bonilha de Toledo. Promissores corriam os trabalhos quando Le Dantec teve que regressar à França, assumindo a direção Adolfo Lutz que, desde 1885, investigava diferentes ramos da biologia.

A nomeação de Lutz para o Instituto Bacteriológico, em 18 de Março de 1893, marcou o início da Microbiologia no Brasil. Dificilmente se penetra num assunto de microbiologia ou de protozoologia, sem que por aí tenha passado Lutz

Em Novembro de 1908 deixa Lutz o Instituto Bacteriológico de São Paulo e, a convite de Osvaldo Cruz, inicia nova e proveitosa fase de investigações experimentais em nosso país.

O Instituto Bacteriológico perdeu Lutz, mas a figura do mestre jamais se apagou do espírito dos seus discípulos. Seu amor ao trabalho, seu devotamento à ciência ficaram como exemplo.

Ao lado do papel altamente beneficiador dos interesses do Departamento de Saúde e das necessidades gerais que pela evolução normal do Estado lhe foram impostas, o Instituto Adolfo Lutz levará avante o seu programa científico. A lei que o reorganizou, conservou-lhe, além de outras, a responsabilidade do estudo da etiologia das epidemias e endemias e das epizootias que se transmitem ao homem, característica que fez do antigo Instituto Bacteriológico um estabelecimento de renome universal. E se o diagnóstico das moléstias infecciosas e os meios de defesa do organismo necessitam de cuidados especiais, não menos importantes são os estudos que se deverão realizar em torno da Bromatologia e da Química. As duas ciências - Bacteriologia e Química - marcham unidas nas investigações modernas.

Para divulgar essas pesquisas, apresentamos hoje a REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ que, preenchendo uma enorme lacuna, satisfaz, também, a uma das maiores aspirações dos discípulos de Lutz. Será, finalmente, o testemunho de que o espírito do grande biólogo ainda dirige a sua escola”.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz editou 120 volumes e publicou 897 artigos científicos, em sua grande maioria foram pesquisas desenvolvidas no próprio Instituto. O volume de trabalhos publicados pelos cientistas que passaram ou que ainda se encontram no Instituto, deixam claro que o espírito de Lutz continua vivo, sua dedicação e devotamento a pesquisa permanecem entre os que o sucederam e ficarão registradas na história da evolução da ciência. Como visualizado por Carvalho Lima “O Instituto Adolfo Lutz tem, portanto, mais um dever o cumprir - Pesquisar”. A Revista tem assim possibilitado a divulgação do grandioso trabalho desenvolvido pelo IAL, em benefício da ciência, da pesquisa, do diagnóstico laboratorial e, principalmente, a preocupação com a população do Estado de São Paulo e do Brasil.

COMISSÃO DE REDAÇÃO DAS PUBLICAÇÕES OFICIAIS DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Estudo de anticorpos IgM para vigilância epidemiológica da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade

IgM antibodies for epidemiological vigilance of schistosomiasis mansoni in a low endemic area

Herminia Y. KANAMURA¹
Luiz C. S. DIAS²
Carmen M. GLASSER³
Rita M. SILVA⁴
Vera L. F. de CAMARGO-NEVES^{3*}
Sylvia A. G. VELLOSA⁴
Cybele GARGIONI^{4*}
Virgília L. C. LIMA³
Vânia M. F. GUERCIO⁴
Gisela R. A. M. MARQUES³
Maria Esther de CARVALHO³

RIALA6/884

Kanamura, H.Y. et al. Estudo de anticorpos IgM para vigilância epidemiológica da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):1-10, 2001

RESUMO. O controle da esquistossomose no Estado de São Paulo iniciou-se ao final da década de 60, tendo como linhas mestras o uso de moluscidas e a de quimioterapia. Apesar da aparente redução nos níveis de infecção, o Sistema de Vigilância Epidemiológica do Estado tem registrado continuamente casos autóctones da doença, tendo-se observado ampliação das áreas de transmissão. Com o objetivo de buscar-se método diagnóstico mais sensível para fins epidemiológicos em áreas de baixa endemicidade, onde o exame de fezes se mostra pouco eficiente, uma técnica sorológica foi avaliada em quatro áreas consideradas endêmicas para *Schistosoma mansoni* (*Sm*) no Estado. Amostras de fezes e de sangue absorvido em papel-filtro foram coletadas de populações de quatro áreas de transmissão com diferentes perfis epidemiológicos, acompanhando-as, por um período de 2 anos, com cinco inquéritos, a intervalos semestrais. Dados de prevalência e incidência obtidos pela aplicação da reação de imunofluorescência para anticorpos IgM contra tubo digestivo de *Sm* (RIF-IgM) e do exame de fezes (Kato-Katz) foram analisados comparativamente nas quatro áreas estudadas. Foi possível diferenciar os níveis de endemicidade das áreas estudadas com maior sensibilidade que pelo método parasitológico e detectar sazonalidade em

¹ Universidade de São Paulo (USP)

² Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

³ Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN)

⁴ Instituto Adolfo Lutz (IAL)

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 355 – 8º andar Parasitologia/ Setor de Esquistossomose, Cerqueira César – São Paulo
E-mail: cgargion@ial.sp.gov.br
Superintendência de Controle de Endemias, R. Paula Souza, 166 – 1º andar, Divisão Orientação Técnica, Luz, São Paulo – SP. CEP 01027-000
E-mail: vera@sucen.sp.gov.br

algumas das áreas, através da observação de taxas de soroconversão de RIF-IgM. Esta soroconversão, passando de negativo para positivo, indicando provável infecção recente, foi mais freqüente nos inquéritos realizados no 1º semestre do ano (pós-verão). A RIF-IgM demonstrou ser útil para estudos epidemiológicos da esquistossomose, podendo constituir método diagnóstico, tanto na fase aguda como crônica.

PALAVRAS-CHAVE. Esquistossomose; anticorpos IgM; epidemiologia; controle; baixa endemicidade.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni no estado de São Paulo caracteriza-se como uma doença de pouca gravidade, com manifestações clínicas vagas e pouco específicas, devido à baixa carga parasitária na maioria dos indivíduos infectados. Esta característica, além de impor limitações no que diz respeito ao diagnóstico clínico e parasitológico da doença, dificultando seu controle e erradicação, faz com que as populações infectadas ou sob risco de infecção não se preocupem com a sua ocorrência e com as possíveis conseqüências a médio e a longo prazo. Destaca-se a sua expansão a áreas antes indenes e a sua urbanização, que vem se intensificando nos últimos anos, com o aparecimento da transmissão da doença em cidades de maior porte, principalmente em áreas peri-urbanas^{20,21}. O método mais utilizado em inquéritos é o exame de fezes, pela técnica de Kato-Katz²⁰, mas este mostrou ser pouco eficiente no diagnóstico de indivíduos que eliminam menos que 100 ovos/g fezes^{5,10,27}, carga esta correspondente à maioria dos casos nas áreas endêmicas do estado. As técnicas de detecção de antígenos circulantes também não têm demonstrado sensibilidade suficiente para diagnóstico de indivíduos com baixos níveis de infecção⁸. Assim, as técnicas de detecção de anticorpos continuam a constituir instrumento de valor indubitável a serem usadas em estudos populacionais e a sua incorporação se faz imprescindível nos programas de controle da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade, como as encontradas no estado de São Paulo^{15,16,18,27}. Em nossa experiência, em algumas regiões do estado, temos observado que os índices de prevalência mais elevados revelados pelos testes imunodiagnósticos, quando comparados aos obtidos pelo exame parasitológico de fezes, se devem fundamentalmente à baixa sensibilidade do último e que os fatores que aumentam a sensibilidade deste exame, como a repetição do exame em maior número de amostras fecais, reduzem essa diferença^{10,13}.

O controle da esquistossomose no estado de São Paulo foi implementado em 1968-1969 pela Secretaria do Estado da Saúde, tendo como linhas mestras a quimioterapia seletiva e uso de moluscocidas^{1,31}. Desde então, o Programa de Controle tem-se baseado no método parasitológico de fezes, segundo Kato-Katz, como método de diagnóstico único, para a seleção dos indivíduos a serem submetidos à quimioterapia. Estas medidas reduziram os níveis de transmissão no estado, mas esta continua a ocorrer nas várias áreas do estado de São Paulo consideradas como de risco para a esquistossomose. As atividades de controle vêm sendo desenvolvidas nas seguintes

regiões do estado: Vale do Rio Paraíba do Sul, vale do Rio Ribeira de Iguape, Baixada Santista, litoral Sul, Vale do Paranapanema e áreas metropolitanas de São Paulo e Campinas. De todas essas regiões, a área dos municípios de Pedro de Toledo e Itariri, no vale do Ribeira, vêm sendo uma das mais ativamente pesquisadas e controladas^{6,7,24,25}. O controle da esquistossomose em Pedro de Toledo foi iniciado em 1968 pela Campanha de Combate à Esquistossomose da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, tendo a Superintendência de Controle de Endemias-SUCEN dado continuidade a partir de 1976. Apesar dos esforços, a taxa de prevalência que era de 4,0% em 1970 subiu para 12,0% em 1978, sendo que 85% dos portadores eram autóctones desses municípios. O índice de infecção de *Biomphalaria tenagophila*, única espécie de hospedeiro intermediário para *Schistosoma mansoni* na área permaneceu o mesmo, ao redor de 1%⁷. Em virtude desses achados, em colaboração com pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas, da SUCEN e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, iniciou-se em 1980, pesquisas e controle mais intensos da endemia na área em questão. Graças aos esforços conjugados e integrados dos diferentes setores da sociedade, pesquisadores e planejadores em saúde, lideranças comunitárias e políticos locais determinados na sustentação do programa, que incluía exame de fezes anual, quimioterapia seletiva, uso de moluscocida, educação sanitária e obras de saneamento, foi possível uma drástica redução nos índices de prevalência em Pedro de Toledo durante os onze anos de estudo. Todavia, a persistência de uma taxa de prevalência residual sugere a existência de vários fatores responsáveis pela manutenção da endemia, destacando-se, entre outros, a reinfeção, a falha terapêutica, resistência da cepa de *S. mansoni* à droga utilizada, contribuição de hospedeiros definitivos não-humanos e de portadores migrantes e não-detecção de portadores devido à baixa sensibilidade do exame de fezes. Com relação a este último, na tentativa de se encontrar metodologias diagnósticas alternativas, úteis e viáveis para aplicação em trabalhos de campo na esquistossomose, os resultados obtidos por duas técnicas imunodiagnósticas, de intradermo-reação e de imunofluorescência indireta em cortes de vermes de *S. mansoni* congelados para detecção de anticorpos IgG, foram analisados comparativamente àqueles encontrados pelo método de Kato-Katz, pelo qual, em 1980, através da leitura de três lâminas por amostra de fezes, quando a prevalência de *S. mansoni* na população de Pedro de Toledo foi de 22,8%. A partir desta análise, conhecendo-se a sensibilidade e especificidade do método de Kato-Katz e das duas técnicas imunodiagnósticas, foi possível elaborar um modelo

probabilístico que permitiu estimar, na época, a prevalência verdadeira da esquistossomose em Pedro de Toledo em 44,3%⁶.

A partir de 1991, tendo em vista os bons níveis de sensibilidade e especificidade demonstrados pela reação de imunofluorescência em cortes parafinados de vermes para detecção de anticorpos IgM contra antígenos de tubo digestivo, tanto para diagnóstico da esquistossomose aguda como crônica^{19,30}, passamos a avaliar a potencialidade desta técnica, RIF-IgM, para aplicação em estudos de campo. A possibilidade de detectar esses anticorpos em amostras de sangue coletadas em papel-filtro tornou a RIF um teste de aplicação mais prático, tendo em vista a grande estabilidade à temperatura ambiente dos cortes de vermes de *Schistosoma mansoni*, fixados em solução de Rossman e incluídos em parafina, facilitando seu armazenamento e distribuição e ainda viabilizando a execução da RIF por laboratórios que não mantinham o ciclo do parasita.

O presente trabalho compara os dados soroepidemiológicos de cinco grupos de indivíduos selecionados para a avaliação da RIF-IgM, como instrumento diagnóstico para estudo da dinâmica da transmissão da esquistossomose em quatro das regiões consideradas importantes para a esquistossomose no estado de São Paulo: Vale do Rio Ribeira de Iguape (Vale do Ribeira), Região Metropolitana de São Paulo (Grande São Paulo), Região Metropolitana de Campinas (Campinas) e Vale do Rio Paraíba do Sul (Vale do Paraíba), todas elas tendo a *B. tenagophila* como única espécie descrita como hospedeiro intermediário.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Áreas de estudo e inquéritos soro-coprocópicos

Foram obtidas nas seguintes localidades:

1.1. No município de Itariri, no Vale do Ribeira: foi selecionado para este estudo um grupo de escolares que freqüentavam quatro escolas de primeiro grau, duas situadas na localidade Ana Dias, uma em Raposo Tavares e uma em Caixa D'Água, localidades rurais vizinhas, as quais apresentavam os índices de prevalência para *S. mansoni* mais elevados dentro do município em questão, de acordo com o censo coprológico realizado em 1990. Nesse mesmo censo, a prevalência da esquistossomose autóctone no município foi avaliada em 3,1%, variando de 0,0 a 9,2% nas diferentes localidades. Cerca de 68,0% dos casos detectados na região puderam ser classificados como autóctones do estado, com a infecção sendo adquirida no mesmo ou nos municípios vizinhos na maioria deles. *Biomphalaria tenagophila* é a única espécie de caramujo descrita como hospedeiro intermediário na área. Amostras de fezes e de sangue em papel-filtro foram coletadas das crianças matriculadas nas quatro escolas selecionadas, em cinco inquéritos, realizados a intervalos semestrais, de abril de 1991 a abril de 1993, acompanhado-se os escolares por um período de 2 anos através de métodos parasitológico (Kato-Katz) e sorológico (RIF-IgM). Resultados deste estudo foram publicados anteriormente^{15,16}.

1.2. No município de Ribeirão Pires, na Região Metropolitana de São Paulo: foi escolhido um grupo de escolares residentes na localidade Jardim Mirante, onde nos últimos anos foram notificados seis casos autóctones de esquistossomose, sendo dois deles detectados através de censo coprocópico dirigido a escolares e os demais notificados pela rede de Saúde Pública. Os últimos focos ativos, isto é, com presença de planorbídeos infectados com cercárias de *S. mansoni*, foram detectados na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), em 1984, nos municípios de Ribeirão Pires e Guararema. A grande maioria dos casos de esquistossomose notificada na RMSP é importada de outros estados, principalmente Bahia, Minas Gerais e Pernambuco. Entretanto, os dados disponíveis na SUCEN levam a crer que a transmissão autóctone da esquistossomose ocorreu nos últimos 10 anos em 23 municípios da RMSP, embora em níveis muito baixos e de maneira esporádica. A análise dos casos autóctones na RMSP, feita através das fichas de investigação epidemiológica, dos censos coprológicos e das pesquisas planorbídicas, revela que a transmissão da esquistossomose não estaria restrita ao "foco" e que na verdade vários criadouros pareciam estar relacionados à ocorrência de "casos", embora não se conseguisse demonstrar a presença de caramujos infectados em repetidas pesquisas. Os escolares desta região foram acompanhados por métodos parasitológico (Kato-Katz) e sorológico (RIF-IgM) em cinco inquéritos, realizados a intervalos semestrais, de outubro de 1992 a outubro de 1994².

1.3. No município de Campinas, na Região Metropolitana de Campinas: foi selecionado um grupo de estudantes de uma escola do bairro Vila Costa e Silva, no Distrito de Barão Geraldo. Na Região Administrativa de Campinas, entre 1981 e 1990, após uma diminuição inicial, observou-se aumento do número de casos autóctones, e isto se deve principalmente a uma ampliação da área de transmissão na região e não necessariamente a um aumento do nível de transmissão nos municípios onde a esquistossomose já estava instalada. A transmissão parece ocorrer, na grande maioria dos casos, na área peri-urbana dos municípios. Campinas, município sede da região, foi o primeiro a apresentar casos de esquistossomose, com autoctonia comprovada, já em 1960, e é hoje o que apresenta maior número de casos autóctones na região. Apesar da ampliação da área de transmissão, não se tem, pela avaliação dos dados disponíveis, indicação de aumento dos níveis de transmissão nos locais mais antigos. Nos bairros que constituem a área do distrito de Barão Geraldo, uma das áreas do município de Campinas com níveis de transmissão aparentemente mais elevados, situado na região norte da cidade, em zona urbana, foram notificados 264 casos autóctones, entre 1979 e 1990. Nesse distrito, Vila Costa e Silva foi o bairro que concentrou maior número de casos autóctones (121 casos) no período. A partir de 1984 o número de casos autóctones notificados diminuiu; exames de fezes realizados em 1990 entre escolares do bairro mostrou prevalência de 0,0%. Os escolares desta região foram acompanhados por métodos

parasitológico (Kato-Katz) e sorológico (RIF-IgM) em cinco inquéritos, realizados a intervalos semestrais, de outubro de 1993 a outubro de 1995²³.

1.4. Nos municípios de Pindamonhangaba e de Piquete, no Vale do Paraíba: Amostras de fezes e de sangue em papel filtro foram coletadas com intervalos semestrais, em cinco inquéritos, no período de dezembro de 1993 a dezembro de 1995, de toda a população da Fazenda Colmeia, em Pindamonhangaba, e da Vila Cristiana, em Piquete, representando respectivamente áreas de transmissão antiga e recente de esquistossomose no Vale do Rio Paraíba do Sul. Nesta região a parasitose ocorre em nove municípios, sendo esta a área no estado de São Paulo com maior número de casos autóctones registrados no período de 1981 a 1990. A média dos casos notificados por ano é de cerca de 400, dos quais 60% são classificados como autóctones. Os primeiros casos autóctones do Vale do Paraíba surgiram por volta de 1956, sendo que a história da esquistossomose na fazenda Colmeia deve ter-se iniciado nessa época, enquanto a da Vila Cristiana deve ter começado na década de 80. A Fazenda Colmeia fica numa área de várzea e sua população tem como atividade econômica principal a rizicultura. Vila Cristiana é uma área periurbana e o acometimento da esquistossomose estaria associada principalmente a atividades de lazer³.

2. Reação de imunofluorescência (RIF)

A RIF foi realizada utilizando-se, como antígeno, cortes de vermes adultos fixados em solução de Rossman e incluídos em Paraplast[®], para detecção de anticorpos IgM, de acordo com metodologia já descrita³⁰. Os eluatos, obtidos a partir das amostras de sangue absorvido em papel-filtro¹¹, foram utilizados na diluição 1/16 e incubados por 45 minutos a 37° C, em câmara úmida. Os conjugados anti-IgM com fluoresceína (Biolab, RJ – Brasil) foram diluídos segundo seus títulos ótimos. As leituras

foram realizadas em microscópio de fluorescência, sendo consideradas positivas as reações que apresentaram estruturas fluorescentes apenas no tubo digestivo dos vermes, como já descrito em trabalhos anteriores^{19,30}.

3. Exame de fezes

Uma amostra de fezes por indivíduo, em cada inquérito, foi submetida a exame pelo método de Kato-Katz²⁰. O número de ovos por grama de fezes foi determinado através da médias das contagens encontradas em três lâminas.

4. Análise estatística

Um banco de dados foi organizado para o armazenamento dos dados pessoais, clínicos e laboratoriais, utilizando-se o programa Epi-Info. O mesmo programa foi usado para analisar os resultados obtidos nos cinco inquéritos⁴.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra os dados de prevalência para diferentes helmintos e a Tabela 1 o número de indivíduos envolvidos no projeto e as respectivas faixas etárias para as cinco localidades selecionadas para o presente estudo. Com relação ao tratamento anterior com droga esquistossomicida, as porcentagens encontradas para as duas populações do Vale do Paraíba são apenas estimativas.

De acordo com os dados da Tabela 1 em duas áreas, Vale do Ribeira e Campinas, o número de amostras de sangue submetidas ao teste sorológico foi maior que o de fezes examinadas, enquanto nas duas outras áreas, Grande São Paulo e Vale do Paraíba, observa-se o inverso.

A população com níveis mais elevados de positividade para *S. mansoni*, segundo os dados encontrados tanto pelo método parasitológico como sorológico, foi a do Vale do Ribeira,

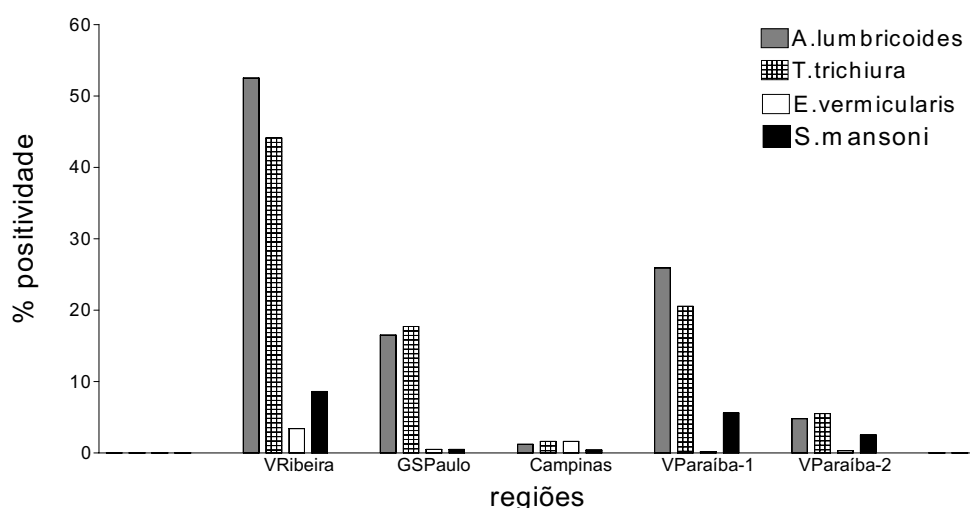


Figura 1. Índices de prevalência para helmintíases nas diferentes áreas de estudo (dados do primeiro inquérito realizado em cada uma das populações estudadas)

Regiões = vide Tabela 1

Tabela 1. Alguns dados das populações estudadas nas diferentes áreas de estudo (dados do primeiro inquérito).

	Vale do Ribeira ^a	Grande São Paulo ^b	Campinas ^c	Vale do Paraíba	
				1 ^d	2 ^e
Nº de participantes (Masc/Fem)	628 (328/300)	402 (207/195)	466 (236/230)	456 (216/240)	846 (348/498)
Período de estudo	04/91 a 04/93	10/92 a 10/94	10/93 a 10/95	12/93 a 12/95	
Faixa etária	5-18 anos	5-18 anos	0-18 anos	0-88 anos	0-86 anos
Nº amostras submetidas ao Kato-Katz	513	400	255	409	722
Nº amostras submetidas ao RIF-IgM	627	377	426	344	620
% tratamento anterior para esquistossomose (Sim/Não)	19,4% (122/506)	0,0% (0/402)	0,0% (0/466)	8,3% (38/418)	5,4% (46/800)

a = Localidades de Ana Dias, Raposo Tavares e Caixa D'Água, no município de Itariri; b = Jardim Mirante, no município de Ribeirão Pires; c = Vila Costa e Silva, no município de Campinas; d = Fazenda Colmeia, no município de Pindamonhangaba; e = Vila Cristiana, no município de Piquete.

seguida pelas duas populações estudadas do Vale do Paraíba. A positividade observada nas outras duas áreas foi muito baixa (Figura 2).

As porcentagens de positividade obtidas pelos métodos parasitológico e sorológico, nos cinco inquéritos realizados, com intervalos semestrais, nas diferentes áreas estudadas estão apresentados na Figura 3.

Foi possível observar influência da infecção passada no resultado da RIF-IgM, pois a porcentagem de positividade sorológica foi significativamente maior nos indivíduos com história de tratamento anterior com droga esquistossomicida (85,2%) que no grupo que não recebeu esse tratamento (49,5%).

Dos 299 escolares do Vale do Ribeira que se submeteram à RIF-IgM nos cinco inquéritos, 40,5% foram sorologicamente positivos em todos os inquéritos e apenas 21,8% foram negativos durante todo o período de acompanhamento (Tabela 2). Ocorrência de viragem sorológica foi observada com maior frequência nos inquéritos pós-verão, em 10,7% dos casos do 2º para o 3º inquérito e em 7,4% do 4º para o 5º inquérito, sendo que o 3º e o 5º inquérito foram realizados ambos no primeiro semestre, após as férias de verão, respectivamente em 1992 e 1993. Nos inquéritos pós-inverno, as porcentagens de casos com viragem sorológica foram baixas 2,0% e 1,0% respectivamente do 1º para o 2º e do 3º para o 4º inquérito. A

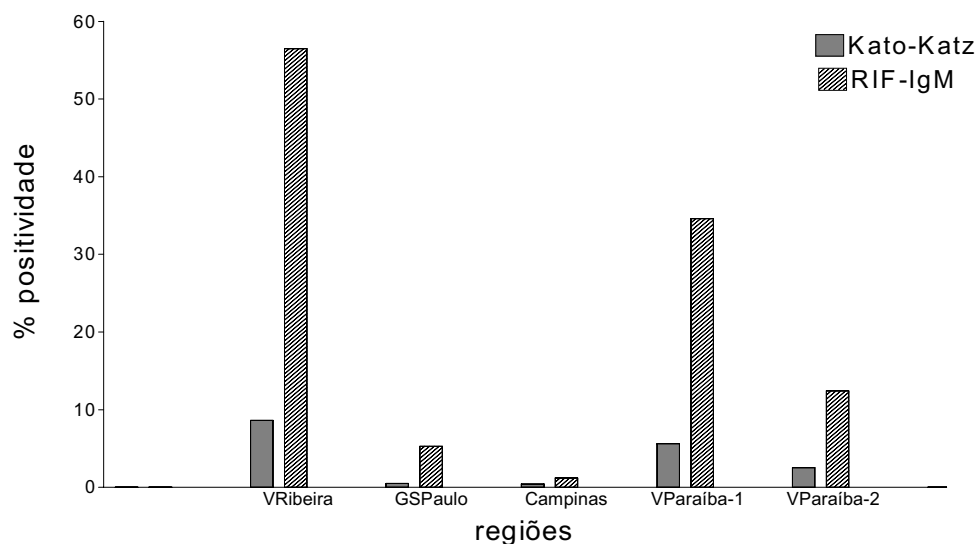


Figura 2. Índices de positividade para esquistossomose por método parasitológico (Kato-Katz) e sorológico (RIF-IgM) nas diferentes populações estudadas (dados do primeiro inquérito)

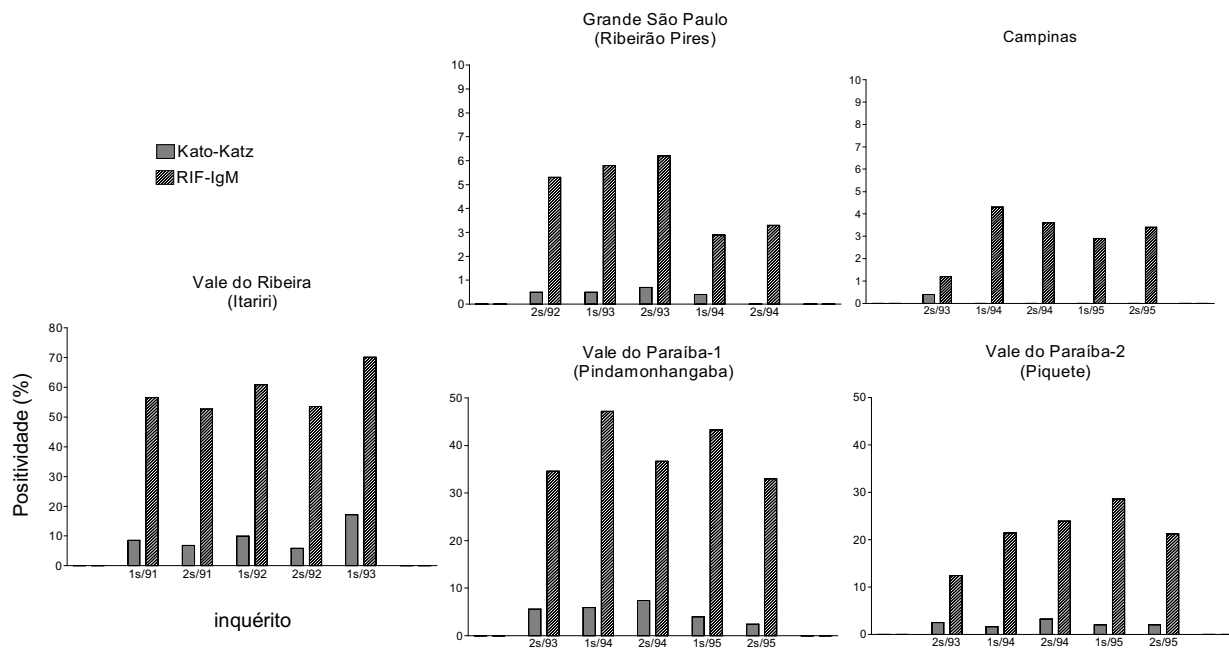


Figura 3. Porcentagens de positividade para esquistossomose por método parasitológico (Kato-Katz) e sorológico (RIF-IgM), nos cinco inquéritos realizados, com intervalos semestrais, em cada uma das populações estudadas

análise quanto à ocorrência de soroconversão nas demais áreas ficou prejudicada pelo pequeno número de casos com seguimento sorológico completo (Tabela 2). Entretanto, observando-se os dados da Tabela 3, foi possível detectar diferenças nas taxas de soroconversão nos diferentes períodos, indicando possível ocorrência de sazonalidade na transmissão da esquistossomose, também na localidade Fazenda Colmeia, no Vale do Paraíba. Nesta localidade, taxas elevadas de soroconversão foram observadas do 1º para o 2º e do 3º para o 4º inquérito, sendo que os inquéritos 2º e 4º foram realizados ambos no primeiro semestre, após as férias de verão, respectivamente em 1994 e 1995. Nas demais áreas, as diferenças observadas nas taxas de soroconversão foram pouco expressivas (Tabela 3).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a RIF-IgM foi avaliada com o objetivo de se verificar sua potencialidade para estudo da dinâmica de transmissão da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade. Em trabalhos anteriores^{15,19,30}, foi demonstrada a boa sensibilidade desta reação para diagnóstico tanto da esquistossomose aguda como crônica, assim como sua excelente especificidade com soros de indivíduos clinicamente sadios ou mesmo com outras infecções parasitárias.

Em todos os inquéritos, nas diferentes áreas estudadas, os índices de positividade pela RIF-IgM foram significativamente mais elevados que os encontrados pelo Kato-Katz (Figura 3). De fato, nos vários estudos soropidemiológicos realizados no Brasil ou no exterior, empregando diferentes métodos sorológicos e parasitológicos, os autores têm encontrado índices

de prevalência de 2 a 5 vezes mais elevados pelo primeiro que pelo segundo método^{6,9,14,27,28,29,32}.

É interessante observar neste trabalho diferenças nas dificuldades encontradas com relação à coleta de material clínico para os exames laboratoriais nas várias localidades. Nas áreas do Vale do Ribeira e de Campinas ficou favorecida a obtenção de amostras de sangue, enquanto na Grande São Paulo e no Vale do Paraíba, a de fezes (Tabela 1). Tais diferenças podem estar relacionadas às características sociais e culturais das populações estudadas, mas deve-se levar em conta também as formas de treinamento e capacitação das equipes de campo, assim como dos recursos alocados para esta fase do projeto nas diferentes áreas.

O estudo de acompanhamento sorológico com a RIF-IgM possibilitou diferenciar os níveis de endemicidade das áreas estudadas com maior sensibilidade que pelo método parasitológico e detectar ocorrência de sazonalidade na transmissão da esquistossomose na população escolar de Itariri, no Vale do Ribeira, e na Fazenda Colmeia, no Vale do Paraíba. Nestas populações, taxas de soroconversão mais elevadas foram observadas nos inquéritos pós-verão, quando comparadas com as taxas encontradas nos inquéritos pós-inverno (Tabelas 2 e 3). Nas áreas da Grande São Paulo e de Campinas, tendo em vista os baixos índices de positividade sorológica, pela RIF-IgM (Figura 3), confirmando os dados de prevalência parasitológica extremamente reduzidos encontrados pelo método de Kato-Katz, pode-se sugerir como sendo pequeno o risco de exposição das crianças ao *S. mansoni*. Nestas duas áreas não foram observadas diferenças nas taxas de soroconversão nos diferentes períodos (Tabela 2 e 3). Nos poucos casos em que

Tabela 2. Número e porcentagem (%) de casos para cada combinação de resultados do teste sorológico (RIF-IgM), nos cinco inquéritos realizados, da população examinada nas diferentes áreas de estudo.

Resultado da RIF-IgM em cada inquérito					Número (%) de casos p/ cada combinação de resultados Da RIF-IgM, em cada uma das áreas de estudo				
1°	2°	3°	4°	5°	Vale do Ribeira ^a	Grande São Paulo ^b	Campinas ^c	Vale do Paraíba	
								1 ^d	2 ^e
N*	N	N	N	N	65 (21,8%)	151 (93,2%)	69 (95,8%)	41 (56,9%)	54 (79,4%)
P*	P	P	P	P	121 (40,5%)	6 (3,7%)	0	14 (19,4%)	6 (8,8%)
N	P	P	P	P	6 (2,0%)	2 (1,2%)	0	2 (2,8%)	6 (8,8%)
N	N	P	P	P	32 (10,7%)	0	0	1 (1,4%)	0
N	N	N	P	P	3 (1,0%)	0	0	0	1 (1,5%)
N	N	N	N	P	22 (7,4%)	0	0	0	0
P	N	N	N	N	1 (0,3%)	1 (0,6%)	0	1 (1,4%)	0
P	P	N	N	N	0	0	0	0	0
P	P	P	N	N	0	0	0	0	0
P	P	P	P	N	2 (0,7%)	1 (0,6%)	0	1 (1,4%)	0
P	P	P	N	P	15 (5,0%)	0	0	0	0
P	N	P	P	P	11 (3,7%)	0	0	0	0
P	N	P	N	P	6 (2,0%)	0	0	0	0
P	N	N	N	P	4 (1,3%)	0	0	0	0
P	P	N	P	P	2 (0,7%)	0	2 (2,8%)	4 (5,6%)	0
P	P	N	N	P	1 (0,3%)	0	0	0	0
P	P	N	P	N	0	0	0	0	1 (1,5%)
N	N	P	N	P	4 (1,3%)	0	0	0	0
N	N	P	N	N	2 (0,7%)	0	0	0	0
N	N	P	P	N	1 (0,3%)	0	0	0	0
N	P	N	N	P	1 (0,3%)	0	0	0	0
N	P	P	P	N	0	1 (0,6%)	0	0	0
N	P	P	N	P	0	0	1 (1,4%)	1 (1,4%)	0
N	P	N	P	P	0	0	0	3 (4,2%)	0
N	P	N	N	N	0	0	0	4 (5,6%)	0
T O T A L					299 (100%)	162 (100%)	72 (100%)	72 (100%)	68 (100%)

a, b, c, d, e = Vide Tabela 1

* = Resultado Negativo (N) ou Positivo (P) para RIF-IgM

Tabela 3. Número de casos com ocorrência de viragem sorológica em dois inquéritos subsequentes, isto é, alternando de RIF-IgM negativo para positivo, independentemente do resultado sorológico nos inquéritos anteriores ou posteriores.

Resultado da RIF-IgM em cada inquérito					Número (%) de casos com viragem sorológica em cada uma das áreas de estudo				
1°	2°	3°	4°	5°	Vale do Ribeira ^a	Grande São Paulo ^b	Campinas ^c	Vale do Paraíba	
								1 ^d	2 ^e
N*	P*	?	?	?	9 (4,9%)	4 (80,0%)	7 (41,2%)	27 (64,3%)	17 (47,2%)
?	N	P	?	?	73 (39,7%)	1 (20,0%)	3 (17,6%)	1 (2,4%)	8 (22,2%)
?	?	N	P	?	15 (8,1%)	0	5 (29,4%)	13 (30,9%)	8 (22,2%)
?	?	?	N	P	87 (47,3%)	0	2 (11,8%)	1 (2,4%)	3 (8,3%)
Total					184 (100%)	5 (100%)	17 (100%)	42 (100%)	36 (100%)

a, b, c, d, e = Vide Tabela 1

* = Resultado Negativo (N) ou Positivo (P) para RIF-IgM

mudança de sorologia negativa para positiva foi detectada entre dois inquéritos subsequentes, não se conseguiu confirmar a ocorrência de possível soroconversão por causa das flutuações nos resultados da RIF-IgM ou por falha no seguimento sorológico após a viragem sorológica. Em alguns indivíduos, em geral com níveis de anticorpos muito baixos, próximos à diluição de corte, oscilações nos resultados da RIF-IgM de negativo para positivo e vice-versa eram ocasionalmente observadas. A elevada porcentagem de indivíduos com resultado sorológico negativo nos cinco inquéritos nas áreas da Grande São Paulo e Campinas, respectivamente 93,2% e 95,8% (Tabela 2), confirmam o baixo nível de infecção nestas localidades.

Vale ainda analisar comparativamente os resultados encontrados nas duas localidades do Vale do Paraíba, selecionadas para o presente estudo. Índices de positividade mais elevados tanto pelo método parasitológico como sorológico (Figura 3) foram observados na Fazenda Colmeia, área de transmissão mais antiga (década de 50) que na da Vila Cristiana (década de 80). Os percentuais de positividade para RIF-IgM subiram acentuadamente até as idades de 10 a 14 anos nas duas populações, mas na primeira estes índices mantiveram-se elevados nas demais faixas etárias, enquanto na segunda, observou-se queda a partir das idades de 15 a 19 anos (dados não apresentados). Essas diferenças podem ainda ser justificadas por padrões de aquisição da infecção distintos nas duas áreas,

associada ao trabalho de rizicultura, que envolve população economicamente ativa, em Colmeia, e ao lazer, em Vila Cristiana, envolvendo população mais jovem³.

O número relativamente grande de casos positivos para RIF-IgM e negativos para Kato-Katz nas quatro áreas estudadas pode estar associado a diferentes fatores, entre eles podemos citar: maior sensibilidade do método sorológico, falha do método parasitológico nos casos de baixa carga parasitária, reações cruzadas com outros parasitas ou com cercárias de vida livre e permanência de anticorpos nos indivíduos com infecção anterior. Todos estes fatores precisam ser melhor investigados para uma interpretação mais acurada dos dados soroepidemiológicos encontrados nas diferentes áreas, de modo a permitir a obtenção de um resultado mais próximo da realidade. Todavia, apesar destas limitações, tendo em vista a excelente sensibilidade já demonstrada pela RIF-IgM na detecção de casos de esquistossomose numa fase bem precoce, esta técnica constitui, sem dúvida, instrumento valioso para se estudar a dinâmica de transmissão da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade. A RIF-IgM pode ser útil para a seleção de casos a serem posteriormente comprovados por exames parasitológicos exaustivos e contribuir para incrementar os programas de controle e de vigilância epidemiológica da esquistossomose, principalmente em regiões antes indenes, como por exemplo no Rio Grande do Sul, onde foi pela primeira vez descrito um foco da endemia¹².

Kanamura, H.Y. et al. IgM antibodies for epidemiological vigilance of schistosomiasis mansoni in a low endemic area **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):1-10, 2001

ABSTRACT. The control of schistosomiasis in the State of São Paulo started at the end of the sixties. The main control measures included the application of molluscicides and chemotherapy. Despite the apparent decrease of the infection levels, the Epidemiological Vigilance System of the State has continually recorded cases of the disease, and expansion of transmission areas has been observed. Since the stool examination showed to be insufficiently sensitive for epidemiological purposes in areas with low transmission, a serological technique was evaluated in four schistosomiasis endemic areas of the State with the aim of finding a more efficient diagnostic method. For a period of two years, five follow-up measures of prevalence and incidence rates were obtained for the four areas, through the stool examination (Kato-Katz method) and detection of IgM antibodies to gut antigens by the immunofluorescence test (IgM-IFT) on filter paper blood samples. The comparative analysis of the data showed the occurrence of seasonal transmission in some of the studied areas, detected by the observation of differences in the seroconversion rates. Seroconversion from IgM-IFT negative to positive, indicating newly acquired *Schistosoma mansoni* infection, was observed more frequently in surveys carried out after summer holidays. The IgM-IFT proved to be a useful technique for epidemiological purposes in schistosomiasis, so that it can be applied for diagnosis of both acute and chronic forms of the disease.

KEY WORDS. Schistosomiasis, IgM antibodies, epidemiology, control, low endemics.

REFERÊNCIAS

1. CACESQ (Campanha de Combate à Esquistossomose) **I Encontro Nacional sobre esquistossomose**. São Paulo, Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, 1973.
2. Camargo-Neves, V.L.F. et al. IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of schistosomiasis transmission in Ribeirão Pires, São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93 (suppl.1): 273-278, 1998.
3. Carvalho, M.E. et al. Evaluación serológica de la esquistosomosis mansónica en áreas de baja transmisión del valle de Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil, 1997 nov 17-23; La Havana, Cuba. La Havana: **Federación Latinoamericana de Parasitología**; 1997. p.113-114.
4. Dean, A.G. et al. **Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers**. Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, U.S.A., 1995.
5. De Vlas, S.J.; Gryseels, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasitol. Today**, 8: 274-277, 1992.
6. Dias, L. C. S. et al. Field trials for immunodiagnosis with reference to *Schistosoma mansoni*. In: Bergquist, N. R. **Immunodiagnostic approaches in schistosomiasis**. John Wiley & Sons, 1992. p. 39-47.
7. Dias, L.C.S. et al. Schistosomiasis mansoni in the municipality of Pedro de Toledo (São Paulo, Brasil) where the *Biomphalaria tenagophila* is the snail host: I. Prevalence in human population. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 31: 110-118, 1989.
8. El-Morshedy, H. et al. Circulating anodic antigen for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Egyptian patients. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 54: 149-153, 1996.
9. Eltiro, F.; Ye-Ebiyo, Y.; Taylor, M.G. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen as a diagnostic tool for *Schistosoma mansoni* infection in Ethiopian schoolchildren. **J. Trop. Med. Hyg.**, 95: 52-56, 1992.
10. Engels, D.; Sinzinkayo, E.; Gryseels, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* and its operational implications. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 54: 319-324, 1996.
11. Ferreira, C.S.; Carvalho, M. E. Padronização de uso de papel-filtro como suporte de material para reações sorológicas. **Rev. Bras. Malariol.**, 34: 82-86, 1982.
12. Graeff-Teixeira, C. et al. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94(1): 9-10,1999.
13. Hoshino-Shimizu, S. et al. Aspectos sorológicos e soroepidemiológico da esquistossomose mansônica. In: Reis, F.A.; Faria, I.; Katz, N. **Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose mansônica. Anais da Academia Mineira de Medicina**, 14 (Suppl): 67-89, 1986.
14. Idris, M.A. et al. Schistosomiasis in the southern region of Oman: vector snail and serological identification of patients in several locations. **J. Trop. Med. Hyg.**, 97: 205-210, 1994.
15. Kanamura, H.Y. et al. A comparative epidemiologic study on specific antibodies (IgM and IgA) and parasitological findings in an endemic area of low transmission of *S. mansoni*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 40(2): 85-91,1998.
16. Kanamura, H.Y. et al. Detection of IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of the dynamics of schistosomiasis transmission in a low endemic area. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 40(4): 225-231, 1998.
17. Kanamura, H.Y. et al. Decay of antibody isotypes against early developmental stages of *Schistosoma mansoni* after treatment of schistosomiasis patients. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 39(5): 137-140,1997.
18. Kanamura, H.Y.; Hoshino-Shimizu, S.; Silva, L. C. *Schistosoma mansoni* cercaria and schistosomulum antigens in serodiagnosis of schistosomiasis. **Bull. Pan Amer. Hlth Org.**, 26: 220-229, 1992.
19. Kanamura, H.Y. et al. Anticorpos séricos IgA no diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansoni humana. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 51: 101-104, 1991.
20. Katz, N.; Chaves, A.; Pellegrino, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 14:397-400, 1972.
21. Katz, N.; Peixoto, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. trop.** 33(3): 303-308, 2000.

22. Lima, V.L.C. de Esquistossomose no Município de Campinas. Campinas, 1993 (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP).
23. Lima, V.L.C. et al. Immunofluorescent test on *Schistosoma mansoni* worm paraffin sections (IgM – IFT) for the study of schistosomiasis transmission in Campinas, São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93 (suppl.1):283-288,1998.
24. Marçal Jr., O. et al. Schistosomiasis mansoni in an area of low transmission. II. Risk factors for infection. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 35: 331-335, 1993.
25. Marçal Jr. O. et al. Schistosomiasis mansoni in an area of low transmission. I. Impact of control measures. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 33: 83-90, 1991.
26. Nash, T.E. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. I. Sensitivity and specificity. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 27: 938-943, 1978.
27. Noya, B.A. et al. The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: Features and Evolution. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94(2): 139-146, 1999.
28. Noya, O. et al. Effect of chemotherapy on immune response to egg antigens of *Schistosoma mansoni* in chronically infected children from areas of low transmission. **Paras. Immunol.**, 17: 111-117, 1995.
29. Silva, R.M. et al. A comparative study on IgG-ELISA, IgM-IFT and Kato-Katz methods for epidemiological purposes in a low endemic area for schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93 (suppl.1): 279-282, 1998.
30. Silva, R.M. et al. Pesquisa de anticorpos IgM contra tubo digestivo do verme para o diagnóstico da esquistossomose mansônica. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, 28: 39 - 42, 1992.
31. SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias). **Situação da esquistossomose no Estado de São Paulo. II Encontro sobre esquistossomose.** São Paulo, Imprensa Oficial do Estado, 1982 [Relatório].
32. Valli, L.C.P. et al. Schistosomiasis mansoni: Immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 61(2): 302-307, 1999.

Recebido em 14/07/2000; Aprovado em 24/10/2000

Freqüência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP – Brasil

Frequency of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* in HIV-seropositive patients in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil

Divani M. CAPUANO^{1*}
Madalena H. T. OKINO¹
Maria José do C. B. BETTINI¹

RIALA6/885

Capuano, D. M.; Okino, M. H. T.; Bettini, M. J. C. B. Freqüência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60 (1):11-15, 2001

RESUMO. Entre os patógenos entéricos que acometem os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) estão os protozoários oportunistas *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli*. O objetivo deste estudo é avaliar a freqüência de criptosporidiose e isosporíase em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto. Entre julho de 1990 a junho de 1997, foram examinadas no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto 3.340 amostras de fezes de 1.833 pacientes sintomáticos ou não, com idade entre 10 meses e 55 anos, atendidos nos Ambulatórios de DST/AIDS do município. A freqüência destes protozoários nas amostras de fezes foi de 9,3%. Foi observado que 207 (11,3%) dos pacientes estavam parasitados, sendo que *Cryptosporidium* sp foi encontrado em 117 (6,4%) pacientes e *Isospora belli* em 81 (4,4%). Infecção concomitante por ambos os parasitas ocorreu em 09 (0,5%) dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE. *Cryptosporidium* sp; *Isospora belli*; AIDS; Ribeirão Preto, SP.

INTRODUÇÃO

A diarreia é a manifestação gastrointestinal mais comum que acomete os pacientes com AIDS. Entre os agentes etiológicos da mesma, estão os protozoários oportunistas *Cryptosporidium* sp e a *Isospora belli*. Estes parasitas passaram a receber a atenção da comunidade médico-científica e a serem melhor estudados, a partir da década de 70, com o advento da AIDS.

A infecção pelo *Cryptosporidium* sp nos indivíduos imunocompetentes geralmente é autolimitada e de curso

benigno^{3,5,16}; no entanto, nos indivíduos imunocomprometidos ela se manifesta de forma intensa, com quadros diarréicos altamente espoliativos, podendo levar à desidratação, perda de peso e evoluir para a síndrome de má-absorção^{3,5,16,23}. Nas crianças, as manifestações clínicas são mais severas do que nos adultos, principalmente nas menores de 1 ano de idade^{1,14}. Contudo, a duração e a severidade da infecção estão diretamente relacionadas com o estado imunitário do paciente^{3,14}. Os pacientes com AIDS podem apresentar um largo espectro clínico da doença com evolução para formas hepato-biliares²⁶, pancreáticas⁵ e pulmonares¹⁴.

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto – Área de Parasitologia

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto – Rua Minas, 877. Campos Eliseos, Ribeirão Preto CEP 14.085-410

A transmissão se faz através dos oocistos que podem ser disseminados diretamente de pessoa a pessoa, homem-animal e animal-homem. A contaminação fecal de alimentos e da água têm contribuído para a alta prevalência da criptosporidiose em áreas com condições sanitárias deficientes¹⁵.

O tratamento nos casos mais graves exige a hospitalização do paciente para reposição hidro-eletrolítica e suplementação nutricional¹⁴. Atualmente ainda não há um tratamento comprovadamente eficaz para a criptosporidiose. Muitas drogas têm sido desenvolvidas e testadas, incluindo a terapia antiretroviral⁹. Tzipori²⁵ pressupõe que a razão da falência terapêutica deve-se ao fato de o parasita situar-se abaixo da membrana celular, mas fora do citoplasma da célula, resultando numa barreira para os medicamentos antimicrobianos e antiparasitários, e que este fato deve ser considerado na investigação de novas drogas terapêuticas.

A partir de 1996, o Ministério da Saúde passou a fornecer gratuitamente a terapia antiretroviral combinada, com a introdução dos medicamentos inibidores da transcriptase reversa e dos inibidores da protease em substituição à monoterapia²². Esta nova terapêutica, associada ao acesso aos testes de carga viral e de exames CD₄, resultou num melhor estado imunitário e numa maior sobrevivência dos pacientes¹⁷.

O protozoário *Isoospora belli* é um parasita monoxeno, encontrado predominantemente em climas tropicais⁴, sendo o ser humano o único hospedeiro. Todo o ciclo reprodutivo ocorre dentro das células epiteliais do intestino delgado. A isosporíase é uma infecção com baixa prevalência entre os indivíduos imunocompetentes, sendo geralmente assintomática ou apresentando diarreia auto-limitada⁴. Nos pacientes imunocomprometidos adquire elevada incidência, provocando quadro diarreico intenso^{4,6,18}, podendo evoluir para desidratação e síndrome de má-absorção^{4,6,23}. Nestes pacientes podem ocorrer, ainda, quadros de disseminação extra-intestinal, acometendo linfonodos mesentéricos, periaórticos, mediastinais e traqueobronquiais⁴. A transmissão pode ocorrer diretamente de pessoa para pessoa, através da contaminação fecal-oral e através da água e alimentos contaminados pelos oocistos⁴. Para o tratamento da isosporíase existe terapia adequada⁴.

O município de Ribeirão Preto, localizado a 329 km ao norte da capital do Estado de São Paulo, constitui um centro de referência na região no atendimento de pacientes soropositivos para o HIV. O município possui 3 Ambulatórios Especializados em DST/AIDS: Distrital Central, Distrital Sumarezinho e o Ambulatório Regional de Especialidades (ARE). O Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Ribeirão Preto –, faz parte da rede de Laboratórios de Referência para DST/AIDS, sendo referência macrorregional no diagnóstico das infecções oportunistas.

Pretendemos com o presente estudo avaliar a frequência dos coccídios *Cryptosporidium* sp e *I. belli* nos pacientes soropositivos na região de Ribeirão Preto, fornecendo à classe médica informações que possam subsidiar atividades de assistência médica junto a estes pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre julho de 1990 e junho de 1997, foram examinadas na Seção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, 3340 amostras de fezes diarreicas ou não de 1833 pacientes (1193 homens e 640 mulheres) soropositivos para o HIV, com idade entre 10 meses e 55 anos (média de 26,5 anos), atendidos nos Ambulatórios Especializados em DST/AIDS do município.

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp e de *I. belli*, as fezes foram submetidas à técnica da concentração pelo formol-éter modificado⁷, seguido de coloração pelo método de Kinyoun⁶. As lâminas foram então examinadas em microscópio óptico com aumento de 400X e 1000X.

RESULTADOS

No período estudado foram examinadas 3340 amostras de fezes (média de 1,8 amostras/paciente), constatando-se a presença dos coccídios em 310 (9,3%) amostras. A Tabela 1 demonstra a frequência anual destes coccídios nas amostras de fezes examinadas no período. Observa-se uma frequência maior de *Cryptosporidium* sp no ano de 1995 (10,6%) e de *I. belli* em 1997 (7,2%). Este fato talvez possa ser explicado por diferentes sazonalidades entre os dois parasitas. Nota-se uma tendência decrescente no número de amostras examinadas a partir de 1995. Na Figura 1 podemos observar a distribuição das amostras positivas de acordo com a época do ano. Verifica-se maior frequência de *Cryptosporidium* sp entre os meses de março a maio, após os meses mais quentes e úmidos do ano na região e de *I. belli* entre dezembro e fevereiro, durante os meses quentes e úmidos.

Do universo de 1833 pacientes, 207 (11,3%) estavam parasitados pelos coccídios, sendo que 117 (6,4%) apresentaram infecção pelo *Cryptosporidium* sp, 81 (4,4%) pela *I. belli* e 09 (0,5%) por ambos os parasitas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Não há registros de trabalhos anteriores avaliando a frequência de *Cryptosporidium* sp e de *I. belli* na população de pacientes HIV positivos na região de Ribeirão Preto. Neste estudo encontramos uma frequência de 6,4% para o *Cryptosporidium* sp e de 4,4% para a *I. belli*. Esta frequência de *Cryptosporidium* sp foi inferior à observada entre os pacientes com AIDS no município de São Paulo, de 12,1%; 14,3% e 21,2%, respectivamente por Dias et al.⁸, Rodrigues et al.²⁰ e Guizelini e Amato Neto¹³. A positividade encontrada para ambos os coccídios também foi menor em relação a estudos realizados no Rio de Janeiro por Moura et al.¹⁹, em Santos por Sauda et al.²¹ e em Campinas por Garlipp et al.¹¹ e Baraldi et al.², com positividade para o *Cryptosporidium* sp de 18,2%; 19,1%; 18,0% e 18,6% e para a *I. belli* de 10,1%; 9,9%; 5,4% e 15,7%, respectivamente. No entanto, a ocorrência de *I. belli* na nossa região foi superior à constatada por Wuhib et al.²⁷ entre os pacientes com AIDS e sem diarreia em Fortaleza, de 2,4%.

Tabela 1. Frequência anual de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em amostras de fezes de pacientes HIV positivos. Região de Ribeirão Preto – SP, julho de 1990 a junho de 1997.

Ano	Amostras Examinadas		<i>Cryptosporidium</i> sp		<i>Isospora belli</i>		<i>Cryptosporidium</i> sp e <i>Isospora belli</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%
1990	68	2,0	–	–	01	1,5	–	–
1991	95	2,8	02	2,1	03	3,1	–	–
1992	436	13,1	10	2,3	07	1,6	01	0,2
1993	647	19,4	23	3,5	25	3,9	01	0,1
1994	758	22,7	31	4,1	31	4,1	01	0,1
1995	639	19,1	68	10,6	15	2,3	06	0,9
1996	531	15,9	38	7,1	27	5,1	02	0,4
1997	166	5,0	06	3,6	12	7,2	–	–
TOTAL	3340	100,0	178	5,3	121	3,6	11	0,3

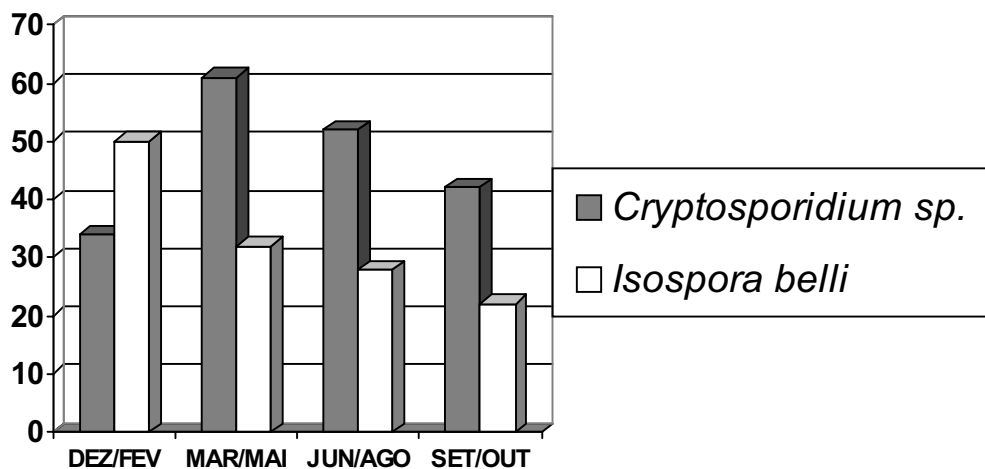


Figura 1. Distribuição de amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* de pacientes soropositivos para o HIV, de acordo com a época do ano. Região de Ribeirão Preto – julho de 1990 a junho de 1997.

As prevalências mais baixas observadas neste estudo talvez possam ser justificadas pela diluição da positividade na amostra estudada, uma vez que não utilizamos a diarreia como parâmetro de seleção, envolvendo pacientes assintomáticos apenas com sorologia positiva para o HIV, mas sem AIDS-doença. Outros fatores que também podem estar envolvidos são o clima seco e os recursos sanitários satisfatórios encontrados na região de Ribeirão Preto. Dados da Fundação SEADE de 1996 mostram que os níveis de abastecimento de água, coleta

de lixo e esgotamento sanitário na região de Ribeirão Preto foram 99,13%, 97,59% e 95,76%, superiores aos do Estado de São Paulo, de 96,39%, 96,15% e 80,63%, respectivamente¹⁰. O clima seco com baixa umidade relativa do ar, associado às condições sanitárias satisfatórias não seriam favoráveis para a transmissão dos oocistos destes coccídios.

Observou-se neste estudo (Figura 1) sazonalidade na ocorrência de infecção por ambos os coccídios. Tzipori²⁴ e mais recentemente Wuhib et al.²⁷ verificaram que a infecção pelo

Cryptosporidium sp é sazonal, ocorrendo mais comumente no verão e durante os meses mais quentes e úmidos do ano. Entretanto, não são conhecidos estudos sobre a sazonalidade da *I. belli*, sabe-se apenas que a sua frequência é maior em áreas tropicais e subtropicais do mundo⁴.

A tendência decrescente no número de amostras examinadas observada nos últimos anos do período estudado (Tabela 1) pode estar relacionada com um melhor estado imunitário dos pacientes devido aos avanços na assistência médica, à terapia antiretroviral e ao monitoramento da progressão da doença através dos testes de carga viral e exames CD₄. Segundo dados da Coordenadoria do Programa Estadual de DST/AIDS de São Paulo, entre 1995 a 1997, houve uma queda de 59% nas taxas de óbitos por AIDS¹⁷. Portanto, é de se esperar uma diminuição da ocorrência das doenças oportunistas nestes pacientes, incluindo a criptosporidiose e a isosporíase. Este fato foi constatado por Guimarães¹² em estudo de nível nacional, que demonstrou tendência de redução na incidência de doenças associadas à AIDS, entre elas as infecções pelos protozoários

Cryptosporidium sp e *I. belli*, em adultos acima de 13 anos de idade, entre 1980 a maio de 1999, especialmente a partir de 1995/96. Este autor aponta como hipóteses para explicar essa redução a introdução da terapia antiretroviral combinada e a busca mais precocemente dos serviços de saúde pelos indivíduos infectados pelo HIV.

Concluindo, esperamos que este estudo possa preencher uma lacuna e contribuir para um melhor conhecimento da criptosporidiose e da isosporíase entre os portadores do HIV na região de Ribeirão Preto. Por fim, frisamos a importância da inclusão de técnicas adequadas na rotina parasitológica dos laboratórios da região, visando a pesquisa destes coccídios.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os pesquisadores científicos Ana Célia S. Mangini e Domingas Maria A. G. V. Torres do Instituto Adolfo Lutz, pelas sugestões e revisão crítica do texto.

RIALA6/885

Capuano, D. M.; Okino, M. H. T.; Bettini, M. J. C. B. Frequency of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* in HIV-seropositives patients in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 11-15, 2001.

ABSTRACT. Among the enteric pathogens that attack patients with the human immunodeficiency virus (HIV) are opportunistic protozoans *Cryptosporidium* spp and *Isospora belli*. The purpose of this investigation was to establish the frequency of cryptosporidiosis and isosporidiosis in HIV seropositives patients in Ribeirão Preto region. From July 1990 to June 1997 in Adolfo Lutz Institute – Ribeirão Preto, 3340 stool samples were examined from 1833 symptomatic and asymptomatic patients, with ages ranging between 10 months and 55 years, attended in Ribeirão Preto AIDS Outpatient Departments. The frequency of these protozoans among all the examined stool samples was 9,3%. We observed 207 (11,3%) patients with these parasites. *Cryptosporidium* spp was identified in 117 (6,4%) patients, *Isospora belli* in 81(4,4%) and 09 (0,5%) patients were infected by both parasites.

KEY WORDS. *Cryptosporidium* spp; *Isospora belli*; AIDS; Ribeirão Preto, SP.

REFERÊNCIAS

1. Agnew, D.G. et al. Cryptosporidiosis in Northeastern Brazilian Children: Association with increased diarrhea morbidity. **J. Infect. Diseases**, 117(3): 754-760, 1998.
2. Baraldi, S.R.; Marques, E.G.L.; Dias, R.M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1): 97-103, 1999.
3. Casemore, D.P. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. **Epidemiol. Infections**, 104: 1-2, 1990.
4. Cimerman, S.; Cimerman, B. Isosporíase. **Laes & Haes**, 104: 154-156, dez96/ jan97.
5. Current, W.L.; Garcia, L.S. Cryptosporidiosis. **Clin. Microbiol. Reviews**, 4(3): 325-358, 1991.
6. De Hovitz, J.A. et al. Clinical manifestation and therapy of *Isospora belli* infection in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **New England J. Med.**, 315(2): 87-90, 1986.
7. DIAS, R.M.D.S. et al. Cryptosporidiosis among patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in the county of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 30(4): 310-312, 1988.
8. Dias, R.M.D.S. et al. Enteroparasitoses em pacientes acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS/SIDA). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 48(1/2): 63-67, 1988.
9. Foudraine, N.A. et al. Improvement of chronic diarrhoea in patients with advanced HIV-1 infection during potent antiretroviral therapy. **AIDS**, 12(1): 35-41, 1998.
10. Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE). Características dos Serviços de Abastecimento de Água, Esgotamento Sanitário e Coleta de Lixo do Estado de São Paulo, 1996, [http://www.seade.gov.br/cgi-bin/homev98/cadastro ksh]. 4 de março 2000.
11. Garlipp, C.R.; Bottini, P.V.; Teixeira, A.T.L.S. The relevance of laboratory of human cryptosporidiosis and other coccidia. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 37(5): 467-469, 1995.

12. Guimarães, M.D.C. Estudo temporal das doenças associadas à AIDS no Brasil, 1980-1999. **Cad. Saúde Públ. (Rio de Janeiro)**, 16(supl. 1): 21-36, 2000.
13. Guizeline, E.; Amato Neto, V. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp nas fezes diarreicas de aidéticos e de crianças e adultos imuno-competentes em São Paulo. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo**, 47(3): 150-152, 1992.
14. Havens, P.L.; Davis, J.P. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, 7(4): 250-257, 1996.
15. Marsall, M.M. et al. Waterborne protozoan pathogens. **Clin. Microbiol. Reviews**, 10(1): 67-85, 1997.
16. Martins, C.A.P.; Guerrant, R.L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **Parasitol. Today**, 2(2): 434-436, 1995.
17. Merck Sharp & Dome. **AIDS – Novos horizontes**. Office Editora e Publicidade Ltda., ano I, nº 1, p.3; 8-9. São Paulo, S.P., 1999.
18. Moreira, E.D. JR. et al. Identificação de Isosporiase em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida em Salvador, BA. **Rev. Soc. Bras. Med. trop.**, 24(1): 61-62, 1991.
19. Moura, H. et al. Enteric parasites and HIV infection; Occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84(4): 527 – 533, 1989.
20. Rodrigues, J.L.N. et al. Prevalência de criptosporidiose na síndrome diarreica do paciente HIV positivo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, 37(2): 79-84, 1991.
21. Sauda, F.C. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **J. Parasitol.**, 79(3): 454-456, 1993.
22. Secretaria de Estado da Saúde. Programa DST/AIDS. Manual de Normas para Indicação e Dispensação de Antiretrovirais para Portadores do HIV/AIDS no Estado de São Paulo. 21p, 1996.
23. Soave, R.; Johnson Jr., W.R. *Cryptosporidium* and *Isospora belli* infections: AIDS commentary. **J. Infec. Diseases**, 157(2): 225-229, 1988.
24. Tzipori, S. Cryptosporidiosis in perspective. **Advances Parasitol.**, 27: 67-129, 1988.
25. Tzipori, S. Cryptosporidiosis: Laboratory investigations and chemotherapy. **Advances Parasitol.**, 40: 187-221, 1998.
26. Vakil, N.B. et al. Biliary cryptosporidiosis in HIV-infected people after waterborne outbreak of cryptosporidiosis in Milwaukee. **New England J. Med.**, 334: 19-23, 1996.
27. Wuhib, T. et al. Cryptosporidial and Microsporidial infections in Human Immunodeficiency Virus–Infected patients in Northeastern Brazil. **J. Infec. Diseases**, 170: 494-497, 1994.

Recebido em 06/07/2000; Aprovado em 08/11/2000

Caracterização química parcial das sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.¹

Partial chemical characterization of *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. seeds.

Maria Isabel VALLILO^{2*}
Mário TAVARES³
Sabria AUED-PIMENTEL³
Maria Lima GARBELOTTI³

RIALA6/886

Vallilo, M. I. et al. Caracterização química parcial das sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.¹
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 60(1):17-22,2001

RESUMO. Estudou-se a composição química das sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., pertencente à família Leguminosae-Faboideae (= Papilionoideae). Os frutos procederam do Parque Estadual do Morro do Diabo, Município de Teodoro Sampaio, SP. A determinação de umidade, cinzas e lipídios foi realizada por métodos gravimétricos; protídios, pelo processo digestão Kjeldahl; fibras, pelo método enzimático-gravimétrico da AOAC, modificado por Lee; elementos inorgânicos, pela técnica da espectrometria de emissão atômica acoplada ao plasma indutivamente (ICP-AES) e os ácidos graxos, por cromatografia em fase gasosa. As sementes revelaram altos teores de lipídios (26,8 g/100g), protídios (25,9 g/100g) e fibras alimentares (18,4 g/100g). Na fração oleosa foram identificados predominantemente os ácidos palmítico (11,65%), oléico (56,0%) e linolênico (12,9%), ácido graxo essencial da série ômega-3. As sementes apresentaram conteúdos elevados para P (0,214 g/100g), Mg (0,135 g/100g) e K (0,458 g/100g) e concentrações menores a nível de µg/g para Al (47 µg/g), Zn (33 µg/g) e Fe (23 µg/g), não tendo sido detectados metais pesados (Cd, Ni, Pb). Os resultados favorecem o uso das sementes para o enriquecimento de rações e/ou produtos alimentícios, no entanto, sugere-se a pesquisa de rotenona, referida como substância tóxica, presente nas folhas e raízes do gênero *Lonchocarpus*.

PALAVRAS-CHAVE. Leguminosae; *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.; sementes; composição química; ácidos graxos; elementos inorgânicos.

INTRODUÇÃO

Dentre todas as famílias botânicas estudadas, as leguminosas como o feijão e a soja contribuem com um maior potencial para a produção de proteína e óleos vegetais comes-

tíveis. São utilizadas como alimento humano e animal não só as sementes, mas também os legumes, folhagens, raízes e as flores de algumas de suas espécies¹⁵. Nesse contexto, Lago et al.¹³ estudaram, dentre outras espécimes da Amazônia, a *Parkia gigantocarpa* Ducke e *Parkia oppositifolia* Spruce, da família

¹ Apresentado no VII Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos, Campinas – SP, 2000

² Instituto Florestal, Divisão de Dasonomia, Seção de Madeiras e Produtos Florestais

³ Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Diretoria de Serviço de Alimentos

* Endereço para correspondência: Instituto Florestal, Divisão de Dasonomia, Seção de Madeiras e Produtos Florestais, Rua do Horto, 931, CEP 02377-000, São Paulo, SP, e-mail: vallilo@uol.com.br

Leguminosae, subfamília Mimosácea, de nomes vulgares visgueiro e arara, respectivamente. Foram consideradas espécies ricas em proteínas (alto teor de triptofano), além de apresentar de 12 a 15% de ácidos graxos de elevado peso molecular (araquídico, C20:0 e behênico, C22:0) e um conteúdo aproximado de 40% em C18:2 (ácido linoléico).

Estudos realizados por Vallilo et al.²⁷ com sementes de *Dipteryx alata* Vog., subfamília Faboideae, revelaram significativo valor calórico (560,73 kcal/100g), lipídico (41,65%) e protéico (23,45%). O óleo apresentou o ácido oleico (C18:1) como principal componente (50,17%), seguido de linoléico (30,70%). A soma de ambos confere ao óleo alto grau de insaturação, similar ao azeite de oliva⁶.

A espécie *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. conhecida popularmente em algumas regiões do Brasil como embira-de-sapo, feijão-cru (Paraná), timbó (Minas Gerais) e rabo-de-bugio ou de macaco, pertence à família Leguminosae-Faboideae (= Papilionoideae)^{3,16}. Sua ocorrência se dá desde o Mato Grosso do Sul, passando por Minas Gerais e estendendo-se até o Rio Grande do Sul, mas destaca-se principalmente na floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná¹⁶.

A subfamília Faboideae (= Papilionoideae) abrange 482 gêneros e 12.000 espécies aproximadamente. É considerado o grupo mais evoluído entre as Leguminosae, sendo mais difundido em regiões de clima temperado³.

A espécie *L. muehlbergianus* é considerada uma planta decídua, heliófita. Apresenta larga mas descontínua e pouco expressiva dispersão, preferindo solos profundos, férteis e úmidos. Floresce de outubro a janeiro. A maturação de seus frutos ocorre nos meses de julho a agosto, sendo que 1 Kg dos mesmos podem produzir aproximadamente 1.160 sementes¹⁶.

Com relação à composição química dessa espécie, pouco se sabe. No entanto, é relatada na literatura a presença nas folhas e raízes de algumas espécies do gênero *Lonchocarpus* (*L. utilis* e *L. urucu*), de um isoflavonóide biologicamente ativo, a rotenona. Essa substância tem efeito narcótico, sendo utilizada por indígenas ou nativos na captura de peixes e também empregada comercialmente há muitos anos como inseticida^{20,21,26}.

Considerando a escassez de dados sobre a composição química e o valor nutricional das sementes de *L. muehlbergianus*, este trabalho teve como objetivo determinar a sua composição centesimal, de elementos inorgânicos e de ácidos graxos, visando contribuir para o conhecimento do seu valor alimentício e/ou energético, bem como para os estudos de conservação e armazenamento dessa semente.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Procedência

Os frutos, na forma de vagens (40 kg), foram colhidos no mês de setembro de 1999, por técnicos do Instituto Florestal no Parque Estadual do Morro do Diabo, Município de Teodoro Sampaio, Estado de São Paulo (Figura 1). Em seguida, foram transferidos à seção de Silvicultura daquele Instituto para o

beneficiamento, resultando 14,850 kg de sementes, as quais foram submetidas a teste de germinação e posterior armazenamento em câmara fria (temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$).

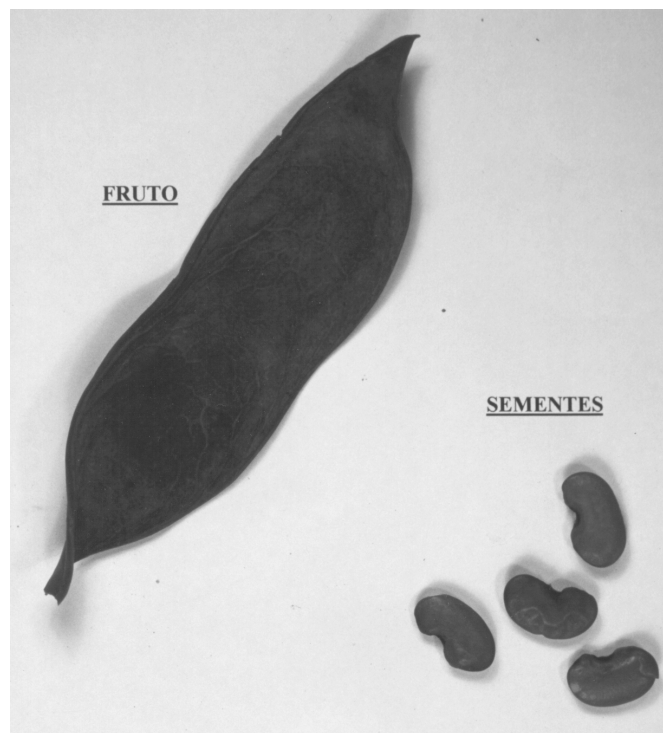


Figura 1. Fruto e sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Foto: Dr. João Batista Baitello).

2. Tratamento da amostra

As sementes (100 g) foram trituradas e homogeneizadas através de multiprocessador doméstico. O material moído foi submetido às análises químicas, conforme metodologia descrita a seguir.

A composição centesimal (umidade, resíduo mineral fixo, lipídios e protídios) foi efetuada segundo as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"¹¹, sendo os carboidratos calculados por diferença. Foi empregado o fator de 6,25 para a conversão do nitrogênio em protídios. O valor calórico foi calculado utilizando-se os seguintes fatores: 9, para lipídios; 4, para protídios e 4, para carboidratos⁴.

A determinação das fibras alimentares seguiu o método enzimático-gravimétrico da AOAC - Association of Official Analytical Chemists, modificado por Lee et al.¹⁴.

Para a análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, o óleo foi extraído a frio das amostras, segundo o método modificado de Stansby e Lemon²⁵. A conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos foi realizada conforme os métodos descritos nas normas acima mencionadas.

Os ésteres metílicos foram analisados em cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC-17A, com detector de ionização

de chama. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88, de 50 metros, com diâmetro interno de 0,25 cm e espessura do filme de 0,20 mm. Foram obedecidas as seguintes condições de operação: temperatura programada da coluna, 80 a 220°C (5°/min.); temperatura do injetor, 230°C; temperatura do detetor, 240°C; gás de arraste, hidrogênio; velocidade linear de 40 cm/s; razão de divisão da amostra 1:50. Os ácidos graxos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção dos padrões puros de metil ésteres de ácidos graxos e das amostras. A quantificação foi feita por normalização de área.

O índice de iodo da fração oleosa (lipídios) foi calculado pelo método da A. O.C.S. Cd 1c-85¹.

Para a determinação dos elementos inorgânicos, solubilizou-se as amostras utilizando o seguinte procedimento modificado, a partir do método descrito por Vallilo et al.²⁷: tratou-se 1 g da amostra moída com 10 mL de HNO₃ concentrado p.a.. Deixou-se em repouso por cerca de 48 horas. Em seguida, adicionou-se 1 mL H₂O₂ a 30% em volume e aquecimento em banho-maria até solubilização completa da amostra ou até a solução ficar clara. O solubilizado, depois de frio, foi filtrado em papel quantitativo e recolhido em um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi aferido com água destilada e desionizada. A solução foi acondicionada em frasco de polietileno e mantida sob refrigeração.

Os elementos químicos (K, Mg, Ca, P, Al, Fe, Cu e Zn) foram caracterizados e quantificados, nas amostras solubilizadas, pela técnica da espectrometria de emissão atômica acoplada ao plasma indutivamente (ICP-AES), no equipamento Perkin-Elmer 400, operando nas seguintes condições estabelecidas conforme recomendação do fabricante do equipamento: frequência de 40 MHz, pressão do gás argônio para o equipamento de 70-75 psig, pressão do gás argônio para o nebulizador de 3,0 psig (0,8L/min) e velocidade de introdução da amostra de 1,0 mL/min. A leitura dos elementos foi feita nos seguintes comprimentos de onda (λ_s) em nm: $\lambda_K=404,723$; $\lambda_{Mg}=285,210$; $\lambda_{Ca}=317,940$; $\lambda_P=214,902$; $\lambda_{Al}=236,902$; $\lambda_{Fe}=239,902$; $\lambda_{Cu}=324,744$; $\lambda_{Zn}=334,503$, através de curvas analíticas, elaboradas com soluções de trabalho multielementares preparadas em concentrações de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em HNO₃ a 1% de cada elemento constituinte, por diluição das soluções-estoque.

Os limites de detecção para os elementos químicos ora estudados são os mesmos propostos em trabalho anterior com frutos de *Lecythis pisonis* Camb.²⁸.

Todas as análises foram feitas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal das sementes estudadas encontra-se descrita na Tabela 1, onde se observa praticamente os mesmos teores para os lipídios (26,8 \pm 0,5 g/100g) e os protídios (25,9 \pm 0,2 g/100g).

Esses resultados tornam-nas bastante promissoras como fonte oleaginosa e protéica e, confirma as afirmações feitas por

Tabela 1. Composição centesimal das sementes de *L. muehlbergianus* Hassl., expressa em g/100g de material moído*.

Determinações	Média \pm σ (g/100g)
Umidade a 105°C	10,536 \pm 0,006
Resíduo mineral fixo a 550°C	2,23 \pm 0,08
Lipídios	26,8 \pm 0,5
Protídios	25,9 \pm 0,2
Carboidratos totais**	16,0 \pm 0,7
Fibras alimentares***	18,4 \pm 0,3
Valor calórico em Kcal/100g	409 \pm 2

* média de 03 determinações.

** calculado por diferença.

*** polissacarídios (exceto amido) e ligninas.

Popinigis²², de que altos teores de proteínas são encontrados em sementes oleaginosas, enquanto que valores baixos se associam às albuminosas.

Do ponto de vista energético, a maior contribuição para o elevado valor calórico (409 kcal/100g) deve-se praticamente aos teores lipídicos e protéicos.

Segundo a definição mais aceita na atualidade², as fibras alimentares são constituídas de polissacarídios (exceto amido) e ligninas, que não são digeridas e absorvidas pelo intestino delgado humano¹⁰. O valor encontrado (18,4 g/100 g), embora relativamente elevado, está abaixo da faixa de ingestão diária aceitável recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que é de 27 a 40 g/dia¹⁹. A sua ingestão em quantidades adequadas colabora para o funcionamento do trato intestinal. Estudos epidemiológicos sobre os possíveis efeitos benéficos da fibra têm demonstrado o seu papel na diminuição e prevenção de doenças gastrointestinais²⁴.

Comparando o valor obtido com os encontrados na literatura, verificou-se que está próximo aos dos feijões crus do tipo branco seco (18,1 g/100g)⁸ e lima (19,0 g/100g)¹⁷, e supera o da soja crua (4,2 g/100g)⁹. Essa constatação permite sugerir o emprego da semente crua ora estudada na elaboração de ração animal.

A alta porcentagem de óleo encontrada, bem como a sua composição em ácidos graxos (Tabela 2), o qualifica para ser utilizado como matéria prima na indústria oleoquímica e como óleo vegetal na alimentação humana. A composição em ácidos graxos revelou a predominância do ácido palmítico (C16:0) dentre os ácidos saturados e, do ácido oléico (C18:1) dentre os insaturados, seguido do ácido linoléico (C18:2), ácido graxo essencial da série ômega-6. Os três se enquadram na faixa estabelecida pelo regulamento técnico brasileiro⁶ para o azeite de oliva, o mesmo não ocorrendo no caso do índice de iodo calculado, em função, principalmente, do alto teor encontrado de ácido linolênico (C18:3), também essencial, da série ômega-3.

Deve ser enfatizado que o teor de ácido linolênico obtido ($12,9 \pm 0,9\%$) foi igual ou superior aos referidos para os óleos de soja e de canola, cujas faixas de concentração variam de 4,0 a 11,0% e de 5,0 a 13,0%, respectivamente⁶, o que reforçaria o emprego do óleo de *L. muehlbergianus* também para o enriquecimento de rações e produtos alimentícios.

Segundo Hammond, Thro e Mounts apud Saastamoinen et al.²³, os ácidos linoléico e linolênico são ácidos graxos essen-

Tabela 2. Composição de ácidos graxos do óleo das sementes de *L. muehlbergianus* Hassl., expressos em % (p/p) em estéres metílicos*.

Ácidos graxos	Média ± σ (g/100g)
C16:0 (palmítico)	11,65 ± 0,09
C18:0 (esteárico)	5,8 ± 0,1
C18:1 (oléico)	56,0 ± 0,8
C18:2 (linoléico)	10,9 ± 0,2
C18:3 (linolênico)	12,9 ± 0,9
C20:0 (araquídico)	0,94 ± 0,05
C20:1 (eicosaenóico)	0,147 ± 0,009
C22:0 (behênico)	0,56 ± 0,05
C24:0 (lignocérico)	0,17 ± 0,02
Total AGS	19,1 ± 0,3
Total AGI	80,0 ± 0,3
N.I.	0,75 ± 0,04
Índice de iodo calculado.	101 ± 2

* - média de 03 determinações.

AGS - ácidos graxos saturados.

AGI - ácidos graxos insaturados.

N.I. - não identificados.

ciais na nutrição de mamíferos e, o ácido palmítico aumenta a estabilidade do óleo contra a peroxidação, o mesmo não ocorrendo com o ácido linolênico, que causa instabilidade do óleo. A peroxidação natural do ácido linolênico resulta em hidroperóxidos que são tóxicos aos mamíferos e causa alteração no sabor e aroma do óleo.

Estudos feitos com sementes de *Pinus* por Kaloyeras¹² demonstram que existe uma relação entre a rancidez do óleo e a perda do poder germinativo da semente. Mirov apud Kaloyeras¹² atribui a esse fato à presença de ácidos graxos insaturados, principalmente do ácido linoléico.

Analisando sob esse ponto de vista, podemos inferir que o alto grau de insaturação encontrado no óleo (75,56% p/p) confere-lhe uma baixa estabilidade química, tornando-o mais suscetível à oxidação e a problemas de conservação e germinação de sementes. Nesse contexto, sugere-se estudos sobre a presença de antioxidantes naturais, como os tocoferóis, e a influência dos ácidos graxos polinsaturados no poder de germinação e conservação da *L. muehlbergianus*.

Por outro lado, comparando os dados obtidos com os estudos feito por Vallilo et al.²⁷ com as sementes de *Dipteryx alata* Vog. (Leguminosae-Faboideae), verificou-se diferenças tanto na composição centesimal das sementes como no perfil dos ácidos graxos do óleo. Este comportamento já era esperado, visto que são espécimes da mesma família botânica, mas de gêneros diferentes.

Complementando este estudo, determinou-se a composição dos minerais (Tabela 3), que, na maioria das vezes, também são encontrados em outras partes da planta.

Tabela 3. Composição dos elementos inorgânicos nas sementes de *L. muehlbergianus* Hassl., expressos em g/100g e µg/g de material moído*.

Elementos	Média ± σ (g/100g)
K	0,458 ± 0,005
P	0,214 ± 0,005
Mg	0,135 ± 0,003
Ca	0,061 ± 0,001
	(µg/g)
Al	47 ± 3
Zn	33 ± 3
Fe	23 ± 3
Cu	10,0 ± 0,1

* - média de 03 determinações.

Verificou-se que dentre os 8 elementos determinados, 7 são considerados essenciais para a planta, exercendo funções plásticas, eletrolíticas e catalíticas nas células e tecidos vegetais. Os elementos K, P Mg e Ca foram encontrados na faixa de macronutrientes (0,061 a 0,458 g/100g) e Al, Zn, Fe e Cu em concentrações menores, na faixa dos micronutrientes (10,0 a 47 µg/g). Dentre os elementos determinados, o Al é considerado tóxico para a planta, na faixa de concentração equivalente a 0,1-30 mg/L. No homem, há indícios de uma correlação entre a sua presença e a doença de Alzheimer¹⁸, porém a legislação brasileira relativa a contaminantes químicos em alimentos não estabelece limites máximos para alumínio⁵.

À exceção do potássio e do alumínio, os demais minerais constam das tabelas adotadas pelo Ministério da Saúde, referentes à ingestão diária recomendada (IDR) de nutrientes para adultos, lactentes, gestantes e crianças⁴.

Os micronutrientes minerais cádmio, chumbo e níquel, considerados tóxicos, não foram quantificados por estarem abaixo do limite de detecção estimado pelo aparelho, ou seja, 0,027 mg/L, 0,042 mg/L e 0,010 mg/L, respectivamente, podendo-se admitir a sua ausência nas amostras analisadas.

Comparando-se os dados obtidos com os encontrados nas sementes de *Dipteryx alata*²⁷, observou-se que, com exceção do Zn, as sementes de *L. muehlbergianus* absorvem e/ou concentram valores menores de nutrientes inorgânicos. Vários fatores podem explicar esse comportamento, como: acidez

do solo, disponibilidade dos elementos químicos na solução do solo, fisiologia e fatores genéticos de cada planta.

CONCLUSÕES

As sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* mostraram-se promissoras quanto aos teores de lipídios, protídios e fibras alimentares, podendo se constituir numa boa fonte calórica para dietas.

Quanto à composição em ácidos graxos do óleo de *L. muehlbergianus*, destaca-se o alto teor de ácido linolênico, ácido graxo essencial da série ômega-3 e o valor relativamente alto de

fibra alimentar, favorecendo o uso das sementes para o enriquecimento de rações e/ou alimentos industrializados.

Os valores obtidos para os elementos inorgânicos enquadram-se dentro dos níveis necessários para uma dieta balanceada.

Em função do alto grau de insaturação do óleo sugere-se estudos quanto à presença de antioxidantes naturais e a influência dos ácidos graxos insaturados nos processos de conservação e de germinação dessas sementes.

Devido à possível presença de rotenona, substância tóxica, relatada em raízes e folhas do gênero *Lonchocarpus*, sugere-se também a pesquisa desse metabólito nas sementes.

RIALA6/886

Vallilo, M. I. et al. Partial chemical characterization of *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. seeds. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):17-22, 2001.

ABSTRACT. A partial chemical characterization of *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. seeds (Leguminosae-Faboideae family) was carried out. The fruits were obtained from State Park "Morro do Diabo", Teodoro Sampaio, SP, Brazil. Moisture, ash and lipid determination followed the gravimetric methods; that of protein was done according to Kjeldahl digestion process and the dietary fiber, the A.O.A.C. enzymatic-gravimeter method, modified by LEE *et al.* Inorganic elements and fatty acids were determined through ICP-AES and GC, respectively. The seeds showed a high lipid (26,8 g/100g), protein (25,9 g/100g) and dietary fiber (18,4 g/100g) content. The major fatty acids components of the oily fraction were palmitic (11,65%), oleic (56,0%) and linolenic (12,9%), an essential ω -3 fatty acid. Among the inorganic elements, high levels of P (0,214 g/100g), Mg (0,135 g/100g), K (0,458 g/100g) and low concentrations of Al (47 mg/g), Zn (33 mg/g) and Fe (23 mg/g) were found. The results favour the use of the seeds for enrichment of rations and/or food products, nevertheless it suggested an investigation about rotenone, reported as a toxic substance present at leaves and roots of the *Lonchocarpus* genus.

KEY WORDS. Leguminosae, *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. seeds, chemical composition, fatty acids, inorganic elements.

REFERÊNCIAS

1. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, A.O.C.S., 1990. (A.O.C.S. Recommended Practice C.d. 1c-85).
2. Asp, N.G. et al. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **J. Agric. Food Chem.**, 31: 476-482, 1982.
3. Barroso, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa. 1984, v.2. 377p.
4. Brasil, Leis, decretos, etc. Portaria nº 33/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 30 mar. 1998. Seç. I, Nº 60-E, p. 5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR (Ingestão Diária Recomendada) para as vitaminas, minerais e proteínas.
5. Brasil, Leis, decretos, etc. Portaria nº 695/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 24 set. 1998. Seç. I, nº 183-E, p. 3. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos".
6. Brasil, Leis, decretos, etc. Resolução nº 482/99 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial**, Brasília, 13 out. 1999. Seç. I, nº 196-E, p. 82-87. Aprova o Regulamento Técnico referente a Óleos e Gorduras Vegetais, constante do anexo desta Resolução. (Anexo 13: Azeite de oliva).
7. De Angelis, R.C. **Fisiologia da nutrição: fundamentos para nutrição e desnutrição**. São Paulo, EDART, 1977, v. 1, cap. 4, p. 44.
8. Favier, J.C. **Repertório geral dos alimentos: tabela de composição**. 2^a ed. São Paulo, Roca, 1999, p. 572.
9. Fundação Brasileira de Geografia e Estatística (IBGE). **Estudo nacional da despesa familiar (ENDEF)**. Rio de Janeiro, 1977. [Dados preliminares, t. 1, p. 36].
10. Hernández, T.; Hernández, A.Y.; Martínez, C. Fibra alimentaria: concepto, propiedades y métodos de análisis. **Rev. Alimentaria**, 1(6): 19-29, 1995.
11. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3^a ed. São Paulo, IMESP, 1985, p. 22, 27, 28, 42, 43, 44, 45, 266.
12. Kaloyeras, S.A. Rancidity as a factor in the loss of viability of pine and other seeds. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 35: 176-179, 1958.
13. Lago, R.C.A. et al. Estudos preliminares das sementes e do óleo de cinco espécies da Amazônia. **Acta Amazonica**, 16/17 (nº único): 369-376, 1986/87.
14. Lee, S.C; Prosky, L.; Devries, J.W. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method,

- MÊS-TRIS Buffer: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, 75: 395-416, 1992.
15. Lewis, G.P. **Legumes of Bahia**. Kew. Richmond, Publications Department Royal Botanic Gardens, 1987. 369p.
16. Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Plantarum, 1992. 351p.
17. Mahan, L.K.; Stump, S.E. **Krause-Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9ª ed. São Paulo, Roca, 1999. p. 1097.
18. Markert, B. Presence and significance of naturally occurring chemical elements of the periodic system in the plant organism and consequences for future investigations on inorganic environmental chemistry in ecosystems. **Vegetatio**, 103: 1-30, 1992.
19. Marsiglia, D.A.P.; Garbelotti, M.L. **I Curso de fibra alimentar: teórico e prático**. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1999. P. 4.
20. Matsumura, F. **Toxicity of insecticides**. New York, Plenum Press, 1985. 598p.
21. Mors, W.B.; Rizzini, C.T. **Useful Plants of Brazil**. San Francisco, Holden-Day, 1966. p. 97-98.
22. Popinigis, F. **Fisiologia da semente**. 2ª ed. Brasília, Agiplan, 1985. 289p.
23. Saastamoinen, M.; Kumpulainen, J.; Nummela, S. Genetic and environmental variation in oil content and fatty acid composition of oats. **Cereal Chem.**, 66(4):269-300, 1989.
24. Silva, C.R.; Silva, H.C.; Dutra de Oliveira, J.E. Conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina em dieta hospitalar hipocalórica. **Alim. Nutr.**, 2:65, 71, 1990.
25. Stansby, M.E.; Lemon, J.M. Quantitative determination of oil in fish flesh. **Ind. Eng. Chem.**, 9(7): 341-343, 1937.
26. The Merck Index. **The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. Budavari, S. editor. 11th ed. Rahway, Merck & Co., 1989. p. 1314-1315.
27. Vallilo, M.I.; Tavares, M.; Aued-Pimentel, S. Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) – Caracterização do óleo da semente. **Rev. Inst. Flor.**, 2(2): 115-125, 1990.
28. Vallilo, M.I. et al. *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chem.**, 66: 197-200, 1999.

Recebido em 03/08/2000; Aprovado em 07/12/2000

Estudo do processo de refino do óleo de pescado

Study of fish oil refining process

Marcilio M. MORAIS^{1*}

Luiz A. de A. PINTO²

Sheila C. A. ORTIZ³

Valéria T. CREXI³

Rodrigo de L. da SILVA³

Janaína D. da SILVA⁴

RIALA6/887

Moraes, M.M. et al. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 23-33, 2001

RESUMO. No presente trabalho realizou-se um estudo do processo de refino de óleo de pescado, determinando-se através de um Planejamento Experimental Fatorial as variáveis que influenciam significativamente as etapas de neutralização e branqueamento. O óleo bruto de pescado foi tratado com ácido fosfórico 85%, neutralizado com hidróxido de sódio 20% p/p em excesso, lavado com água quente e seco sob vácuo, sendo branqueado com substâncias adsorventes, e filtrado. Na etapa de neutralização obteve-se um óleo com Índice de Peróxidos de 2,1 mEq/Kg e 0,04% de Ácidos Graxos Livres, na faixa de 40°C e 4,0% de excesso de NaOH 20%, sendo a temperatura e o excesso de NaOH, as variáveis de principal influência no processo. No estudo da etapa de branqueamento foi utilizado um planejamento experimental fatorial completo (2^k), tendo como parâmetros a temperatura, o tempo de retenção, a %Adsorvente e a %(Carvão/Adsorvente), sendo que estes dois últimos influenciaram significativamente na cor Lovibond e no Índice de Peróxidos do óleo clarificado. Os melhores resultados para a cor Lovibond (30 Amarelo e 1,24 Vermelho) e para o Índice de Peróxidos (3,93 mEq/Kg) do óleo clarificado foram encontrados nas faixas de 70°C e tempo de 20 minutos, com 5,0% de adsorvente e 10,0% de (Carvão/Adsorvente).

PALAVRAS-CHAVE. Óleo de pescado; refino; farinha de pescado; planejamento experimental.

INTRODUÇÃO

A produção de farinha de pescado é uma das principais formas de aproveitamento dos resíduos das plantas de processamento de pescado, embora a farinha também possa ser

produzida a partir de peixes inteiros. É muito utilizada para alimentação animal, sendo uma fonte de proteínas de alta qualidade. O óleo de pescado é extraído industrialmente a partir de sua elaboração, sendo submetido a processos hidrotérmicos e mecânicos, sendo que essas operações fornecem um óleo bruto de baixa qualidade^{17,22}.

¹ Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande, RS - Núcleo de Engenharia Química e de Alimentos (NUCLEAL) – Departamento de Química

² Doutor em Engenharia Química

³ Alunos do Curso de Engenharia de Alimentos

⁴ Aluna do Curso de Engenharia Química

* Endereço para correspondência: Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475. Caixa Postal 474. CEP: 96201-900 – Rio Grande – RS.
E-mail: mealmarc@zipmail.com.br

No Brasil, este óleo é usado basicamente em curtumes, na fabricação de tintas e vernizes, como lubrificante, impermeabilizante e outros¹⁵. O óleo de pescado contém os mesmos tipos de ácidos graxos que outros óleos e gorduras, diferindo apenas em seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, podendo ser benéfico à saúde humana⁴. Entretanto, necessita ser purificado para ser utilizado de maneira mais nobre, como na alimentação humana, atuando na redução de problemas de trombose coronária relacionada ao colesterol^{5,15}.

As indústrias locais de Rio Grande, RS produzem o óleo bruto, proveniente do processamento da farinha de pescado, sendo que este necessita de técnicas adequadas de refino, a fim de poder ser aproveitado em ácidos graxos para fins alimentícios ou farmacêuticos.

Como o óleo bruto de pescado contém os mesmos tipos de compostos ou impurezas presentes em outros óleos e gorduras brutos, destinados para fins comestíveis, estas substâncias podem ser removidas pelos mesmos processos que são utilizados para os óleos vegetais^{4,17}.

Dentre os tipos de refino de óleos existentes, o refino químico permite o processamento de óleo de qualquer natureza, mesmo com alto teor de fosfatídios, como é o caso do óleo de pescado¹⁹. O refino químico ou alcalino inclui a degomagem, neutralização e lavagem, clarificação (branqueamento e filtração) e desodorização.

A degomagem visa a remoção, eliminação ou inativação de fosfolípidos (também chamados de fosfatídios) e substâncias afins, além da eliminação de outras impurezas, como sabões e íons metálicos^{6,8,13,19}.

Na etapa de neutralização, os ácidos graxos livres são neutralizados por solução aquosa de álcali em excesso, e eliminados com hidratação^{9,13,14,19}. O álcali mais usado é a soda cáustica, por ser mais efetivo na descoloração do que outros álcalis, reduzindo o conteúdo de ácidos graxos livres do óleo neutralizado até níveis entre 0,01-0,03%^{14,19}.

Na lavagem de óleo de pescado neutralizado, pode-se aquecê-lo a 88°C, e se adicionar 10-20% de água quente (85-90°C), separando-se os resíduos de processo por centrifugação ou decantação⁴. Para o posterior branqueamento do óleo, este deve estar seco, uma vez que esta etapa é mais efetiva quando o teor de umidade estiver em torno de 0,1%. A secagem pode ser realizada, aquecendo-se o óleo neutralizado até 80-90°C, sob vácuo de 30 mmHg¹².

O óleo a ser branqueado é colocado em contato com materiais adsorventes (terras neutras ou ativadas e carvões ativos) a fim de haver a remoção de pigmentos, produtos de oxidação, metais e outros^{10,19}. A temperatura, a quantidade de adsorvente, o tempo de contato, a agitação, a pressão e o tipo de adsorvente são parâmetros de processo muito importantes a serem controlados^{7,20,23}. Os critérios de acompanhamento de qualidade no processo de branqueamento são normalmente a cor Lovibond, o índice de peróxidos e o índice de anisidina. Para a filtração pode-se utilizar os coadjuvantes de filtração como as terras de diatomácea, após o branqueamento, a fim de aumentar a filtrabilidade do líquido a ser filtrado^{16,19}.

A desodorização do óleo clarificado consiste em uma destilação em corrente de vapor, sob pressão reduzida (1,0-8,0 mmHg abs) e temperatura elevada (200-240°C), dos ácidos graxos livres, componentes voláteis e produtos de degradação térmica (peróxidos e compostos secundários da oxidação). Neste processo, deve-se obter um óleo desodorizado com um teor de ácidos graxos livres menor do que 0,02-0,04% expressos como ácido oléico, praticamente inodoro e insípido, com estabilidade oxidativa máxima¹⁹.

Os experimentos de refino foram realizados através de um planejamento de experimentos. Neste procedimento, alterações propositas são feitas nas variáveis a serem estudadas em um processo, a fim de que se possa avaliar as possíveis alterações sofridas pela variável resposta, bem como as razões destas alterações²¹. Os experimentos fatoriais 2^K (variáveis em dois níveis de variação) são muito utilizados nos estágios iniciais dos experimentos fornecendo os dados para se ter o conhecimento dos principais fatores que exercem efeito significativo na resposta, bem como podem fornecer também a faixa de operação de um processo¹¹.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o processo de refino de óleo de pescado, através da utilização das técnicas de refino de óleos, caracterizando a matéria-prima e os produtos obtidos em cada etapa do processo. Outro objetivo do trabalho foi estudar as variáveis que influenciam nas etapas de neutralização e branqueamento através de um Planejamento Experimental Fatorial, visando obter as condições ótimas de processo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Matéria-Prima: para a realização dos experimentos, foi utilizado óleo bruto de pescado (cerca de 6 litros) proveniente da indústria PESCAL S.A, localizada no município de Rio Grande, RS. Este foi coletado diretamente na linha de produção de farinha de pescado, a partir de resíduos do processo de filetagem de pescado. Estes resíduos eram compostos principalmente de vísceras, cabeças e ossos de peixes de várias espécies.

2. Equipamentos: nas diferentes etapas do processo (degomagem, neutralização e branqueamento), foi utilizado um tanque aquecido e submetido à agitação, constituído de um balão tribulado revestido com papel alumínio. A energia térmica e a agitação foram fornecidas por um agitador magnético com aquecedor, sendo que o tanque possuía entrada para a injeção de vácuo, fornecido por uma bomba de alto vácuo, e uma saída conectada a um condensador, a fim de remover a umidade do sistema. Um funil de decantação foi usado para a realização de separação óleo-água, durante a operação de lavagem, sendo que este equipamento foi também revestido com papel alumínio. Para separação dos sólidos do óleo foi utilizado um filtro centrífugo. A filtração do óleo branqueado foi realizada em um filtro-torta de funcionamento a vácuo, com prévia formação de pré-capa.

3. Metodologia Analítica: para o óleo bruto e o obtido em cada etapa do refino (neutralização e branqueamento) foram determinados os seguintes parâmetros: Ácidos Graxos Livres (AGL), Índice de Iodo (II), Índice de Peróxidos (IP), Índice de Saponificação (IS), empregando as metodologias da American Oil Chemists' Society, AOCS (1980)¹, e os métodos adaptados por Windsor e Barlow (1984)²² para óleo de pescado. Além destes parâmetros, foi determinada a cor do óleo neutralizado e seco, e dos produtos obtidos após a clarificação, segundo o método Lovibond²².

4. Procedimento Experimental: o óleo bruto de pescado, após ser obtido da indústria, foi processado conforme o diagrama de blocos da Figura 1.

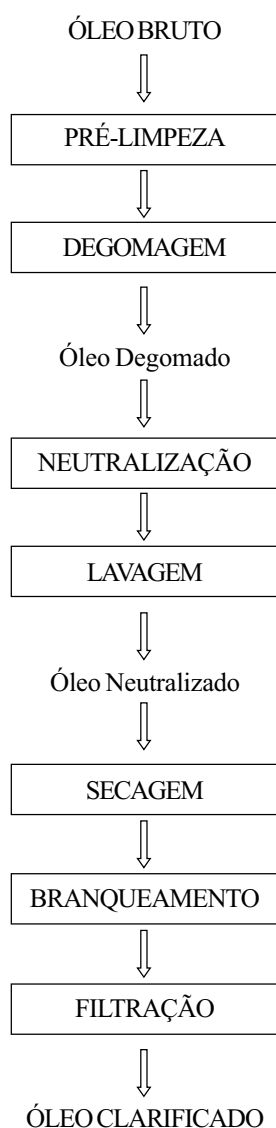


Figura 1. Diagrama de blocos do procedimento experimental para a clarificação do óleo bruto de pescado

4.1. Pré-Limpeza: a pré-limpeza do óleo bruto foi realizada em filtro centrífugo, tendo como principal objetivo a retirada dos sólidos em suspensão.

4.2. Degomagem: esta foi realizada mediante a adição de ácido fosfórico concentrado (85% p/p), a uma quantidade de 1,0% p/p, com relação à massa de óleo, sendo a temperatura de processo utilizada de 80°C (± 3,0°C), com um tempo de retenção de 30 minutos. O processo foi conduzido sob vácuo (600 mmHg), com agitação vigorosa.

4.3. Neutralização: o óleo foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio 20% p/p, sob diferentes condições de temperatura e excesso de solução. O processo foi efetuado sob vácuo de 420 mmHg, com agitação vigorosa, por um tempo de 20 minutos. Após este tempo, cessou-se a agitação e elevou-se a temperatura até 80°C, a fim de facilitar a separação do óleo e da borra. A mistura foi resfriada e a fração oleosa foi separada com o auxílio do filtro centrífugo.

4.4. Lavagem: o processo transcorreu através da adição de água ao óleo neutralizado, à temperatura de 90-95°C, com subsequente agitação da mistura por cinco minutos, sob vácuo de 440 mmHg. Esta foi resfriada e submetida à decantação em funil de vidro, até a separação completa das fases aquosa, sólida (borra) e oleosa.

4.5. Secagem: a temperatura de secagem variou de 40 até 90°C, com uma pressão de vácuo de 450 até 720 mmHg, por um tempo de 10 minutos, com agitação branda, sendo que o óleo foi resfriado logo a seguir.

4.6. Branqueamento: o processo de branqueamento ocorreu através da adição de substâncias adsorventes (terra ativada Fulmont Première e carvão ativo) ao óleo seco, sob vácuo de 660 mmHg com agitação lenta, sob diferentes condições de temperatura, tempo de retenção, quantidade de adsorvente e mistura de adsorventes.

4.7. Filtração: para a operação de filtração do óleo branqueado, foi realizada uma pré-capa em filtro com formação de torta, através de uma suspensão 1,1% p/p de terra diatomácea do tipo *celite supercell* a uma quantidade de 0,5 Kg por m² de área filtrante. Na filtração do óleo de pescado, o tempo de filtração foi de 5,0 minutos para um volume inicial de 60 mL, sob vácuo de 280 a 500 mmHg. Nos primeiros 2,5 minutos quase todo óleo já estava filtrado.

5. Metodologia Estatística: os experimentos de neutralização e branqueamento do óleo de pescado foram ordenados segundo uma Matriz de Planejamento Experimental Fatorial Completo (2^k), onde foram indicadas as variáveis de estudo, com seus respectivos níveis^{11,21}. Na matriz de planejamento experimental, os valores codificados das variáveis são determinados segundo a expressão apresentada pela Equação 1.

$$X = 2 \times \left[\frac{x_v - x_{med}}{x_{max} - x_{min}} \right] \quad (1)$$

Sendo:

X = valor codificado da variável

x_{med} = valor médio da variável

x_{min} = valor mínimo da variável

x = valor da variável

x_{max} = valor máximo da variável

As respostas obtidas para as etapas de neutralização e branqueamento foram: índice de peróxidos, ácidos graxos livres (expressos como ácido oléico), índice de iodo e cor Lovibond (unidades de Amarelo e Vermelho).

As variáveis estudadas na etapa de neutralização foram o excesso de solução de hidróxido de sódio e a temperatura de processo, e as variáveis utilizadas para o estudo do branqueamento foram a temperatura, o tempo de retenção, a percentagem de adsorvente e a relação carvão ativo/adsorvente. Nas Tabelas 1 e 2 são apresentadas a Matriz de Planejamento Experimental com as variáveis estudadas em seus valores (níveis) na forma real e codificada para a neutralização e o branqueamento respectivamente. Os resultados da matriz de planejamento experimental foram analisados estatisticamente, a fim de se obter as

Tabela 1. Matriz de Planejamento Experimental Fatorial Completo para a etapa de Neutralização

Experimento	Temperatura		Excesso	
	(°C)	Codificado	(%)	Codificado
1	40	-1	1,0	-1
2	80	+1	1,0	-1
3	40	-1	4,0	+1
4	80	+1	4,0	+1

Tabela 2. Matriz de Planejamento Experimental Fatorial Completo para a etapa de Branqueamento

Experimento	Temperatura		Tempo		Adsorvente		Relação (Ca/Ads)	
	(°C)	Codificado	(min)	Codificado	(%)	Codificado	(%)	Codificado
1	70	-1	20	-1	1,0	-1	0,0	-1
2	100	+1	20	-1	1,0	-1	0,0	-1
3	70	-1	30	+1	1,0	-1	0,0	-1
4	100	+1	30	+1	1,0	-1	0,0	-1
5	70	-1	20	-1	5,0	+1	0,0	-1
6	100	+1	20	-1	5,0	+1	0,0	-1
7	70	-1	30	+1	5,0	+1	0,0	-1
8	100	+1	30	+1	5,0	+1	0,0	-1
9	70	-1	20	-1	1,0	-1	10,0	+1
10	100	+1	20	-1	1,0	-1	10,0	+1
11	70	-1	30	+1	1,0	-1	10,0	+1
12	100	+1	30	+1	1,0	-1	10,0	+1
13	70	-1	20	-1	5,0	+1	10,0	+1
14	100	+1	20	-1	5,0	+1	10,0	+1
15	70	-1	30	+1	5,0	+1	10,0	+1
16	100	+1	30	+1	5,0	+1	10,0	+1

Sendo: Relação (Ca/Ads): relação Carvão Ativo/ Adsorvente

principais variáveis de influência bem como as faixas de operação para estas etapas. A validade desta análise foi verificada pelo gráfico da distribuição dos resíduos²¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização da Matéria-Prima

A Tabela 3 apresenta os valores para os índices de Iodo, Peróxidos e Saponificação e a % dos Ácidos Graxos Livres para a matéria-prima (Óleo Bruto de Pescado) utilizada nos experimentos do estudo das etapas de Neutralização e de Branqueamento.

Os valores encontrados para o índice de iodo expressos na Tabela 3, estão dentro da faixa segundo a literatura², para a matéria-prima utilizada nos experimentos de neutralização, e um pouco abaixo para a utilizada nos experimentos de branqueamento; isto se deve à variabilidade das espécies que compunham o óleo bruto. Além disso, a matéria-prima utilizada foi de baixa qualidade, estando em estado de decomposição, sendo que isto pode ser observado pelo alto teor de ácidos graxos livres de ambos os óleos na Tabela 3. O índice de saponificação do óleo bruto está um pouco abaixo da faixa de valores encontrados na literatura para o óleo de sardinha³, mas dentro da faixa para óleo de atum (164-194)⁽⁹⁾, encontrando-se então próximo das faixas para óleo de pescado. Com relação ao índice de peróxidos, estes compostos não foram detectados no óleo bruto. Isto se deve provavelmente ao avançado estado de oxidação da matéria-prima, de modo que os peróxidos formados foram decompostos em outros produtos, não detectáveis por este índice.

2. Etapa de Degomagem

Os resultados obtidos após a etapa de degomagem para cada matéria-prima utilizada (óleo bruto) nos experimentos de neutralização e branqueamento são apresentados na Tabela 4.

Tabela 3. Caracterização do Óleo Bruto de Pescado utilizado nos experimentos de neutralização e branqueamento

	Óleo Bruto*	Óleo Bruto**	Óleo Pescado***
Índice de Iodo (II)	141,5 ± 0,3	130,0 ± 0,5	155 ± 15 ²
% Ácidos Graxos Livres (%AGL)	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,4	7,5 ± 5,5 ¹⁸
Índice de Saponificação (IS)	186 ± 1,0	188 ± 1,0	179 ± 15 ⁸
Índice de Peróxidos (IP)	–	–	–

* Óleo utilizado nos experimentos de neutralização

** Óleo utilizado nos experimentos de branqueamento

*** Referências de literatura. Fontes: ²BARLOW & YOUNG (1996); ¹⁸REGULY (1983); ⁸HARTMAN & ESTEVES (1981).**Tabela 4.** Caracterização do Óleo após a degomagem

	Óleo Degomado*	Óleo Degomado**
Índice de Iodo (II)	137 ± 6	130 ± 8
% Ácidos Graxos Livres (% AGL)	7,2 ± 0,9	6,8 ± 0,7
Índice de Saponificação (IS)	191,3 ± 0,7	191 ± 1,0
Índice de Peróxidos (IP)	–	–

* Óleo utilizado nos experimentos de neutralização

** Óleo utilizado nos experimentos de branqueamento

Durante o processo de degomagem, o teor de ácidos graxos livres aumentou consideravelmente, provavelmente devido à hidrólise de óleo neutro. Além disso, há também o excesso de ácido fosfórico que não reagiu, e conseqüentemente, influenciou para aumentar a acidez do óleo degomado. Pelos mesmos motivos que no óleo bruto, os compostos peróxidos também não foram detectados. O processo pode ser considerado adequado, já que não produziu grandes alterações nos índices de iodo e de saponificação no óleo degomado, demonstrando que a identidade da matéria-prima não foi prejudicada.

3. Etapa de Neutralização

Na Tabela 5 pode-se observar os resultados da Matriz de Planejamento Experimental Fatorial Completo utilizada no estudo da etapa de neutralização. O índice de peróxidos teve

variação em todos experimentos de neutralização do óleo de pescado, sendo que no experimento número três, os teores deste índice e dos ácidos graxos livres foram maiores que nos demais, e a acidez apresentou-se alta para um óleo neutralizado, pois este deveria possuir um teor máximo de ácidos graxos livres de 0,1%, segundo cita Rittner (1996)¹⁹.

3.1. Análise Estatística dos Resultados Obtidos na Etapa de Neutralização

Os dados obtidos na Tabela 5 foram tratados estatisticamente através de uma análise de variância, a fim de se verificar a significância (a nível de 95%) dos fatores considerados sobre as respostas analisadas. Além disso, buscou-se a determinação das faixas de operação para o processo.

Na Tabela 6 pode-se observar que os fatores de estudo afetaram a acidez do óleo neutralizado e lavado, bem como a interação entre eles, pois o nível de significância foi menor do que 0,05.

Conforme pode ser observado no gráfico dos efeitos principais da Figura 2, a temperatura influenciou de modo a aumentar o percentual de ácidos graxos livres do óleo neutralizado e a percentagem de excesso de solução de soda, de maneira a diminuí-los. Isto é coerente, uma vez que quanto maior a temperatura, maior é a velocidade de hidrólise dos ácidos graxos esterificados ao glicerol^{12,19}.

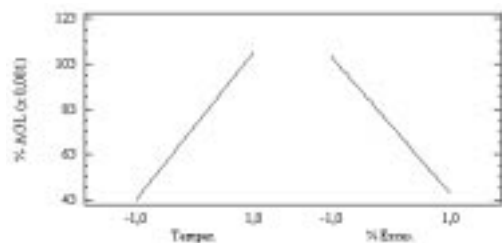
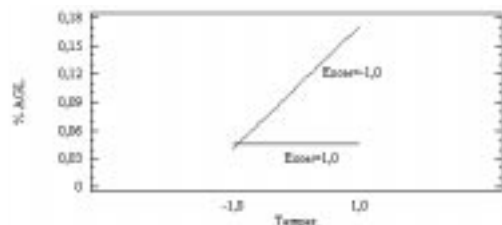
Na Figura 3, observa-se o efeito da interação entre o fator temperatura e o fator excesso de solução alcalina na forma

Tabela 5. Resultados da Matriz de Planejamento Experimental da etapa de neutralização para o percentual de Ácidos Graxos Livres (% AGL), o Índice de Peróxidos (IP), o Índice de Iodo (II) e o Índice de Saponificação (IS)

Experimento	% Exces. (cod)	Temper. (cod)	% AGL	IP (mEq/Kg)	II	IS
1	-1	-1	0,043	2,92	133,2	193,1
			0,038	3,12	133,8	190,9
2	1	-1	0,048	2,03	138,4	188,3
			0,043	2,18	139,0	189,5
3	-1	1	0,162	5,90	134,9	191,4
			0,181	6,02	134,6	192,2
4	1	1	0,043	3,52	131,1	186,1
			0,048	3,26	131,5	186,6

Tabela 6. Análise estatística para os Ácidos Graxos Livres (% AGL) no estudo da etapa de neutralização do óleo de pescado

Parâmetro	Efeito	Teste F	Significância	Desvio Padrão
Média	-	-	-	-
Temperatura	0,066	157,4	0,0002	0,005
Excesso	-0,061	134,3	0,0003	0,005
(Temper/Exces)	-0,066	157,4	0,0002	0,005

**Figura 2.** Efeitos principais dos fatores estudados na forma codificada sobre o teor de Ácidos Graxos Livres do óleo neutralizado**Figura 3.** Efeitos das interações entre os fatores estudados na forma codificada sobre o teor de Ácidos Graxos Livres do óleo neutralizado

codificada. Nesta figura pode-se notar que a percentagem de excesso de solução de hidróxido de sódio influenciou de forma significativa na diminuição dos ácidos graxos livres do óleo neutralizado, quando se operou na temperatura mais alta (nível +1), sendo que na temperatura mais baixa (nível -1), o excesso não exerceu influência, quando se passou de 1,0% para 4,0%. A temperatura do processo não promoveu um efeito significativo de forma a aumentar os ácidos graxos livres, quando se operou na maior quantidade de excesso de solução de álcali. Isto leva a crer que quando se trabalhou a 80°C, houve uma formação de ácidos graxos livres, sendo estes neutralizados quando se utilizou a maior quantidade de excesso (4,0%).

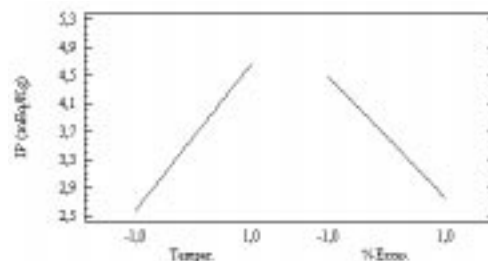
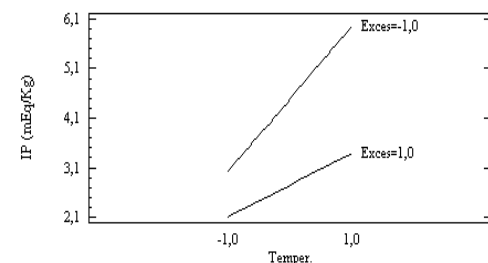
Na Tabela 7 observa-se que os parâmetros de estudo afetaram o índice de peróxidos a nível de 95% (significância $\leq 0,05$).

Nas Figuras 4 e 5 pode-se observar a influência dos fatores no índice de peróxidos.

A influência dos fatores de estudo através de seus efeitos principais sobre o índice de peróxidos é semelhante ao que foi observado para os ácidos graxos livres, conforme Figura 2. Pode

Tabela 7. Análise estatística para o Índice de Peróxidos no estudo da etapa de neutralização do óleo de pescado

Parâmetro	Efeito	Teste F	Significância	Desvio Padrão
Média	-	-	-	-
Temperatura	2,115	504,0	<0,0001	0,094
Excesso	-1,742	342,1	0,0001	0,094
(Temper/Exces)	-0,827	77,1	0,0009	0,094

**Figura 4.** Efeitos principais dos fatores estudados na forma codificada sobre o Índice de Peróxidos do óleo neutralizado**Figura 5.** Efeitos das interações entre os fatores estudados na forma codificada sobre o Índice de Peróxidos do óleo neutralizado

ser observado na Figura 5 que o excesso de solução de hidróxido de sódio influencia de modo a diminuir o índice de peróxidos, não importando o nível utilizado de temperatura.

Os índices de iodo e de saponificação não foram afetados significativamente, a nível de 95%, por nenhum dos fatores de estudo.

3.2. Faixas de Trabalho Obtidas para o Processo de Neutralização do Óleo de Pescado

Nos quadrados de resposta das Figuras 6 e 7 observa-se que à temperatura de 40°C, utilizando-se 4,0% de excesso de hidróxido de sódio 20% p/p, obteve-se um óleo neutralizado com baixo percentual de ácidos graxos livres (em torno de 0,04%) e menor índice de peróxidos (2,1 mEq/Kg), estando em condições adequadas para ser branqueado.

4. Etapa de Branqueamento

O óleo bruto utilizado neste estudo corresponde ao da segunda coluna da Tabela 3, sendo o óleo degomado obtido, apresentado na segunda coluna da Tabela 4. O óleo neutralizado

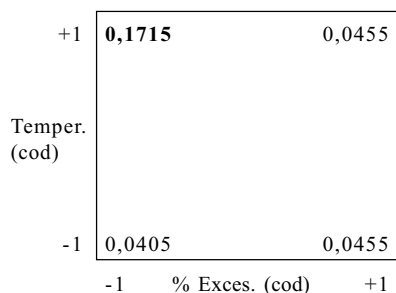


Figura 6. Quadrado de resposta para o teor de Ácidos Graxos Livres no estudo da neutralização do óleo de pescado

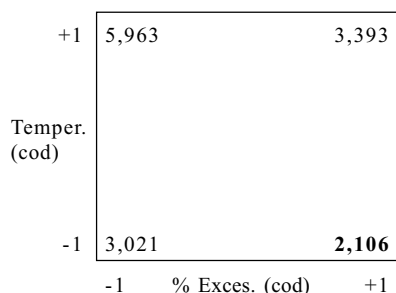


Figura 7. Quadrado de resposta para o Índice de Peróxidos no estudo da neutralização do óleo de pescado

utilizado nos experimentos foi o obtido da melhor condição de neutralização determinada na etapa anterior (número 3). Este apresenta-se caracterizado na Tabela 8. A diferença entre os índices de caracterização deste óleo comparado com o utilizado na etapa anterior é devido, provavelmente, à matéria-prima (óleo bruto) não ser a mesma.

Tabela 8. Características do Óleo de Pescado neutralizado, lavado e seco

% AGL	II	IP (mEq/Kg)	Cor Lovibond
0,098 ± 0,03	130,4 ± 0,7	2,5 ± 0,3	8,0 ± 0,1 V*; 30 A*

*V= vermelho * A= amarelo

A Tabela 9 apresenta os resultados da matriz do planejamento experimental fatorial completo na etapa de branqueamento do óleo de pescado com as respectivas respostas obtidas.

A cor Lovibond do óleo neutralizado foi determinada, fixando-se a cor “Amarelo” em 30 unidades, e variando-se a cor “Vermelho”.

Observando-se a Tabela 9, percebe-se uma diminuição na cor do óleo após a clarificação. Há uma aparente formação de peróxidos no produto clarificado durante o processo, devido aos maiores valores destes, sendo que isto pode ter ocorrido pela instabilidade do óleo pelas suas condições iniciais, bem

como pelo seu grau de insaturação ser elevado, já que quanto maior forem a insaturação dos ácidos graxos e a quantidade inicial de produtos de degradação, maior será a formação de compostos oxidativos^{13,19}.

4.1. Análise Estatística dos Resultados Obtidos da Matriz de Planejamento Experimental do Tipo Fatorial Completo (2⁴) para a Etapa de Branqueamento

Nas Tabelas 10 e 11 apresentam-se os resultados da análise estatística realizada dos experimentos para as respostas cor Vermelho Lovibond e Índice de Peróxidos, respectivamente, levando em consideração apenas os fatores principais e interações de segunda ordem que exerceram influência significativa (ao nível de 95%) nas respostas.

As Tabelas 10 e 11 mostram que, pelo sinal algébrico dos coeficientes dos parâmetros, os efeitos principais dos fatores em estudo influenciaram de maneira a diminuir a cor Vermelho Lovibond do óleo clarificado, bem como o índice de peróxidos. Isto ocorreu também pelos efeitos das interações de segunda ordem entre os parâmetros de estudo, quando os referidos fatores estavam envolvidos, principalmente para a cor Lovibond do óleo.

Pode-se evidenciar nas Figuras 8 e 9 que a quantidade de adsorvente e a presença de carvão ativo tendem a remover de forma mais efetiva os compostos peróxidos, com a consequente remoção da cor do óleo clarificado de forma significativa (95%), quando se operou no maior nível destas variáveis. Estes resultados são coerentes, já que os compostos peróxidos acentuam a cor dos óleos.

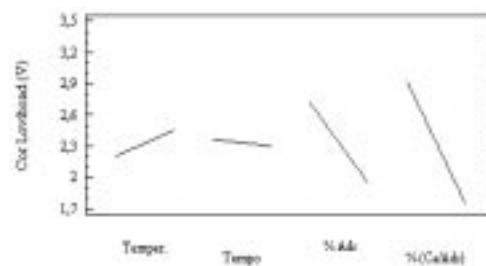


Figura 8. Efeitos principais dos fatores estudados na forma codificada sobre a Cor Vermelho Lovibond do óleo clarificado

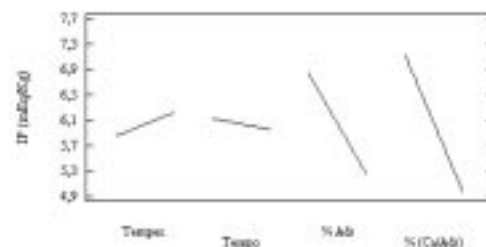


Figura 9. Efeitos principais dos fatores estudados na forma codificada sobre o Índice de Peróxidos do óleo clarificado

Tabela 9. Resultados da matriz de planejamento para a Cor Vermelho Lovibond, Índice de Peróxidos, Índice de Iodo e percentagem de Ácidos Graxos Livres

Experimento nto	Temper (cod)	Tempo (cod)	% Ads (cod)	% (Ca/Ads) (cod)	Cor Lov. (V; 30 A)	IP (mEq/Kg)	II	AGL
1	-1	-1	-1	-1	2,7	6,79	126,7	0,080
					3,0	6,82	122,4	0,114
2	1	-1	-1	-1	3,0	9,31	123,6	0,090
					2,6	8,34	124,4	0,081
3	-1	1	-1	-1	3,0	6,28	123,8	0,083
					2,6	6,63	126,4	0,083
4	1	1	-1	-1	4,0	6,73	127,2	0,105
					4,0	6,01	129,4	0,098
5	-1	-1	1	-1	2,7	6,02	116,4	0,084
					2,7	6,42	116,4	0,069
6	1	-1	1	-1	3,0	7,34	128,0	0,080
					3,0	7,52	129,3	0,080
7	-1	1	1	-1	2,1	7,06	118,5	0,088
					2,2	6,99	117,3	0,083
8	1	1	1	-1	3,0	7,71	112,4	0,083
					3,1	8,04	113,8	0,091
9	-1	-1	-1	1	2,9	8,23	119,3	0,093
					2,7	8,50	119,5	0,106
10	1	-1	-1	1	2,0	4,45	117,2	0,037
					2,1	4,41	118,0	0,041
11	-1	1	-1	1	2,0	5,54	120,0	0,046
					2,1	4,84	124,0	0,039
12	1	1	-1	1	2,3	7,87	117,0	0,116
					2,5	8,69	115,4	0,102
13	-1	-1	1	1	1,4	3,60	124,2	0,064
					1,4	4,01	126,7	0,050
14	1	-1	1	1	1,3	2,90	125,3	0,081
					1,3	3,32	127,0	0,075
15	-1	1	1	1	1,0	2,98	130,9	0,075
					0,8	2,84	129,6	0,076
16	1	1	1	1	1,0	3,46	127,9	0,095
					1,1	3,50	124,8	0,100

V= vermelho A= amarelo

Tabela 10. Resultados da análise estatística para a Cor Vermelho Lovibond do óleo clarificado

Parâmetro	Efeito	Teste F	Significância	Desvio Padrão
Média	-	-	-	-
% Ads	-0,775	120,3	<0,0001	0,0707
% (Ca/Ads)	-1,175	276,5	<0,0001	0,0707
(Temper/ Tempo)	0,400	32,1	<0,0001	0,0707
(Temper/ %(Ca/Ads))	-0,338	22,8	0,0001	0,0707
(Tempo/ %Ads)	-0,250	12,5	0,0019	0,0707
(Tempo/ %(Ca/Ads))	-0,225	10,1	0,0045	0,0707
(%Ads/ %(Ca/Ads))	-0,388	30,1	<0,0001	0,0707

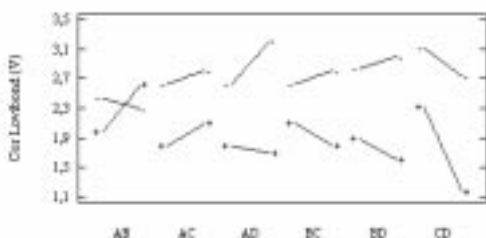
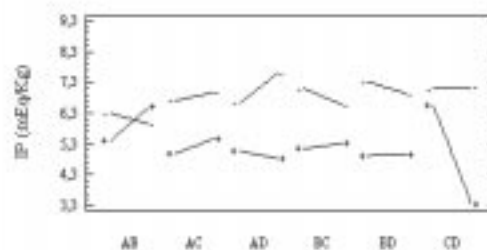
Tabela 11. Resultados da análise estatística para o Índice de Peróxidos do óleo clarificado

Parâmetro	Efeito	Teste F	Significância	Desvio Padrão
Média	-	-	-	-
% Ads	-1,605	15,1	0,0009	0,4135
% (Ca/Ads)	-2,180	27,8	<0,0001	0,4135
(%Ads/ %(Ca/Ads))	-1,632	15,6	0,0007	0,4135

Observando as Figuras 10 e 11, percebe-se que adicionando-se carvão ativo ao óleo, a influência da quantidade de adsorvente na diminuição dos peróxidos é muito maior, se comparada apenas com a adição de terra ativada. Só utilizando terra ativada como agente branqueador, a redução da cor do óleo foi pouco significativa.

É interessante salientar também que, analisando-se as mesmas figuras, a temperatura tendeu a aumentar o índice de peróxidos, quando se operou com 30 minutos, e com 20 minutos de processo, esta variável promoveu um efeito de modo a diminuir o índice de peróxidos. As mesmas conclusões podem se tiradas se se considerar os efeitos das interações de segunda ordem para a cor vermelho Lovibond.

O índice de iodo e a percentagem de ácidos graxos livres do óleo clarificado no decorrer dos experimentos não tiveram variação significativa (95% de significância) por nenhum dos efeitos principais dos fatores estudados.

**Figura 10.** Efeito das interações de segunda ordem entre os fatores estudados na forma codificada sobre a Cor Vermelho Lovibond do óleo clarificado**Figura 11.** Efeito das interações de segunda ordem entre os fatores estudados na forma codificada sobre o Índice de Peróxidos do óleo clarificado

Sendo:

AB: Temper/Tempo; **AC:** Temper/ % Ads; **AD:** Temper/ % (Ca/Ads);

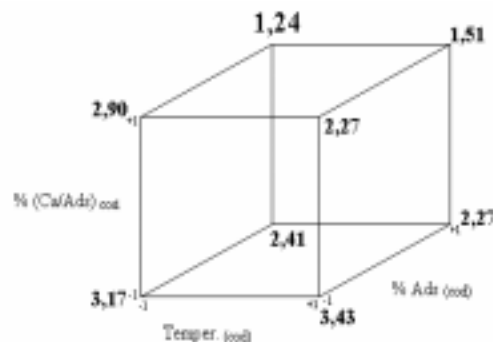
BC: Tempo/ % Ads; **BD:** Tempo/ % (Ca/Ads); **CD:** % Ads/ % (Ca/Ads).

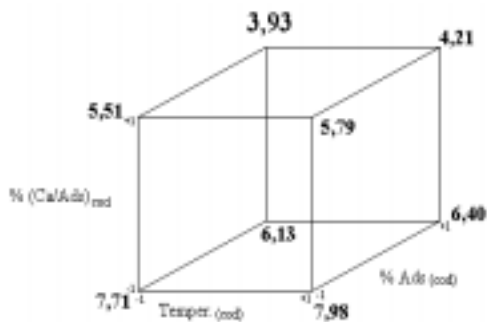
4.2. Faixas de Trabalho Obtidas para o Processo de Branqueamento do Óleo de Pescado

Nos cubos de resposta das Figuras 12 e 13, observa-se que o óleo clarificado apresenta uma melhor cor Lovibond (30 Amarelo, 1,24 vermelho) quando a % Adsorvente e a mistura de adsorventes (% Carvão Ativo/Adsorvente) estão em seus valores máximos (5,0% e 10,0% respectivamente). Esta é a mesma faixa de processo a fim de se obter um óleo clarificado com menor Índice de Peróxidos (3,93 mEq/Kg).

Como a temperatura e o tempo de processo não tiveram influência significativa nas respostas, a região de trabalho para estes fatores pode ser em seus menores níveis, que é 20 minutos a 70°C.

Para verificar a validade da análise de variância utilizada para se analisar os resultados da etapa de branqueamento, foi realizada a suposição da independência dos erros experimentais, através do gráfico da distribuição dos resíduos. Nas Figuras 14 e 15 são apresentados estes gráficos para a cor Vermelho Lovibond e para o Índice de Peróxidos obtidos nos experimentos, respectivamente. A independência dos erros experimentais foi constatada, pois os resíduos estão distribuídos de forma aleatória em torno do eixo horizontal (zero).

**Figura 12.** Cubos de resposta para Cor Vermelho Lovibond no estudo do branqueamento do óleo de pescado

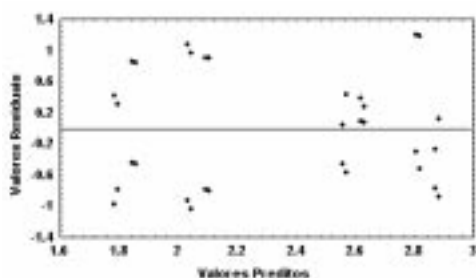


CONCLUSÕES

A matéria-prima, óleo bruto de pescado obtido como resíduo da produção de farinha de indústria local de Rio Grande, RS, apresentou um Índice de Iodo de $136 (\pm 6,0)$ e um Índice de Saponificação de $187 (\pm 3,0)$, estando dentro da faixa citada na literatura para óleos de diferentes espécies de pescado. Já os altos teores obtidos para o percentual de Ácidos Graxos Livres de $5,2\% (\pm 0,2)$ evidenciam o estado de decomposição do resíduo industrial do pescado utilizado como matéria-prima para a obtenção de farinha.

Figura 13. Cubos de resposta para o Índice de Peróxidos no estudo do branqueamento do óleo de pescado

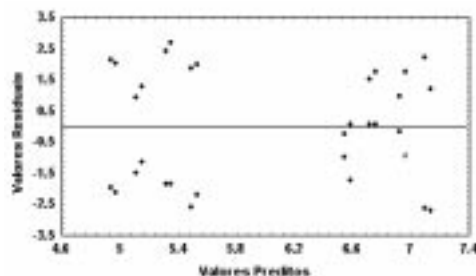
Na etapa de degomagem do óleo, a utilização de 1,0% de Ácido fosfórico a 85% durante 30 minutos, à temperatura de 80°C foi adequada, pois não produziu alterações acentuadas nos índices de Iodo (133 ± 11) e de Saponificação ($191 \pm 1,0$) do óleo degomado. Contudo ocorreu um aumento no teor de Ácidos Graxos Livres.



Na etapa de neutralização do óleo de pescado, a temperatura de processo e a percentagem de excesso de solução de hidróxido de sódio 20% p/p influenciaram significativamente no Índice de Peróxidos e na percentagem de Ácidos Graxos Livres do óleo neutralizado.

Figura 14. Distribuição dos resíduos para a Cor Vermelho Lovibond

A região de operação para obter um óleo neutralizado com menor Índice de Peróxidos ($2,10 \text{ mEq/Kg}$) e baixo percentual de Ácidos Graxos Livres ($0,046\%$), utilizando solução de hidróxido de sódio 20% p/p, sob agitação vigorosa e vácuo de 420 mmHg , foi de: 4,0% de excesso de solução de soda e temperatura de 40°C .



Na etapa de branqueamento do óleo de pescado, verificou-se que a quantidade de Adsorvente e a relação Carvão ativo/ Adsorvente influenciaram significativamente, ao nível de 95%, na Cor Vermelho Lovibond e no Índice de Peróxidos do óleo clarificado.

Figura 15. Distribuição dos resíduos para o Índice de Peróxidos

Nas quantidades de 5,0% de adsorvente e de 10,0% de Carvão ativo/Adsorvente obteve-se um óleo clarificado com menor cor Lovibond (30 Amarelo 1,24 Vermelho) e Índice de Peróxidos ($3,93 \text{ mEq/Kg}$), utilizando a temperatura de 70°C , o tempo de retenção de 20 minutos, sob vácuo de 660 mmHg e agitação lenta de aproximadamente 40 rpm.

RIALA6/887

Morais, M.M. et al. Study of fish of refining process. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(1): 23-33, 2001

ABSTRACT. In the current work a process of refining fish oil was studied that determined, through Factorial Experimental Design, the variables which significantly influence the neutralization and bleaching stages. The crude fish oil was treated with phosphoric acid 85%, neutralized with sodium hydroxide 20% w/w in excess, washed with hot water and dried under vacuum, being bleached with adsorbent substances and filtered. During the neutralization stage some oil with Peroxide Values of 2.1 mEq/Kg and 0.04 of Free Fatty Acids was obtained, in the range of 40°C and 4.0% excess NaOH 20%. The temperature and the excess NaOH were the main influential variables of the process. During the bleaching stage, a complete factorial experimental design (2^k) involving temperature, retention time, %Adsorbent and %Charcoal/Adsorbent

was used. The % Adsorbent and % Charcoal/Adsorbent significantly influenced the Lovibond color and Peroxide Values of the bleached oil. The best results for the Lovibond Red 1.24, Lovibond Yellow 30 and Peroxide Value of 3.93 meq/Kg of the bleached oil were found in the range of 70°C and time of 20 minutes, with 5.0% of adsorbent and 10.0% of Charcoal/Adsorbent.

KEY WORDS. Fish oil; refining; fish meal; experimental design.

REFERÊNCIAS

1. American Oil Chemists' Society (AOCS). **Official and Tentative Methods of American Oil Chemists' Society**. 3rd ed., 1980 (Ca 5a-40; Cd 1-25; Cd 8-53; Cd 36-76).
2. Barlow, S.M.; Young, V. World Fish Oils: an Update. **International Fishmeal and Oils Manufacturers Association**, 1996, p. 33-37.
3. Bernardini, E. **Tecnología de Aceites y Grasas**. Editorial Alhambra, S. A., Madrid (Espanha), 1986, p. 229-316.
4. Bimbo, A.P.; Crowther, J.B. Fish Oils: Processing Beyond Crude Oil. **Infofish International**, junho de 1991, p. 20-24.
5. Contreras, E.S.G. **Bioquímica de Pescados e Derivados**. FUNEP, Jaboticabal, 1994, p. 315-330.
6. Diez, R. Degomagem: Tendências e Novas Tecnologias. In: **Seminário: Preparação de Matérias-Primas e Extração de Óleos**. Campinas, São Paulo, 25 e 26 de abril de 1995, p. 108-125.
7. Erickson, D.R. et al., (ed). Bleaching. In: **Handbook of Soy Oil Processing and Utilization. Third Printing**. St. Louis, Missouri and Champaign, Illinois: American Soybean Association and American Oil Chemists' Society, 1985, p.110-112.
8. Gruger-Jr, E.H.G. Empleos de los Aceites de Pescado Industriales. In: Stansby, M. E. **Tecnología de la Industria Pesquera**. Capítulo 21. Editorial Acribia, Zaragoza (Espanha), 1968, p. 308-309.
9. Hartman, L.; Esteves, W. **Tecnología de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia (Série Tecnologia Agroindustrial, 13), 1981, 169 p.
10. Mag, T.K. Blanqueo: Teoría y Práctica. Research Center, Canadá, **Aceites y Grasas**, septiembre de 1994, p. 49-52.
11. Montgomery, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. John Wiley e Sons, 4th ed., 1997.
12. Moretto, E.; Alves, R.F. **Óleos e Gorduras Vegetais: Processamento e Análises**. Florianópolis: Editora da UFSC; 1986, p. 19-31 e 83-98.
13. Moretto, E.; Fett, R. **Tecnología de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 1998, 150 p.
14. Norris, F. A. Refining and Bleaching. In: **Bailey's Industrial and Fat Products**. John Wiley & Sons, 4th ed., v. 2, 1982, p. 253-314.
15. Pedroso, A.M. et al. Processos de Clarificação de Óleo de Pescado. **Vetor**, FURG, Rio Grande, 7, 1997, p. 71-80.
16. Perifiltra do Brasil. Auxiliares Filtrantes (Catálogo). São Paulo (SP), 1982.
17. Pigott, G.M.; Fucker, B.W. **Seafood: Effects of Technology on Nutrition**. Washington: University of Washington; 1990, p. 258-314.
18. Reguly, J.C. **Introdução à Analítica e à Tecnologia dos Carboidratos, Lípidios, Proteínas e Enzimas: um Manual de Laboratório**. Rio Grande: FURG; 1983, p. 32.
19. Rittner, H. **Óleo de Palma: Processamento e Utilização**. 1^a ed., 1996, p. 151-207.
20. Sarikaya, Y. Blanqueo de Aceites Vegetables Y Tierras de Blanqueo. **Aceites y Grasas**, Ankara University, Ankara, Turquia, septiembre de 1994, p. 69-71.
21. Werkema, M.C.C. **Otimização Estatística de Processos: Como Determinar a Condição de Operação de um Processo que Leva ao Alcance de uma Meta e Melhoria**. Belo Horizonte, MG: Fundação Christiano Ottoni, Escola de Engenharia da UFMG; 1996, p. 27-91; 185-258.
22. Windsor, M.; Barlow, S. **Introducción a los Subproductos de Pesquería**. Editorial Acribia, Zaragoza (Espanha), 1984, p. 84-97; 180-201.
23. Zanotta, P.A. **Ensaio Cinéticos de Branqueamento de Óleo de Soja**. Florianópolis, 1999 [Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC].

Recebido em 01/09/2000; Aprovado em 05/03/2001

Propriedades físico-químicas das massas de pizza semiprontas e sua relação com o desenvolvimento de bolores e leveduras

Physical-chemical properties of pre-made pizza dough and their relationship with the development of molds and yeast.

Beatriz Helena da Silva PINHO¹
Maria Ines F. MACHADO²
Eliana B. FURLONG^{3*}

RIALA6/888

Pinho, B.H. da S.; Machado, M. I. F.; Furlong, E. B. Propriedades físico-químicas das massas de pizza semiprontas e sua relação com o desenvolvimento de bolores e leveduras. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 35-41, 2001

RESUMO. A indústria de panificação apresentou na última década um aumento considerável no número de produtos disponíveis no comércio. A pizza ganhou preferência, entre tantos, pela sua facilidade de preparo e custo acessível. Este trabalho teve por objetivo estudar a composição química e alguns indicadores de qualidade e sua relação com a ocorrência de bolores e leveduras expressos como número de unidades formadoras de colônias em temperaturas de refrigeração e ambiente. Os resultados mostraram que a temperatura de refrigeração não impediu o aumento das UFC, ao longo dos diferentes períodos de armazenamento. Os valores alcançados foram superiores aos estabelecidos pela legislação nacional. Esta situação sugere que as condições sanitárias durante o processamento do produto, embalagem e armazenamento contribuíram para que as amostras não chegassem ao final do prazo de validade adequadas para consumo, mesmo sob refrigeração. Os valores de pH e acidez acima dos recomendados para massas alimentícias (5,7 e 1,0 mg NaOH.g⁻¹ respectivamente) estão fortemente correlacionados com os níveis de contaminação encontrados ao longo do armazenamento (2,9x10⁶ UFC.g⁻¹).

PALAVRAS-CHAVE. Pizzas; qualidade de pizzas; bolores e leveduras em pizzas.

INTRODUÇÃO

A pizza é um produto que ganhou espaço na preferência do consumidor, deixando de ser exclusividade das pizzarias para ser comercializada nos mais diversos estabelecimentos comerciais. Entre os inúmeros fatores que contribuíram para o aumento deste consumo encontram-se a praticidade do produto aliada ao baixo custo, sabor agradável e grande valor nutritivo,

levando muitas escolas a incluírem-na no cardápio da merenda escolar.

As pizzas são diferenciadas pela espessura de sua massa, podendo ser finas ou espessas, redondas ou quadradas, ricas ou magras, sendo encontradas frescas ou resfriadas, prontas ou congeladas^{21,23}.

A massa básica é preparada com farinha, água, sal, açúcar e leveduras. Os recheios das pizzas são feitos com os mais

¹ Departamento de Patologia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, FURG

² Mestrado em Engenharia de Alimentos - FURG

^{3*} Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, FURG – Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475 96201900 Rio Grande, RS

variados sabores e temperos que podem conferir valor nutricional principalmente pelo aporte protéico dos produtos cárneos e queijos^{15,5}.

Com relação à produção industrial, as massas de pizza diferem em qualidade apesar da maioria dos métodos de fabricação serem semelhantes. A qualidade das farinhas usadas na formulação, as temperaturas de forneamento, manuseio higiênico e outros de ordem tecnológica são as principais causas desta variação^{7,10}.

Apesar de muitos trabalhos envolvendo formulações alternativas, recheios mais adequados ao armazenamento, embalagens, entre outros, pode-se dizer que são poucos os índices objetivos de qualidade disponíveis na literatura ou na legislação especificamente para este tipo de produto. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento da composição química e propriedades físico-químicas de três marcas de massas de pizza semiprontas comercializadas na zona sul do Rio Grande do Sul - Brasil e suas relações com o desenvolvimento de bolores e leveduras.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostragem

As massas de pizza semiprontas foram obtidas em estabelecimentos comerciais das cidades de Pelotas e Rio Grande, RS, sendo que as três marcas escolhidas possuíam períodos de validade de 25, 30 e 45 dias segundo seus fabricantes. A coleta das amostras foi realizada nos períodos de inverno, primavera, outono e verão.

A cada coleta foram tomados 8 discos de massas de pizza semiprontas, de cada marca A, B e C. Este procedimento foi repetido três vezes para cada marca, totalizando 12 lotes e perfazendo um total de 96 amostras. As amostras foram analisadas ao tempo zero (T0), tempo compreendido entre o 1º e o 5º dia de fabricação, e após o armazenamento em refrigerador (TR) e à temperatura ambiente (TA), respectivamente com valores médios de 7 e 22°C, três dias antes de findar o prazo de validade correspondente a cada marca.

2. Métodos Físico-Químicos

2.1. Composição Química

Alíquotas representativas (250g) de cada marca de massa de pizza semipronta, proveniente de diferentes coletas no T0, foram homogeneizadas para serem submetidas às análises de composição química. As determinações foram realizadas em triplicata, sendo que foram empregados os procedimentos descritos pela AOAC (1995)³ para umidade, proteínas e cinzas. Os níveis de gordura foram determinados pelo procedimento de Blygh-Dyer adaptado por Contreras et al.⁹. Os teores de carboidratos foram estimados por diferença.

2.2. Indicadores de Qualidade

As propriedades físico-químicas escolhidas como indicadores de qualidade tecnológica foram o pH, o índice de acidez

e capacidade de retenção de água (CRA). As duas primeiras foram realizadas segundo procedimento da AOAC (1995)³ e a CRA segundo método de Wang e Kinsella (1976), adaptado por Teixeira e Badiale-Furlong²³.

Este consistiu em homogeneizar 10,000g de amostra em 100 ml de água e deixar em banho-maria a 80°C durante 45 minutos. A mistura foi centrifugada a 1800 G e filtrada em funil de Buchner. A porcentagem de água retida foi calculada usando a seguinte relação:

$$CRA = \left[\frac{\text{Peso final da amostra} - \text{Peso inicial da amostra}}{\text{Peso final}} \right] \times 100$$

Todas estas determinações foram realizadas em alíquotas de amostras no momento da coleta e ao final dos prazos de validade, nas diferentes condições de armazenamento.

3. Determinações Microbiológicas

3.1. Enumeração de Bolores e Leveduras

A enumeração de bolores e leveduras foi realizada em alíquotas de amostras no T0 e ao final dos períodos de armazenamento em TA e TR. Para tal foi empregada a semeadura em ágar batata dextrose acidificado de acordo com Silva et al.¹⁸. Paralelamente ao método tradicional de contagem, em duas das coletas foi empregado o método de enumeração pelo Petrifilm, metodologia da AOAC (1995)³.

4. Avaliação Estatística

O software Statistica for Windows (versão 4.3), no seu módulo “estatística básica opção matrizes de correlação” foi utilizado para avaliar a correlação entre pH, índice de acidez e unidades formadoras de colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Amostragem

Observou-se que durante a amostragem, as massas de pizza semiprontas, em alguns supermercados, estavam acondicionadas sob refrigeração enquanto em outros a mesma marca era comercializada à temperatura ambiente. Este fato norteou a escolha do armazenamento até o final do prazo de validade em duas situações: à temperatura ambiente (TA) e à temperatura de refrigeração em refrigerador doméstico (TR), o que também refletiu as condições de armazenamento mais comuns em ambientes domésticos e comerciais, uma vez que as embalagens não apresentavam recomendações quanto a este aspecto.

Denominou-se tempo zero o período entre o 1º e o 5º dias de fabricação, pois em experimentos anteriores realizados para estabelecimento das condições de coleta, não foram observadas alterações que pudessem ser detectadas pela metodologia analítica a ser empregada para avaliação da qualidade química e microbiológica dos produtos⁴.

Ao longo dos períodos de armazenamento ocorreram alterações sensoriais nas massas, quanto a sua textura, maciez,

umidade e odor, que foram observadas pelos analistas ao manusear o produto para preparação das amostras. Algumas massas de pizza semiprontas mostraram-se mais pegajosas, com a superfície mais úmida e com odor ácido, outras apresentavam-se mais secas e endurecidas. Estas alterações já eram esperadas, pois também são comuns a outros produtos de panificação com teores de umidade semelhantes^{22,12,4}. Pela escassez de trabalhos encontrados na literatura específicos para este produto, optou-se pelas determinações que mais se adequam a produtos amiláceos.

2. Métodos Físicos-Químicos

2.1. Composição Química

Na Tabela 1 encontram-se os valores médios das frações componentes dos produtos e os coeficientes de variação, obtidos durante a determinação da composição proximal das marcas de pizzas estudadas.

Os resultados mostraram o esperado, que os teores de umidade apresentavam os maiores coeficientes de variação, pois tratava-se de produto pré-pronto e submetido a tratamento térmico que dificilmente foi uniforme em todos os lotes, ainda que de mesma marca. Os teores de carboidratos, por terem sido estimados pela diferença, possivelmente refletiram as maiores variações enquanto para os outros componentes os coeficientes de variação foram menores.

A análise de variância mostrou que, a nível de 95%, a marca A diferiu das demais quanto aos teores de proteína e a marca C quanto aos teores de gordura. Nos demais componentes, no mesmo nível de confiança, não foram registradas variações significativas entre as marcas.

Estes resultados indicam que as massas de pizza semiprontas assemelham-se às massas frescas quanto aos teores de umidade e proteína, porém, apesar de composição semelhante, estes dois tipos de produtos apresentam períodos de validade bem distintos, entre 25 a 45 dias para os primeiros, independente do tipo de armazenamento, ao passo que para as massas frescas com 30% de umidade e sem recheio, o prazo sugerido pela

legislação é de 45 dias (ABIA, 1995)⁸ e mantidas sob refrigeração^{2,7,13}.

As massas de pizza semiprontas apresentaram composição proximal semelhante aos pães de forma e são comercializadas em embalagens do mesmo tipo. O teor calórico das massas de pizza, estimado através da composição, encontra-se entre 286,5 e 301,9 Kcal.100g⁻¹ e o dos pães está entre 241 e 305 Kcal.100g⁻¹^{17,16}.

No entanto, não foi encontrado prazo de validade específico para as massas de pizzas semiprontas na legislação nacional e, aparentemente, são seguidos os prazos de validade recomendados para as massas frescas.

2.2. Propriedades Indicadoras de Qualidade

2.2.1. Acidez e pH

As determinações de acidez e pH foram realizadas em triplicata para as diferentes marcas, períodos de coleta e condições de armazenamento; os resultados médios aparecem na Tabela 2, onde o índice de acidez corresponde a mg de NaOH.g⁻¹ de amostra.

Segundo Quaglia¹⁶, os níveis de pH e acidez para produtos de panificação está na faixa de 5,2 a 5,6 e de 0,25 a 0,43 mg NaOH.g⁻¹, respectivamente, e o pH típico das massas alimentícias está em torno de 5,5. Neste caso, (Tabela 2) este valor foi observado apenas em uma marca em duas de suas coletas, enquanto as demais marcas apresentaram valores ligeiramente acima, o que poderia comprometer a efetivação do conservador empregado, propionato, (segundo rótulo na embalagem) que atuaria melhor em pH 4,5 a 5,0.

A ocorrência de pH e índice de acidez, ambos elevados ou diminuídos em produtos de panificação, podem indicar que a fermentação foi realizada a uma temperatura alta e durante um tempo superior ao necessário¹⁶.

Simpson et al.¹⁹ encontraram para fettucini comercial pH 5,1 +/- 0,1 e para o espaguete formulado pelo grupo pH 5,35 +/- 0,10 no momento da formulação. As amostras de massas de pizza semiprontas comerciais apresentam valores mais elevados

Tabela 1. Composição química média das massas de pizza semiprontas comercializadas na região sul do RS, coletadas no período de um ano

Marcas	Umidade % (CV%)	Cinzas % (CV%)	Proteína % (CV%)	Gordura % (CV%)	Carboidratos % (CV%)
A	29,1 (9,6)	2,2 (0,1)	8,9 (1,0)	2,1 (0,5)	58,0 (3,3)
B	29,6 (6,9)	2,3 (0,2)	5,7 (1,1)	3,8 (1,0)	58,6 (4,3)
C	28,1 (3,6)	2,2 (0,13)	5,7 (1,1)	4,7 (0,8)	59,2 (1,7)

Carboidratos obtidos por diferença

A,B,C: marcas comerciais

CV coeficiente de variação_(%)

Tabela 2. Variação média do pH e do índice de acidez nos diferentes tempos de vida de prateleira das massas de pizza semiprontas

Amostra	PH			Índice de Acidez (mg NaOH.g ⁻¹)		
	TO	TR	TA	TO	TR	TA
A1	5,5	6,2	6,2	1,1	0,9	0,7
A2	5,5	5,7	5,7	0,7	0,5	0,3
A3	5,7	5,8	5,7	0,8	0,7	0,5
A4	5,7	5,7	5,9	0,7	0,5	0,6
B1	5,7	5,8	5,6	1,5	1,5	1,7
B2	5,7	5,6	5,6	1,6	1,3	1,3
B3	5,7	5,6	5,6	1,4	1,1	1,2
B4	5,8	5,8	5,5	1,5	1,2	1,3
C1	5,6	5,9	*	1,4	0,9	*
C2	5,8	5,8	5,7	1,3	1,0	1,1
C3	5,8	5,9	5,9	1,3	0,9	0,9
C4	5,8	5,7	*	1,4	0,8	*

TO= tempo zero

TR= temperatura de refrigeração

TA= temperatura ambiente

A, B, C referem-se a marcas comerciais de pizza e os números 1, 2, 3, 4 aos diferentes períodos de coleta

* amostras que apresentavam contaminação fúngica antes de findar o prazo de validade

de pH, apesar da composição proximal muito semelhante aos produtos estudados pelos autores. A ação das leveduras e/ou os teores de coadjuvantes empregados na formulação podem ter contribuído para os valores de pH nas amostras das massas de pizzas semiprontas estudadas¹⁶.

Os resultados de pH, avaliados pelo teste de Duncan, mostraram que as marcas de massas de pizza semiprontas variaram entre si nas diferentes coletas, sendo que a marca A foi a de maior variação. Conseqüentemente, nas condições de armazenamento, também esta marca foi a que apresentou maiores alterações. As massas de pizza semiprontas da marca C foram as que apresentaram as menores variações de pH durante o armazenamento, nas duas temperaturas estabelecidas.

Para o índice de acidez, a ordem crescente de variação de valores nos diferentes períodos de coleta foi C, B e A. Novamente, as amostras da marca A foram as que tiveram índice de acidez afetados pelas temperaturas ambiente e de refrigeração.

A revisão da literatura não mostrou nenhuma informação específica com relação aos valores destas propriedades ao longo dos prazos de validade para as massas de pizza semiprontas, no entanto as variações indicam alterações na composição do produto ao longo destes prazos.

No mesmo trabalho de Simpson et al.¹⁹ mencionado anteriormente, foi relatado que fettucini e espaguete tendem a apresentar aumentos nos valores de acidez quando armazenados a temperaturas entre 5°C e 15°C, o que também foi observado no caso deste trabalho.

Pode-se dizer que as variações de pH e índice de acidez observadas podem estar relacionadas a inúmeros fatores, desde transformações químicas e microbiológicas decorrentes de falhas no processamento ou de condições inadequadas de embalagem e armazenamento.

2.2.2. Capacidade de Retenção de Água

A determinação da capacidade de retenção de água é uma determinação empregada para avaliar o envelhecimento dos produtos de panificação através da estimativa da quantidade de água ligada que o produto é capaz de manter, tornando-o viável por mais tempo, sem perder suas características originais^{22,24}.

As características sensoriais destes produtos induzem a uma aceitação, que dependerá do hábito alimentar do consumidor, que dificilmente pode ser comparado com a avaliação destas através de índices físico-químicos²².

Para massas alimentícias, esta propriedade é um indicador de qualidade, e sendo assim, foi uma das determinações escolhidas para estudar a possibilidade de avaliar as alterações nas massas de pizza semiprontas durante o prazo de validade de maneira mais objetiva¹.

As amostras armazenadas sob refrigeração ao fim do armazenamento apresentavam-se mais quebradiças e com aspecto ressecado do que as deixadas à temperatura ambiente, confirmando o esperado. Provavelmente devido à umidade intermediária do produto quando armazenado à temperatura de refrigeração, poderia ocorrer um processo de retrogradação do gel de amido.

Na região sul, condições de umidade relativa alta (acima de 70%) são freqüentes mesmo nos meses de inverno, sendo a embalagem fundamental para minimizar o problema de absorção de água¹³. Nas amostras estudadas, a capacidade de retenção de água pode ter sido influenciada por variáveis como: clima de armazenamento, embalagens, formulação das massas e espessura da massa. Os resultados estão na Tabela 3.

Tabela 3. Capacidade de retenção de água (%) em massas de pizza semiprontas

Amostra	TO	TR	TA
A1	203	115	124
A2	193	105	135
A3	220	117	168
A4	223	134	170
B1	107	89	92
B2	109	89	88
B3	110	124	130
B4	108	92	90
C1	100	180	*
C2	100	109	110
C3	111	185	153
C4	104	110	*

* Amostras contaminadas por bolores e leveduras antes do término da validade

TO: tempo zero

TR: temperatura de refrigeração

TA: temperatura ambiente

A, B, C: refere-se às marcas comerciais das massas de pizza semiprontas e os números 1,2,3,4 aos diferentes períodos de coleta

O comportamento das marcas nas diferentes condições estudadas não mostrou uma tendência definida para a alteração da propriedade e, aparentemente, ela não refletiu para as massas de pizza semiprontas, as alterações de trocas de água ligada e livre de maneira objetiva.

3. Enumeração de Bolores e Leveduras

Na Tabela 4 encontram-se os resultados médios da contaminação de bolores e leveduras no tempo zero e nos tempos de armazenamento encontrados nas amostras das massas de pizza semiprontas.

Tabela 4. Enumeração de bolores e leveduras (UFC.g⁻¹) nos diferentes tempos da vida de prateleira das massas de pizza semiprontas

Amostra	TO	TR	TA
A1	1,3×10 ⁴	7,2×10 ⁴	2,9×10 ⁶
A2	1,6×10 ⁴	1,4×10 ⁴	2,5×10 ⁶
A3	4,3×10	9,6×10 ³	2,8×10 ⁶
A4	1,5×10 ⁴	6,0×10 ⁴	3,0×10 ⁶
B1	2,0×10 ³	2,7×10 ⁶	6,8×10 ³
B2	9,2×10	4,1×10 ³	1,5×10 ⁴
B3	1,2×10 ²	4,7×10 ⁴	9,5×10 ⁴
B4	2,0×10 ²	2,6×10 ⁶	6,2×10 ⁴
C1	7,9×10	4,8×10 ³	*
C2	7,9×10 ²	4,9×10 ³	1,5×10 ⁴
C3	1,1×10 ²	1,6×10 ⁴	1,2×10 ⁴
C4	1,4×10 ²	2,1×10	*

TO: tempo zero compreendido do primeiro até o quinto dia de fabricação da pizza

TR: temperatura de refrigeração

TA: temperatura ambiente

A, B, C: referem-se a marcas de massas de pizza semi prontas e os números 1, 2, 3, 4 os diferentes períodos de coleta

*amostras contaminadas por bolores e leveduras antes de findar o prazo de validade

No caso das massas de pizza analisadas ao tempo zero apenas duas coletas da marca A estiveram acima dos limites propostos pela portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária. Após o armazenamento, em ambas as temperaturas, as marcas estudadas apresentaram contagens superiores ao limite permitido (10⁴ UFC.g⁻¹).

O armazenamento das massas à temperatura ambiente favoreceu o desenvolvimento dos microrganismos e a temperatura de refrigeração não foi suficiente para evitar que as amostras se situassem, em termos de bolores e leveduras, na faixa de qualidade imprópria para consumo. Esta situação sugere que as condições higiênico-sanitárias durante o processamento do produto, embalagem e armazenamento, contribuíram para a impossibilidade de que as amostras chegassem ao final do prazo de validade, mesmo sob refrigeração.

Levantamentos realizados em massas de pizzas comercializadas em Belo Horizonte (MG) por Souza et al.²⁰, mostraram valores de 67% de amostras contaminadas por

bolores e leveduras. Nas marcas estudadas por Fernandes et al.¹¹ em João Pessoa (PB) os valores da contagem de bolores e leveduras variaram entre 4,9x10³ a 3,6x10⁵ UFC.g⁻¹ em 80% das amostras; 20% apresentavam contagens superiores a 3x10⁵ UFC.g⁻¹. O total acima do nível tolerado foi 80% das amostras avaliadas, similarmente aos resultados obtidos neste trabalho.

No Brasil, não existem valores específicos para a vida de prateleira das massas de pizza, ao passo que na França as pizzas frescas refrigeradas possuem vida útil de 6 dias, podendo aumentar a durabilidade com uso de atmosfera modificada com CO₂ e N₂ e mantidas a 4°C¹³.

3.1. Ocorrência de Bolores e Leveduras e Características de Qualidade Determinadas

A correlação entre o pH no tempo zero (PHTO), pH à temperatura de refrigeração (PHTR), pH à temperatura ambiente (PHTA), índice de acidez no tempo zero (ACIDTO), índice de acidez à temperatura de refrigeração (ACIDTR) e índice de acidez à temperatura ambiente (ACIDTA), o desenvolvimento de bolores e leveduras (UFC.g⁻¹), no tempo zero (UFCTO), à temperatura de refrigeração (UFCTR) e à temperatura ambiente (UFCTA), permitiu conhecer o nível de influência destes parâmetros sobre a alta contaminação observada.

Na Tabela 5 aparecem as situações em que as correlações foram significativas a nível de p<5%.

Tabela 5. Correlações significativas entre pH, índice de acidez e crescimento de microrganismos

Correlações p< 5%	R (x,y)
PHTO X UFCTO	- 0,808
PHTO X UFCTA	- 0,655
ACIDTO X UFCTO	- 0,594
ACIDTR X UFCTR	0,658
ACIDTO X UFCTA	- 0,852

Os níveis de pH e índice de acidez no tempo zero estão correlacionados com o desenvolvimento de bolores e leveduras, contribuindo para as alterações até o final do armazenamento em qualquer temperatura.

O pH elevado dos produtos logo após o processamento pode ter facilitado o desenvolvimento de microrganismos que os contaminaram no manuseio posterior ao forneamento. Isto dificultou a ação do conservador (propionato), mais efetivo em pH 4,5 a 5,0. A correlação entre pH inicial com o número de unidades formadoras de colônias encontradas nas massas de pizza semiprontas armazenadas à temperatura ambiente confirmam esta observação.

Correlação direta ocorreu entre o índice de acidez e os teores de contaminação por bolores e leveduras nas massas de pizza semiprontas armazenadas sob refrigeração. O comportamento observado está de acordo com o esperado, ou seja, as temperaturas baixas diminuem a velocidade das reações químicas e, conseqüentemente, a proliferação dos microrganismos.

Com estas observações, pode-se dizer que o controle do pH e do índice de acidez inicial poderiam contribuir para minimizar o problema da contaminação por bolores e leveduras, no mínimo porque facilitaríamos a ação do conservador, mas outras condições do ambiente e embalagens precisam ser estudadas. Cabe salientar que outras combinações entre pH, acidez e unidades formadoras de colônias foram significativas, porém com níveis inferiores a 60%, sendo por isso, consideradas muito fracas e com maior probabilidade de terem sido determinadas por fatores aleatórios e não pelas variáveis estudadas.

A capacidade de retenção de água, segundo a literatura, poderia interferir no desenvolvimento da microbiota, sendo estudada sua correlação com o número de unidades formadoras de colônias nas massas de pizza semiprontas no período inicial de validade e ao final deste, em temperatura ambiente e de refrigeração.

A matriz detalhada das correlações mostrou ser significativa e direta (71%) para a capacidade de retenção inicial e o número de unidades formadoras de colônia quando as massas de pizza semiprontas foram mantidas à temperatura ambiente. A correlação entre a capacidade de retenção de água na temperatura de refrigeração e das unidades formadoras de colônia na mesma temperatura também foi significativa a nível de 5% de probabilidade, porém mais fraca e negativa (47%), possivelmente decorrente de variações aleatórias.

Uma forte correlação positiva (69%) ocorreu entre o número de unidades formadoras de colônias no tempo zero e o número de unidades formadoras de colônias quando as massas de pizza semiprontas foram armazenadas à temperatura ambiente.

Conforme observado no caso de pH e da acidez, o armazenamento sob refrigeração minimizou as alterações decorrentes do desenvolvimento da microbiota fúngica.

Embora as massas de pizzas não sejam consideradas frescas porque são levedadas e têm sua umidade diminuída de 49% (massa crua) para valores médios de 28% com o fornecimento, continuam se comportando como um produto que se conservaria melhor sob refrigeração e possivelmente com embalagem de atmosfera controlada como mencionado na literatura para as pastas e massas frescas¹³.

CONCLUSÕES

Nas condições do trabalho e considerando-se os dados obtidos pode-se concluir que:

- Os níveis de pH e acidez encontraram-se significativamente acima do recomendado para os produtos de panificação com valores médios entre 5,7 e 1,0 mg NaOH.g⁻¹, respectivamente.
- A capacidade de retenção de água não seguiu um comportamento definido ao longo das condições de armazenamento estudadas.
- O número de unidades formadoras de colônias aumenta ao longo do armazenamento (4,3x10⁴ a 2,9x10⁶ UFC.g⁻¹) em todas as marcas e condições estudadas.
- Foi observada correlação inversa entre o pH, índice de acidez e o número de unidades formadoras de colônias em todas as condições estudadas.

RIALA6/888

Pinho, B.H.da S.; Machado, M. I. F.; Furlong, E. Physical-chemical properties of pre-made pizza dough and their relationship with the development of molds and yeast. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(1):35-41,2001

ABSTRACT. Bakery industries have been developing and expanding the range of products offered for commercial sale. Pizzas are being well accepted, because they are cheap, easy to prepare and have a good nutritional value. The purpose of this study was to evaluate the chemical composition, quality indexes and their relation with colony-forming units (CFU) under refrigeration and room temperature. Results showed that the refrigeration temperature didn't influence the increase of molds and yeast contamination during storage periods. The level of these microorganisms contents was above maximum limits established by national legislation. This situation suggests that sanitary conditions, during the process, package and storage of the product contribute to the increase of contamination under or without refrigeration temperature. The values of pH and acid index (5,7 and 1,0 mg NaOH.g⁻¹) were correlated with the contamination levels found during storage periods (2,9x10⁶ CFU. g⁻¹).

KEY WORDS. Pizza; pizza quality; molds and yeast on pizza.

REFERÊNCIAS

1. Abecassis, J. Influence of extrusion conditions on extrusion speed, temperature and pressure in the extruder and on pasta quality. *Amer. Assoc. Cereal Chem.*, 71(3): 247-253, 1994.
2. Antognelli, C. The manufacture and applications of pasta as a food and as a food ingredient. *J. Food Technol.*, 15:125-145, 1980.
3. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis. Arlington, Virgínia, 1995.
4. Badiale-Furlong, E. **Avaliação de incidência de micotoxinas em microbiota fúngica em produtos de panificação.** Rio Grande, 1996. Relatório técnico encaminhado à FAPERGS.
5. Brewer, M.S. et al. Sensory and physical characteristics of consumer-acceptable lower-fat pizza for food service production. *J. Foodservice Systems*, 7(3): 149-169, 1993.

6. Ciacco, C.F.; Dias, N.M.; Oliveira, C.R. Campinas, 1985 (apostila de panificação).
7. Ciacco, C.F.; Chang, Y.K. **Tecnologia de massas alimentícias**. Campinas, Ícone Editora da Unicamp, 1986 p.127.
8. Comissão Nacional de Normas e Padrões: In: **Compêndio de Resoluções da CNNPA**, Associação Brasileira da Indústria de Alimentos - ABIA, São Paulo, 1995.
9. Contreras, E.S.G. et al. **Manual de métodos para avaliação de qualidade de produtos alimentares para merenda escolar**, Unicamp, 1982. p. 72.
10. Eiroa, M.N.U. Aspectos microbiológicos das massas alimentícias In: **Tecnologia de macarrão** Campinas: Rede de Informação de Tecnologia Industrial Básica, 1990 Manual técnico n.5.
11. Fernandes, J.D.C.; Conceição, M.L.; Souza, S.C. Avaliação do Perfil da Qualidade Higiênico-Sanitária de Pizzas Comercializadas em João Pessoa. In: **II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 1997, p.157.
12. Gaebler, D.; Unklesbay, N.; Unklesbay, K. Development of a model for predicting water activity values of an intermediate moisture pork pizza topping. **J. Food Service Systems**, 8:139-153, 1995.
13. Garcia, E.E.C. Embalagem para massas alimentícias In: **Tecnologia de macarrão**. Rede de informação de tecnologia industrial básica, Campinas, 1990 Manual técnico n.5.
14. Gilbert, L. Pizza and the dietary guidelines. **School Food Service Journal**, 46(7):52-54, 1993.
15. Larsen, D.M.; Setser, C.S.; Faubion, J.M. Effects of flour type and dough retardation time on the sensory characteristics of pizza crust. **Amer. Assoc. Cereal Chem.**, 70(6): 647-650, 1993.
16. Quaglia, G. **Ciencia y Tecnologia de la Panificación** 2.ed Zaragoza, Editorial Acribia, 1991, 485p.
17. Ranhotra, G. Proximate Components in Selected Variety Breads Commercially Produced in Major U.S. Cities. **J. Food Sci.**, 49: 642-646, 1984^a.
18. Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N. F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica**, São Paulo, Livraria Varela, 1997, 295p.
19. Simpson, M.V. et al. Storage studies on a sous vide spaghetti and meat sauce product. **Food Microbiol.**, 11(1): 5-14, 1994.
20. Souza, J.M., Pereira, A.J.G., Colen, G. Qualidade Microbiológica de Massas de Pizza Semi-Prontas Comercializadas em Belo Horizonte. In: **II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 1997 p.153.
21. Sultan, W. Pizza. **Natural Type Breads and Bakery Food Products**. The Avi Publishing 3rd. ed, p.563-565, 1981.
22. Sych, J.; Castaigne, F.; Lacroix, C. Effects of initial moisture content and storage relative humidity on textural changes of layer cakes during storage. **J. Food Sci.**, 52:, 1987.
23. Teixeira, A.M.; Badiale-Furlong, E., Salas, M.M.M. Caracterização química funcional e microbiológica de sopas desidratadas formuladas a partir de plasma bovino adsorvido em farelo de arroz desengordurado. **Rev. Vetor**, Rio Grande, 6: 85-93, 1996.
24. Zhang, X., Brusewitz, G.H. Water absorption by cracked mustard. **Amer. Assoc. Cereal Chem.**, 70(2): 133-136, 1993.

Recebido em 25/10/2000; Aprovado em 04/04/2001

Manutenção da fecundidade e oviposição em *Triatoma infestans* após décadas de criação em condições de laboratório

Maintenance of fecundity and oviposition in *Triatoma infestans* after decades of breeding under laboratory conditions

Oswaldo da Cruz OLIVEIRA JUNIOR^{1*}
Elizabeth Visone NUNES¹
Carmem do Socorro GUILHERME¹
Sansão da Rocha WESTPHALEN¹
Maria Aparecida Moreira SANTOS¹
Helena Hilomi TANIGUCHI¹
José Eduardo TOLEZANO¹

RIALA6/889

Oliveira Junior, O.C. et al. Manutenção da fecundidade e oviposição em *Triatoma infestans* após décadas de criação em laboratório. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):43-46,2001.

RESUMO. O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade da manutenção da fecundidade e oviposição em triatomíneos após décadas de criação em condições de laboratório. Foi observado o desempenho de 11 colônias de *Triatoma infestans* do Laboratório de Triatomíneos do Instituto Adolfo Lutz. Os insetos foram mantidos em temperatura e umidade constantes (27-28°C e 70-80%, respectivamente) e acasalados em diferentes proporções de machos e fêmeas. Dois ritmos de alimentação foram utilizados. No primeiro, os triatomíneos foram alimentados semanalmente, e no segundo, o ritmo de alimentação foi quinzenal ou a cada 21 dias.

Durante o estudo marrecos foram utilizados como fonte de sangue. Os resultados confirmaram a importância do ritmo de alimentação para a oviposição. Insetos que receberam alimentação semanal apresentaram os melhores índices de oviposição, representados pelo número de ovos por fêmea por dia (ofd), entre 0.39 e 4.40 ofd, sendo mais freqüente taxas acima de 1.30 ofd. Colônias que tiveram alimentação quinzenal ou a cada 21 dias apresentaram inexpressivos índices de oviposição, entre 0.05 e 1.07 ofd, sendo mais freqüente inferior a 0.30 ofd.

Concluiu-se que após décadas de criação em condições de laboratório, é possível manter a fecundidade e a capacidade de oviposição dentro dos padrões normais, em colônias de *Triatoma infestans*, se o ritmo de alimentação dos adultos não exceder 7 dias. O ritmo de alimentação não afetou o índice de sobrevivência dos adultos, mas foi crítico para a fecundidade e oviposição.

PALAVRAS-CHAVE. *Triatoma infestans*; fecundidade; oviposição; biologia; criação em laboratório.

¹ Instituto Adolfo Lutz – São Paulo – SP - Seção de Parasitoses Sistêmicas, do Serviço de Parasitologia

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355, 8º andar – 01246-902 – São Paulo – SP

INTRODUÇÃO

A relativa facilidade verificada no estabelecimento de colônias de triatomíneos em condições de laboratório tem suscitado investigações e propiciado respostas a uma série de questões referentes à biologia destes hemípteros em particular e, dos insetos de maneira geral⁷.

É inegável o interesse científico que a manutenção de colônias de “barbeiros” tem despertado. A criação de triatomíneos em laboratório tem permitido conhecimento de seus ciclos biológicos, preferências alimentares, condições favoráveis de temperatura e umidade relativa do ar, estudos sobre novos inseticidas, incluindo hormônios juvenis e feromônios; permitindo ainda o acúmulo de considerável volume de informações sobre a fisiologia geral dos insetos^{4,5,20}. Muitos desses estudos visavam a obtenção de subsídios para melhorar as condições de criação em laboratório ou, para a compreensão da epidemiologia da doença de Chagas ou, mesmo, de alternativas de combate ao vetor^{3,4,5,6,11,12,18}. Em outras investigações, pesquisadores realizaram experimentos na tentativa de padronizar procedimentos necessários para a execução do xenodiagnóstico^{1,2,9,10,13,14,15,16,17,18}.

A manutenção prolongada, por várias gerações, de colônias de triatomíneos pode significar a decadência das próprias colônias, na medida em que estiver facilitada uma circulação endogâmica, por cruzamentos entre indivíduos oriundos de uma mesma geração paterna.

Os resultados obtidos com uma primeira geração de triatomíneos recém-colonizada em laboratório diferem daqueles que são verificados em outras gerações oriundas da mesma colônia inicial¹². Todavia, recentemente foi verificado para *Dipetalogaster maximus* que mesmo após 20 anos de manutenção de colônia em condições de laboratório, o parâmetro biológico representado pela quantidade de sangue ingerido durante o repasto sanguíneo permaneceu inalterado quando comparado com uma nova colônia estabelecida a partir de ovos de fêmea coletada em seu ambiente natural⁸.

No presente trabalho, objetivou-se avaliar a possibilidade de manutenção da fecundidade e da capacidade de oviposição em *Triatoma infestans* Klug, 1834, após décadas de criação em condições de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram observadas onze diferentes colônias de *Triatoma infestans*, mantidas há mais de duas ou três décadas em condições de laboratório. A investigação restringiu-se aos insetos adultos, obtidos no Laboratório de Triatomíneos da Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz. Ao iniciar o período de observações eram 465 fêmeas e 355 machos, os quais foram acasalados em diferentes proporções.

Foram adotadas diferentes combinações de número de machos e fêmeas, desde um macho para uma fêmea até uma razão de um macho para quatro fêmeas.

Os insetos foram mantidos à temperatura e umidade constantes, a 27-28°C e 70-80%, respectivamente. Durante todo o estudo, marrecos foram usados como fonte sanguínea.

Foram adotados dois ritmos de alimentação:

- inicialmente os barbeiros foram alimentados num ritmo irregular de oferta da fonte sanguínea, podendo variar entre 15 e 21 dias, por um período de pelo menos 45 dias;
- num segundo momento, após esse período de 45 dias, esses insetos passaram a ser alimentados num ritmo constante de oferta da fonte sanguínea, regularmente a cada 7 dias. Entre a 5ª e a 6ª observação foi provocada uma nova irregularidade na oferta de alimento, com o repasto sanguíneo sendo possibilitado somente no 12º dia após o último repasto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram considerados em termos de número de ovos por fêmea por dia (ofd), refletindo a fecundidade de colônias de *Triatoma infestans* mantidas há mais de 2 ou 3 décadas em condições artificiais de laboratório.

Pela Tabela observa-se que durante o período inicial, quando o ritmo de alimentação foi irregular, com oferta de repastos sanguíneos em intervalos de 15 ou 21 dias, a produtividade de ovos por fêmea por dia (ofd) esteve extremamente baixa, variando de 0,05 a 1,07 ofd, sendo mais freqüente taxas abaixo de 0,30 ofd.

Tabela. Taxa de oviposição (ovos/fêmea/dia) em colônias de *Triatoma infestans*, segundo o ritmo de alimentação

Ritmos de alimentação	Taxa de oviposição (ovos por fêmea por dia)		
	AMPLITUDE		
	Mínima	Máxima	Média
Irregular (15 ou 21 dias)	0,05	1,07	0,21
Regular (7 dias)	0,39	4,40	1,31

Quando adotado o segundo ritmo de oferta de fonte sanguínea, regularmente a cada 7 dias, houve aumento considerável na taxa de oviposição, que variou de 0,39 a 4,40 ofd, sendo mais freqüente 1,31 ofd.

Quando, novamente foi provocada uma irregularidade no oferecimento da fonte sanguínea, entre a 5ª e a 6ª observações (Figura 1), com repasto sanguíneo oferecido após um período de 12 dias, foi observada uma acentuada queda na taxa de oviposição, independentemente da razão sexual de acasalamentos que tivesse sido adotada (Figura 1). Ao ser retomado o ritmo de oferecimento de repasto sanguíneo irregular a cada 7 dias, a taxa de oviposição retornou ao nível anterior mais elevado.

As taxas de mortalidade observadas não foram afetadas pelo ritmo alimentar adotado. Assim sendo, 22,4% dos adultos

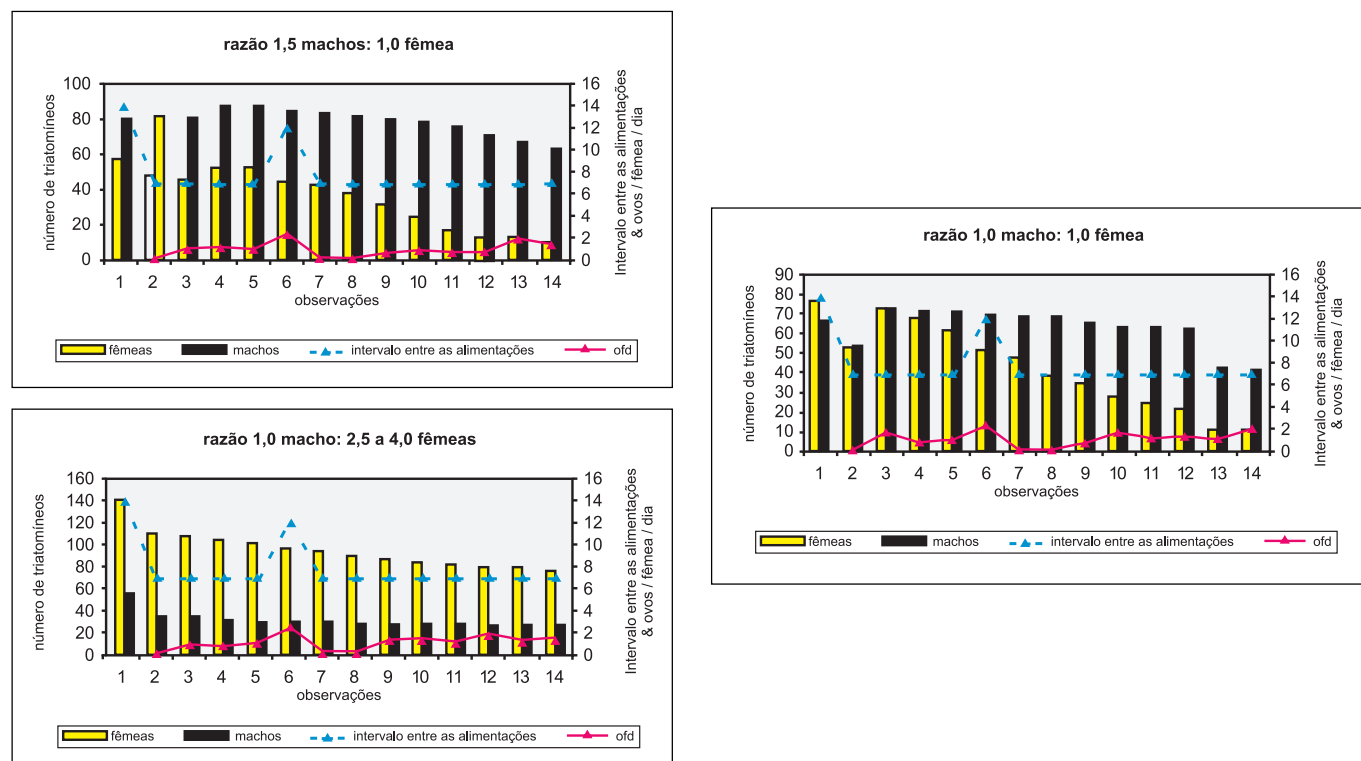


Figura 1. Taxa de oviposição e ritmo de alimentação das colônias de *Triatoma infestans*, mantidas a mais de duas ou três décadas em condições de laboratório, agrupadas segundo razão sexual de acasalamento adotado.

morreram durante o primeiro esquema de oferta de sangue, a cada 15 e 21 dias ao longo de 45 dias. No segundo esquema de alimentação, foi observada 41,3% de taxa de mortalidade quando o repasto sanguíneo foi oferecido a cada 7 dias, porém por um período de 105 dias. Ao final do período de observações, quando restaram vivas 216 fêmeas, haviam sido postos um total de 38.819 ovos.

De uma maneira geral, aceita-se que a manutenção prolongada de colônias de triatomíneos em condições artificiais de laboratório tendem a favorecer a uma deterioração da própria colônia. Alguns autores observaram que, mesmo após as primeiras gerações, os resultados relativos a tempo de evolução, oviposição e ingestão de sangue entre outros, já seriam diferentes¹¹.

Os resultados obtidos no presente estudo, em relação ao parâmetro biológico fecundidade/oviposição, assemelharam-se aqueles de Meirelles et al.⁸ para *D. maximus* quanto à quantidade de sangue ingerido.

Os resultados permitem concluir que a capacidade de oviposição e o prolongamento da existência ou “perpetuação” das colônias de *T. infestans*, mesmo após duas ou até três décadas de manutenção em condições de laboratório esteve preservada, não sendo verificada a deterioração para este parâmetro biológico, guardando sim uma estreita relação com a oferta regular de fonte sanguínea aos exemplares adultos.

Observou-se, ainda que após a adoção do ritmo semanal de oferta alimentar para os triatomíneos, foi a razão 1 macho: 1 fêmea aquela que resultou em melhor rendimento de número de

ovos produzidos, chegando a taxa de 4,40 ofd. Perlagora-Szumlewiez¹² encontrou produtividade de 4 até 8 ofd, tendo observado que quando a razão sexual foi 1 macho: 1 fêmea a produtividade era de 2,1-2,6 ofd. Quando a relação foi de 1 macho: 6 fêmeas a produção de ovos por fêmea por dia esteve reduzida para 0,30.

No presente estudo, as razões 1 macho: 1 fêmea ou 2 fêmeas foram aquelas que possibilitaram produções iguais ou superiores a 4 ofd. Exceto para uma única situação, todos os experimentos que tiveram uma razão sexual 1 macho: 3 fêmeas ou 4 fêmeas ou, ainda, mais de 2 machos: 1 fêmea a produtividade de ovos foi inferior a 1,3 ofd.

CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos nas condições trabalhadas, para as colônias de *Triatoma infestans* estudadas concluiu-se:

- A fecundidade e oviposição do *Triatoma infestans* sofreu interferência do ritmo alimentar a que os insetos foram submetidos.
- Favoravelmente à manutenção da fecundidade nessas colônias, na medida em que for definido ritmo regular de alimentação não superior a 7 dias.
- Que o ritmo de alimentação não afetou significativamente as taxas de sobrevivência, sendo, todavia, crítico para a manutenção de fecundidade e da capacidade de oviposição.

Oliveira Junior, O.C. et al. Maintenance of fecundity and oviposition in *Triatoma infestans* after decades of breeding under laboratory conditions. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):43-46, 2001.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the possibility of maintenance of fecundity and the capability of oviposition in Reduviid bugs after decades of breeding under laboratory conditions. It was observed the performance of eleven colonies of *Triatoma infestans* from the Laboratory of Triatomines of Adolfo Lutz Institute. Insects were mated in different ratio of males and females. Two rhythms of alimentation were used. In the first, triatomines were fed weekly, and in the second rhythm the meal were offered every fifteen or twenty one days. During all the study teals were used as blood source, and temperature and humidity were constant, at 27-28°C and 70-80%, respectively. The results confirm the importance of the rhythm of alimentation for oviposition. Insects fed weekley showed the best rates of oviposition, it was represented by number of eggs by female per day (efd), between 0.39 to 4.40 efd, being more frequent up to 1.30 efd. Colonies that were fed every fifteen or twenty one days showed inexpressives rates of oviposition, between 0.05 to 1.07 efd, being more frequent below to 0.30efd. It was concluded that after decades of breeding under laboratory conditions it is possible to maintain the fecundity, into normal patterns, in the *T. infestans* if the rhythm of alimentation of adults don't exceed seven days. Rhythm of alimentation don't affected the survival rates of adults, but it was critical for the fecundity and oviposition.

KEY WORDS. *Triatoma infestans*; fecundity; oviposition; biology; breeding laboratory.

REFERÊNCIAS

1. Borges-Pereira, J. et al. Xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. I. The sensitivity of *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*. **Rev. Soc. Bras. Med. trop.**, 29: 341-347, 1996.
2. Brumpt, E. Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la Trypanosomose de Chagas. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, 7: 706-710, 1914.
3. Corrêa, F.M.A. Estudo Comparativo do ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* alimentado em diferentes animais (Hemiptera, Reduviidae). **Papéis Avulsos Dep. Zool.**, São Paulo, 15: 177-200, 1962.
4. Dias, E. Criação de triatomíneos no laboratório. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 33: 407-412, 1938.
5. Goodchild, A.J.P. Some observations on growth and egg production of blood – sucking reduviids *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. **Proc. R. Entomol. Soc. Lond.** Ser. A, 30: 127-136, 1955.
6. Hack, W.H. Estudios sobre biología del *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hem., Reduviidae). **Ann. Inst. Med. Reg.**, 4: 125-147, 1955.
7. Lent, H.; Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas' disease. **Bull. Am. Nat. Hist.**, 163: 123-520, 1979.
8. Meirelles, D.J. et al. No change in one biological parameter for *Dipetalogaster maximus* after 20 years of laboratory colonisation. **Rev. Soc. Bras. Med. trop.**, 28: 53, 1995.
9. Minter, D.M.; Minter-Goedbloed, E.; Marshall, T.F. Comparative xenodiagnosis with three triatominae species of different hosts with natural and experimental species of chronic infections with *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Trans. R. Sec. Trop. Med. Hyg.**, 72: 84-91, 1978.
10. Moreira, C.J.; Perlowagora-Szumlewicz, A. Attempts to improve xenodiagnosis: comparative test of sensibility using *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma vitticeps* and *Triatoma infestans* in endemic areas of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 92: 91-96, 1997.
11. Perlogowagora-Szumlewicz, A. Estudos sobre a biologia do *T. infestans*, o principal vetor da doença de Chagas no Brasil. (Importância de algumas de suas características biológicas no planejamento de esquemas de combate a esse vetor). **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, 21: 117-159, 1969.
12. Perlowagora-Szumlewicz, A. Laboratory colonies of triatominae, biology and population dynamics. **Pan Am. Health Org. Sci. Publ.**, 318: 63-82, 1976.
13. Perlowagora-Szumlewicz, A.; Cruz, H.N.; Araújo, J.A.N. Species and stage interaction in the feeding behaviour of vectors of Chagas' disease (The importance of determinants in planning for greater efficacy and standardization of xenodiagnostic procedures). **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, 15: 139-150, 1973.
14. Perlowagora-Szumlewicz, A.; Muller, C. A. Studies in search of suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 1. Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 77: 37-53, 1982.
15. Perlowagora-Szumlewicz, A.; Muller, C.A. Studies in search of suitable experimental insect. Model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 2-Attempts to upgrade the reliability and the efficacy of xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 82: 259-272, 1987.
16. Santos, A.H.; Silva, J.G.; Rassi, A. A comparative study between natural and artificial xenodiagnosis in chronic Chagas' disease patients. **Rev. Soc. Bras. Med. trop.**, 28: 367-373, 1995.
17. Schenone, H.; Alvaro, E.; Rojas, A. Bases y rendimiento de xenodiagnóstico com la infección chagásica humana. **Bol. Chil. Parasitol.**, 29: 24-26, 1974.
18. Silva, R.L. **Aspectos da História Natural do *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera, Reduvidade, Triatominae)**. São Paulo, 1982. (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo).
19. Tolezano, J.E. et al. Efeitos do jejum e da temperatura em laboratório na infecção de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 43: 25-32, 1983.
20. Wigglesworth, V.B. **The principles of insect physiology**. 7th ed., London: Chapman & Hall, 1972. 827p.

Recebido em 09/04/1998; Aprovado em 10/05/2001

Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo.

III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA

Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo, Brazil. III. Anthropic action influence in the vectorial succession of ACL

José Eduardo TOLEZANO^{1*}
Helena Hilomi TANIGUCHI¹
Carlos Roberto ELIAS¹
Rui LAROSA¹

RIALA6/890

Tolezano, J.E. et al. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):47-51,2001.

RESUMO. As alterações ambientais e reduções na cobertura vegetal do Estado de São Paulo, ao longo do século XX, resultantes da ação do próprio homem, determinaram diferentes perfis epidemiológicos para a LTA em terras paulistas. Alterações significativas, também, foram verificadas na composição da fauna flebotomínica. *Lutzomyia intermedia s.l.* tornou-se a espécie presente em maior densidade nas áreas endêmicas no final deste século. Nesta investigação objetivou-se avaliar a importância da ação antrópica na perpetuação da LTA, hoje espalhada em todo o Estado de São Paulo. No município de Eldorado, Vale do Ribeira, foram definidos 3 ambientes para as coletas de flebotomíneos: i – interior de mata, ambiente não-modificado; ii – margem de mata, ambiente pouco modificado com a construção de um galinheiro experimental e iii – ambiente modificado pela ação antrópica com habitação humana, animais domésticos e cultivo de banana. Os ambientes florestados e aquele com pequena alteração revelaram maior diversidade de espécies de flebotomíneos, com predomínio de *L. fischeri*, *L. ayrozai* e *L. migonei*. No ambiente altamente alterado, *L. intermedia s.l.* constituiu a espécie predominante. A ação antrópica sobre o ambiente exerceu pressão decisiva na sucessão biológica das espécies de flebotomíneos.

PALAVRAS-CHAVE. Leishmaniose tegumentar americana; Psychodidae; Phlebotominae; ação antrópica; epidemiologia.

INTRODUÇÃO

As profundas alterações e reduções na cobertura vegetal do Estado de São Paulo, ao longo do século XX (São Paulo 1992)³⁷, determinaram diferentes perfis epidemiológicos para

a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em terras paulistas^{22,41,40}.

Como consequência das modificações ambientais, alterações significativas foram verificadas, também, em relação à composição da fauna flebotomínica. *Lutzomyia intermedia s.l.*

¹ Seção de Parasitoses Sistêmicas – Instituto Adolfo Lutz

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 351 – 8º andar – 01246-902 - São Paulo - SP

ganha destaque como espécie predominante a partir da segunda metade do século XX, quando grande parte da devastação florestal já fora perpetrada.

A ação antrópica sobre o ambiente não só foi decisiva na alteração da cobertura vegetal, como diversos estudos têm procurado mostrar que esse papel desempenhado pelo homem, acabou por determinar uma verdadeira sucessão vetorial, com reflexos na disseminação de focos de transmissão de *Leishmania* por todas as regiões do Estado de São Paulo (Barretto², Forattini^{7,8,9,11}, Forattini e Oliveira¹⁰, Forattini e Santos⁶, Forattini et al.^{12,13,14,15,16,17}, Gomes^{21,22,23,24}, Gomes et al.^{19,20,25,26,28,29,30,31}, Gomes e Galati²⁷, Galimberti e Katz¹⁸, Katz³², Condino et al.⁴, Domingos⁵, Camargo-Neves³).

A região do Vale do Ribeira, a partir da década de 70, torna-se importante área de transmissão autóctone e já apresenta feições de transmissão intra e/ou peridomiciliar, tendo registrado em 1993 um dos maiores coeficientes de incidência de LTA (403,4) por 100.000 habitantes^{5,36,41}.

No presente trabalho procurou-se estudar a importância da ação antrópica na sucessão vetorial que possibilitou a disseminação de focos de transmissão e a “perpetuação” da LTA no Estado de São Paulo, em particular no Vale do Ribeira, município de Eldorado, no período de outubro/1989 a setembro/1993.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Região de estudo

Estância Turística de Eldorado, limite sul da expansão da LTA no Estado de São Paulo, localizada no Vale do Ribeira, 243 km a sudoeste da Capital do Estado, entre os paralelos 24° 31' 07" de Latitude Sul e 48° 06' 28" de Longitude Oeste, altitude média de 80 m acima do nível do mar.

Apresenta área territorial de 1.712 km² e tem como divisas os municípios de Iporanga, Barra do Turvo, Jacupiranga, Registro e Sete Barras (Anuário Estatístico do Estado de São Paulo, SEADE, 1995)¹.

A região do Vale do Ribeira é considerada uma das menos desenvolvidas do Estado. Em termos socio-econômicos, manteve-se à margem do desenvolvimento observado no restante do Estado, principalmente em função da topografia acidentada e das condições de clima e solo que dificultaram as práticas agrícolas e da precariedade das vias de acesso à região. Apresenta poucas áreas apropriadas para a agricultura - cultura de banana, chá, e para a pecuária ao lado de outras com vegetação natural intacta ou pouco alterada.

Predominantemente, o relevo é montanhoso, mas ao sul encontram-se planícies cobertas de vegetação abundante. Inúmeros ribeirões recortam a região, todos tributários do rio Ribeira de Iguape. Saltos, cachoeiras e grutas contribuem na composição paisagística da área.

O rio Ribeira de Iguape nasce na serra de Paranapiacaba, no Estado do Paraná e deságua no litoral paulista, no município de Iguape, após percorrer 470 km, parte dos quais no município de Eldorado.

Segundo a Sociedade Brasileira de Espeleologia (1980), citado por Lepsch et al.³³, a região do Vale do Ribeira apresenta a maior concentração de cavernas calcárias do Brasil, muitas delas constituindo importantes sítios arqueológicos e paleontológicos, além de importante pólo turístico como a Caverna do Diabo em Eldorado.

O clima sofre influência de duas massas de ar, a Tropical Atlântica (influi na distribuição das chuvas) e a Polar Atlântica (responsável pelas baixas temperaturas, 2-3°C)³³.

A classificação climática de Köppen define o clima da região como tipo “CFA”, isto é, tropical úmido, sem estação seca, sendo a temperatura do mês mais quente superior a 22°C, chegando a 30-35°C e o total de chuvas do mês mais seco superior a 30 mm (média anual = 1619 mm)³³.

Os meses mais chuvosos são janeiro, fevereiro e março, excepcionalmente, dezembro, abril e maio, enquanto os meses mais secos concentram-se entre julho e setembro³⁴.

A cobertura vegetal do município é do tipo Floresta Tropical Latifoliada, caracterizada por árvores com 30 m ou mais de altura. A variação da composição dos tipos vegetais é resultado da interação de diversos fatores, tais como, condição climática, edáficas, etc. As espécies de maior ocorrência são: guapuruvu (*Schizolobium parahybum*), jatobá (*Hymenaea courbaril*), guatambú (*Aspidosperma olivaceum*), cedro (*Cedrela fissilis*), jequitibá (*Cariniana estrellensis*), caixeta (*Tabebuia cassinoides*), canela-amarela (*Ocotea aciphylla*), canela-preta (*Nectandra mollis*), entre outras³⁴.

Parte do município está protegida pelo Parque Estadual do Jacupiranga, que constitui área de preservação para fins de defesa da flora, fauna e belezas naturais da região, para atender a objetivos educacionais, recreativas e científicas (Decreto Lei nº 145, de 08.08.69)³⁴.

Neste município, ainda se encontram vastas áreas de florestas alteradas, capoeiras, área de reflorestamento e áreas de ação antrópica, que correspondem às áreas de agricultura, pastagens, núcleos urbanos e desmatamento³⁴.

2. Coleta de flebotomíneos

As coletas de flebotomíneos ocorreram em três ambientes distintos quanto à ação antrópica, durante o período de outubro/89 a set/93.

- i. **Interior de mata**, ambiente não-modificado pela ação antrópica.
- ii. Próximo à **margem de mata**, ambiente pouco alterado com a presença de um galinheiro experimental.
- iii. **Peridomicílio**, ambiente modificado pela presença da habitação humana, animais domésticos e cultivo de banana onde ocorreram casos de LTA humana.

Para a coleta dos flebotomíneos, foram utilizadas: armadilha de Shannon modificada, armadilhas luminosas, tipo Falcão, modificada e capturadores de Castro.

No interior de mata, as coletas foram feitas com uma armadilha luminosa instalada a 1 m do nível do solo, entre 19:00 e 9:00 hs, semanalmente, durante 4 anos.

No ambiente pouco modificado, à margem da mata, utilizou-se uma armadilha luminosa instalada no interior do galinheiro, entre 19:00 e 9:00 hs, semanalmente; dois indivíduos com capturadores de Castro aspiravam os insetos que pousavam nas paredes do ecótopo, no período das 19:00 e 22:00 hs, uma vez por semana. As capturas manuais e com os luminosos ocorriam em dias não-coincidentes.

No ambiente modificado pela ação antrópica, foram realizadas coletas com armadilha de Shannon, entre 19:00 e 22:00 hs, uma vez por semana e com armadilha luminosa, tipo Falcão, modificada, entre 19:00 e 9:00 hs, semanalmente em dia alternado à coleta com armadilha de Shannon, ambos instalados no peridomicílio.

Todos os insetos foram conservados em álcool 70°, diafanizados em lactofenol e montados entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese para identificação.

RESULTADOS

Foram coletados 8.471 flebotomíneos de 11 espécies.

No interior de mata e próximo à margem da mata observou-se uma maior diversidade de espécies com predomínio de *Lutzomyia fischeri* com 82,13% e 65,47%, respectivamente (Tabela).

L. intermedia s.l. aparece com 1,31% no ambiente não alterado, 12,22% no ambiente pouco modificado e predomínio absoluto no ambiente antropizado com 99,29% (Tabela).

DISCUSSÃO

Ao longo do século XX, o Estado de São Paulo passou por profundas alterações no que se refere à sua cobertura

vegetal; sem dúvida, tais modificações foram decorrentes da ação do homem, seja em projetos de colonização, ou de expansão das fronteiras agrícolas ou, principalmente, com a abertura das estradas de ferro.

Paralelamente a esta ação antrópica estabeleciam-se ao final do século XIX e início do XX, grandes surtos de LTA, o que levou ao rápido reconhecimento do caráter ocupacional da parasitose.

Na primeira metade do século XX, os focos conhecidos de LTA restringiam-se à margem esquerda do rio Tietê. Nenhum destaque era dado *L. intermedia* como vetor principal de *Leishmania*. *Lutzomyia whitmani*, *L. migonei*, *L. pessoai* e *L. fischeri* eram as espécies de flebotomíneos mais freqüentes no ambiente endêmico ou epidêmico, sendo que *L. fischeri* nunca foi encontrado naturalmente infectado por *Leishmania*³⁵.

Mais recentemente, a epidemiologia da LTA no Estado de São Paulo é caracterizada por micro-surtos e casos esporádicos, com multiplicidade de focos por todas as regiões paulistas, não mais restritos à margem esquerda do rio Tietê. O número anual de novos casos autóctones ultrapassa a cifra de 400 a 500^{18,19,22,25,26,32,39}.

A partir da segunda metade do século XX, particularmente após a década de 70, *L. intermedia s.l.* é reconhecida, pela sua densidade e antropofilia, como detentora de grande potencial vetorial, sendo marcante sua capacidade de vencer ambientes abertos e modificados.

Pelos resultados obtidos, expressos na Tabela, verificamos que:

- i. A presença do homem no ambiente rural e todas as modificações decorrentes de sua ação antrópica atuaram como pressão seletiva para uma menor diversidade de espécies e predomínio, quase que absoluto, de *L. intermedia s.l.*

Tabela – Número e percentual de flebotomíneos coletados por armadilhas luminosas, tipo Falcão, modificada e em armadilha de Shannon modificada nos distintos ambientes, no município de Eldorado, SP, Brasil, no período de out/89 a set/93

ESPÉCIE	Interior de mata		Margem de mata		Ambiente Alterado	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>L. intermedia</i>	17	1,31	224	12,22	5307	99,29
<i>L. fischeri</i>	1062	82,13	1200	65,47	17	0,32
<i>L. migonei</i>	70	5,40	337	18,39	14	0,26
<i>L. ayrozai</i>	133	10,29	58	3,16	6	0,11
<i>L. shannoni</i>	–	–	–	–	1	0,02
<i>L. firmatoi</i>	–	–	2	0,11	–	–
<i>L. edwardsi</i>	1	0,08	6	0,33	–	–
<i>L. monticola</i>	1	0,08	2	0,11	–	–
<i>L. pessoai</i>	9	0,70	2	0,11	–	–
<i>L. pascalei</i>	–	–	1	0,05	–	–
<i>Lutzomyia sp*</i>	–	–	1	0,05	–	–
TOTAL	1293	100	1833	100	5345	100

* Grupo Microps

Interior de mata – Ambiente florestal não modificado

Margem de Mata – Ambiente pouco modificado pela introdução de galinheiro

Ambiente alterado – Ambiente modificado pela ação antrópica (habitação humana e atividades agrícolas)

- ii. A maior adaptação de *L. intermedia s.l.* às condições modificadas poderia explicar sua importância como vetor, consideradas a acentuada densidade e a busca constante por fontes sanguíneas, especialmente humana.
- iii. No ambiente florestal, com a presença de fonte sanguínea representada pelo galinheiro, verificou-se o predomínio de *L. fisheri*, *L. migonei* e *L. ayrozai*. A presença esporádica do homem, a preservação do ambiente silvestre, ressaltada a introdução do galinheiro, parece favorecer a ocorrência de uma maior diversidade de espécies de flebotomíneos.
- iv. A análise comparativa entre os diferentes ambientes indicam, claramente, a dificuldade de *L. fisheri*, *L. migonei* e *L. ayrozai* vencerem as barreiras impostas pela ação antrópica. Permitem, ainda, especular que a adaptação de *L. intermedia s.l.* é de tal ordem que, praticamente, tornou-se a única espécie a frequentar o ambiente modificado; esta distribuição já fora verificada no município de São Roque, SP³⁸.
- v. No ambiente florestal, *L. fisheri* parece ser o mais adaptado. A esporádica presença de *L. intermedia s.l.* pode significar a manifestação da capacidade de frequentar ou colonizar este ambiente, como já houvera sido assinalada sua presença na primeira metade deste século, quando não ostentava qualquer importância.
- vi. Estas observações sobre *L. intermedia s.l.* no ambiente florestado poderiam sugerir, também, a existência de populações com hábitos e comportamentos diferentes, o que poderia levar a supor a existência de um complexo de espécies, já relatado para outros flebotomíneos.

CONCLUSÕES

Considerando a grande densidade e a reconhecida antropofilia de *L. intermedia s.l.*, fica evidente, pelos resultados obtidos, que a ação antrópica sobre o ambiente natural foi determinante pressão sobre a alteração da composição da fauna flebotomínica.

Considerando o sucesso de *L. intermedia s.l.* em vencer ambientes abertos e modificados, aliando-se seus atributos comportamentais e ecológicos que possibilitam a manifestação de seu potencial vetorial, é possível entender a disseminação e a atual perpetuação dos focos de LTA no Estado de São Paulo.

RIALA6/890

Tolezano, J.E. et al. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo, Brazil. III. Anthropogenic action influence in the vectorial succession of ACL. **Rev. Int. Adolfo Lutz**, 60(1): 47-51, 2001.

ABSTRACT. Different patterns in the Americana Cutaneous Leishmaniasis have been determined in the XXth Century due to environmental modifications by anthropic action. Modifications have been occurred in the sandfly composition, too. Observations were made in rural and periurban areas in Eldorado county, Ribeira Valley, São Paulo State for the purpose of evaluate the influence of anthropic action in the sandfly composition. The insects were caught around the house, at the edge and inside the forest, between October, 1989 and September, 1993. It was observed that the level of environmental modification produced considerable effect on the biological succession of the phlebotomine fauna, and suggested the difficulty that *L. fisheri*, *L. migonei* and *L. ayrozai* have in their attempt to overcome the barriers created by man. *L. intermedia s.l.* has adapted so well that is at present the only species which has successfully colonized the anthropic environment in the Ribeira Valley.

KEY WORDS. American Cutaneous Leishmaniasis; Psychodidae; Phlebotominae; anthropic action; epidemiology.

REFERÊNCIAS

1. Anuário Estatístico de São Paulo, SEADE, 1995.
2. Barretto, M.P. **Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae).** São Paulo, 1943. [Tese de Concurso de Docência Livre - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
3. Camargo-Neves, V.L.F.C. **Características da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil.** 1999 [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
4. Condino, M.L.F. et al. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região Sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. trop.**, 31(4): 355-360, 1998.
5. Domingos, M.F. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1981 a 1995.** São Paulo, 1997. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
6. Forattini, O.P.; Santos, M.R. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. **Arq. Hig.**, 17: 171-174, 1952.

7. Forattini, O.P. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares no Estado de São Paulo. **Arq. Fac. Hig. S. Públ. USP**, 7(2):157-167, 1953.
8. Forattini, O.P. Novas observações sobre a biologia dos flebotomíneos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). **Arq. Hig. Saúde Públ.**, 24(82): 209-215, 1960.
9. Forattini, O.P. Sobre os reservatórios naturais de leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 2: 195-203, 1960.
10. Forattini, O.P.; Oliveira, O. Focus of cutaneous leishmaniasis in a area of south of the State of São Paulo, Brazil. **Arch. Fac. Hig. Saúde Públ. USP**, 11: 23-34, 1957.
11. Forattini, O.P. Algumas observações sobre a biologia de flebotomos em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). **Arq. Fac. Hig. S. Públ. USP**, 8: 15-36, 1954.
12. Forattini, O.P. et al. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, 6: 255-261, 1972a.
13. Forattini, O.P. et al. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, 6: 431-433, 1972b.
14. Forattini, O.P. et al. Nota sobre a infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Rev. Saúde Públ.**, 7: 181-184, 1973a.
15. Forattini, O.P. et al. Nota sobre a leishmaniose tegumentar no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, 7: 447-452, 1973b.
16. Forattini, O.P. et al. Nota sobre um foco de leishmaniose na região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, 6: 103-105, 1972c.
17. Forattini, O.P. et al. Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, 10: 31-43, 1976.
18. Galimberti, M.Z.; Katz, G. Evolução da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo. **Bol. Inform. CVE**, 45: 3-5, 1995.
19. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 9 – Prevalência/ Incidência da infecção humana nos municípios de Pedro de Toledo e Miracatú, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 34(2): 149-158, 1992.
20. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8 – Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 32(2): 105-115, 1990.
21. Gomes, A.C. **Aspectos epidemiológicos sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil**. São Paulo, 1985 [Tese de Livre-Docência – Faculdade de Saúde Pública da USP].
22. Gomes, A.C. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, 65: 55-60, 1992.
23. Gomes, A.C. Sandfly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89: 457-460, 1994.
24. Gomes, A.C. **Observações ecológicas sobre *Psychodopygus intermedius* no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil**. São Paulo, 1979 [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].
25. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1 - Estudo experimental da frequência de flebotomíneos à ecótopos artificiais com referência especial à *Psychodopygus intermedius*. **Rev. Saúde Públ.**, 14: 540-556, 1980.
26. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 6 – Fauna flebotomínea antrófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 31(1): 32-39, 1989.
27. Gomes, A.C.; Galati, E.A.B. Aspectos ecológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5 - Estratificação da atividade espacial e estacional de Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícola da Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82(4): 467-473, 1987.
28. Gomes, A.C. et al. Flebotomíneos encontrados em galinheiros experimentais nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Brasil) e algumas observações ecológicas. **Rev. Saúde Públ.**, 12: 403-407, 1978.
29. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 2 - Ecótopo artificial como abrigo de *Psychodopygus intermedius* e observações sobre alimentação e reprodução sob influência de fatores físicos naturais. **Rev. Saúde Públ.**, 10: 149-159, 1982.
30. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. **Rev. Saúde Públ.**, 17: 23-30, 1983.
31. Gomes, A.C. et al. Ecological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis. 4 - Observations on the endophilic behaviour of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São Paulo State, Brazil. **Rev. Saúde Públ., São Paulo**, 20(4): 280-287, 1986.
32. Katz, G. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1997. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
33. Lepsch, I.F. et al. Macrozoneamento das terras da região do Rio Ribeira de Iguape, SP. **Bol. Cient. Inst. Agron. Campinas**, 19:1-181, 1990.
34. Mattos, I.F.A. **A fisionomia vegetal e suas relações com o meio físico na definição das unidades de paisagem na Alta Bacia do Rio Turvo, SP**. São Paulo, 1994. [Dissertação de Mestrado - Fac. Filosofia, Letras e Ciências Humanas - Departamento de Geografia - USP].
35. Pessoa, S.B.; Barretto, M.P. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Min. Ed. Saúde, 1948.
36. Rocha e Silva, E.O. et al. A leishmaniose tegumentar americana no litoral sul do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, 32: 9-25, 1980.
37. São Paulo 92: Perfil ambiental e estratégias - Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental-CETESB – São Paulo, 1992
38. Taniguchi, H.T. et al. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo, Brasil. I. Composição da fauna flebotomínea no município de São Roque, região de Sorocaba. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 51(1/2): 23-30, 1991.
39. Tolezano, J.E. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89(3): 427-434, 1994.
40. Tolezano, J.E. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo. Hypothetical patterns of *Leishmania (Viannia) braziliensis* circulation during last 102 years. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 92(Supl. I): 118, 1997.
41. Tolezano, J.E. et al. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 40: 49-54, 1980.

Recebido em 20/12/2000; Aprovado em 10/05/2001

Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência

Determination of cholesterol in meat:
comparison of colorimetric and hplc methods

Neura BRAGAGNOLO¹
Délia B. RODRIGUEZ-AMAYA^{1*}

RIALA6/891

Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 53-57, 2001.

RESUMO. Foram comparados os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e colorimétrico para determinação de colesterol em carnes. As etapas anteriores à quantificação são semelhantes nos dois métodos, consistindo da extração dos lipídios, saponificação e extração da matéria insaponificável. O método por CLAE utiliza uma coluna de C₁₈, fase móvel de acetonitrila:isopropanol (70:30) e detecção fixada em 210 nm. O método colorimétrico envolve a reação com ácido sulfúrico concentrado e ácido acético saturado com sulfato ferroso, e leitura a 490 nm 10 min após resfriamento. Foi analisado um total de 28 amostras de carnes bovina e suína. Não houve diferença significativa nos resultados obtidos pelos dois métodos para todas as amostras analisadas. Portanto, qualquer um dos métodos avaliados pode ser utilizado com segurança. O método colorimétrico é mais barato e rápido, mas precisa de controle rigoroso das condições da reação e utiliza reagentes corrosivos. O método por CLAE não exige atenção constante, mas é mais oneroso e requer experiência no uso do aparelho.

PALAVRAS-CHAVE. Carne; colesterol; colorimetria; CLAE.

INTRODUÇÃO

É bem reconhecido, atualmente, que cada país deve ter o seu próprio banco de dados sobre composição de alimentos, especialmente em relação aos componentes que afetam a saúde humana, positiva ou negativamente. A análise de alimentos, no entanto, é dispendiosa e complicada, e os métodos variam largamente em custo, exatidão, precisão e complexidade. São

imprescindíveis a validação e revalidação de métodos e são também requeridos, especialmente em países em desenvolvimento, vários métodos para cada analito, todos capazes de fornecer dados confiáveis, e passíveis de serem utilizados por laboratórios com recursos humanos e materiais diferentes.

O colesterol desempenha funções importantes no organismo humano. No entanto, uma taxa elevada de colesterol no sangue é um dos fatores de risco para doenças cardio-

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil, Fax: 55 19 32892832, e-mail: delia@fea.unicamp.br

vasculares, a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países. De acordo com a American Heart Association¹, para manter níveis adequados de colesterol sanguíneo, a dieta deve ter baixos teores de colesterol, lipídios e gordura saturada.

Valores encontrados na literatura para colesterol em carne variam largamente. Esta discrepância pode ser atribuída à variação natural das amostras devido aos fatores como tipo de corte, idade, raça e dieta do animal. Entretanto, um exame da literatura sobre colesterol em alimentos revela que diferenças podem ser geradas, em grande extensão, pelos diferentes métodos analíticos utilizados.

A determinação de colesterol tem sido realizada pelas seguintes técnicas analíticas: colorimétrica, enzimática e cromatográfica. O procedimento colorimétrico é o mais barato e tem sido o mais utilizado na determinação de colesterol em carnes^{3-5,9-12,15,16}. O método enzimático também é menos oneroso, no entanto, é pouco utilizado em amostras de carnes⁸. Os métodos cromatográficos, embora mais caros, são os mais específicos, pois além de separar os esteróis, separam outros possíveis interferentes. Para carne, muitos trabalhos empregaram cromatografia gasosa^{7,13,14}, com apenas um utilizando CLAE².

Assim, o presente trabalho teve por objetivo comparar um método por cromatografia líquida de alta eficiência e o

método colorimétrico de Bohac et al.³, para determinação de colesterol em carnes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Foram analisadas pelos dois métodos 28 amostras: 6 de lombo; 6 de pernil; 3 de leitão (pernil+lombo), 3 de couro, 4 de toucinho e 6 de carne bovina (contrafilé). As amostras de lombo, pernil e contrafilé foram adquiridas, ao acaso, em diferentes açougues de Campinas, São Paulo. Já as amostras de leitão, couro e toucinho foram provenientes da Fazenda Barra Dourada, Rio Brillhante, Mato Grosso do Sul, resultantes do cruzamento de suínos Agpic 405 (Hampshire com Landrace x Large White) e Camborough 15 (Duroc Pic com Landrace Pic x Large White Pic).

Todas as amostras foram homogeneizadas em um multiprocessador até obtenção de uma massa homogênea. Subamostras de 10g, em duplicatas, foram tomadas para análise.

2. Etapas iniciais

A Figura 1 apresenta o fluxograma analítico. Para ambos os métodos, os lipídios totais foram extraídos com clorofórmio:

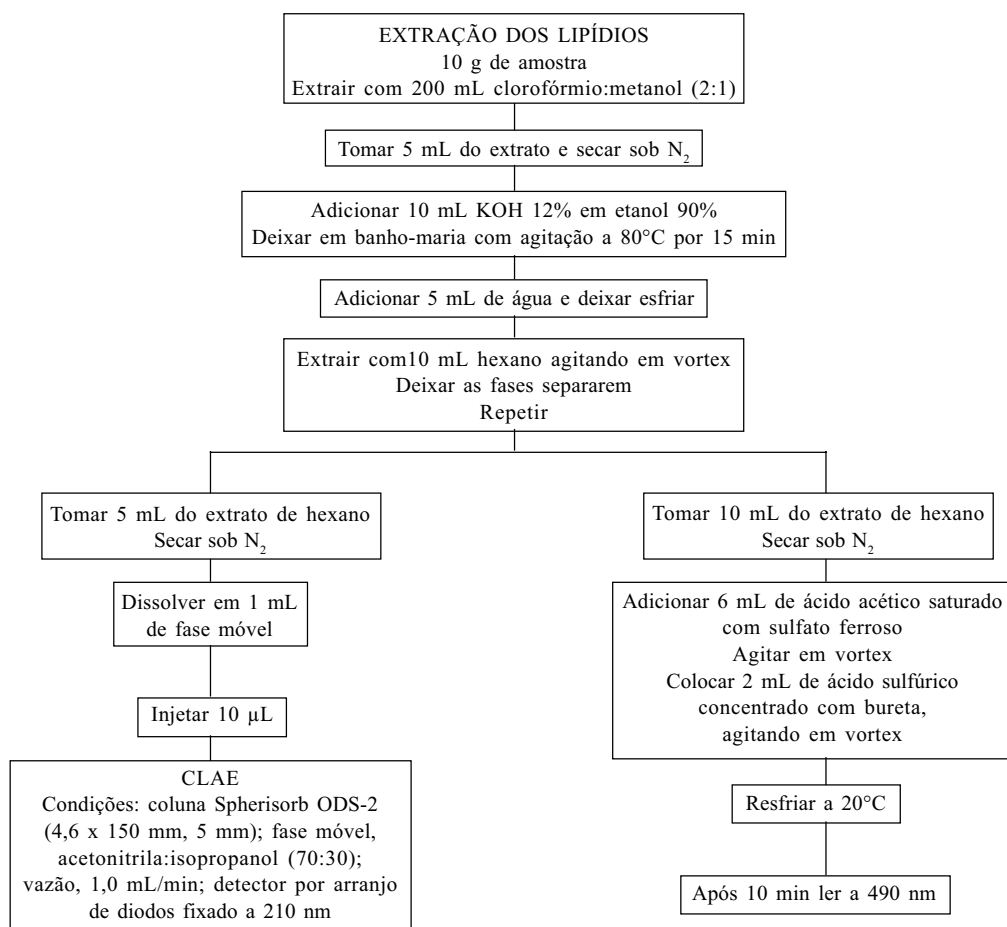


Figura 1. Fluxograma para determinação de colesterol por CLAE e por colorimetria

metanol (2:1) de acordo com Folch et al.⁶. A saponificação da gordura e a extração dos insaponificáveis foram realizadas de acordo com Bohac et al.³, otimizado por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁴.

3. Determinação de colesterol por colorimetria

Uma alíquota de 10 mL do extrato de hexano, contendo os insaponificáveis, foi seca sob N₂. Adicionou-se, em seguida, ácido acético saturado com sulfato ferroso (2,5 g de sulfato ferroso/L) e ácido sulfúrico concentrado. Após resfriamento em água gelada a 20°C e 10 minutos de repouso, a leitura foi feita a 490 nm. A curva de calibração foi construída com soluções de 50 a 200 µg de colesterol padrão submetidas à saponificação e ao desenvolvimento de cor.

4. Determinação do colesterol por CLAE

Uma alíquota de 5 mL da matéria insaponificável foi seca sob N₂, dissolvida em 1 mL de fase móvel, filtrada em membrana com poros de 0,45 µm e 10 µL foi injetada no cromatógrafo líquido.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido equipado com sistema ternário de solventes (VARIAN, 9010), válvula rotatória com alça de 10 µL, detector por conjunto de diodos (WATERS, 994) e um registrador (Hewlett-Packard, 2225 D). A coluna analítica usada foi Spherisorb ODS-2 (4,6 x 150 mm, 5 µm) precedida de coluna de guarda, Spherisorb ODS-2 (10 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu de acetonitrila:isopropanol (70:30) numa vazão de 1,0 mL/min. Todos os solventes usados foram grau cromatográfico, filtrados e desgaseificados em ultra-som antes do uso. O colesterol foi detectado a 210 nm e os espectros de absorvâncias obtidos entre 190 e 300 nm.

A identificação do colesterol foi baseada no tempo de retenção, co-cromatografia com padrão de colesterol e espectros de absorvância obtidos pelo detector conjunto de diodos no início, ápice e término do pico, os quais demonstraram a pureza do pico (Figura 2).

A quantificação foi feita por padronização externa, a curva de calibração sendo construída de 1,0 a 4,0 µg/10µL. A curva foi linear, passou pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras.

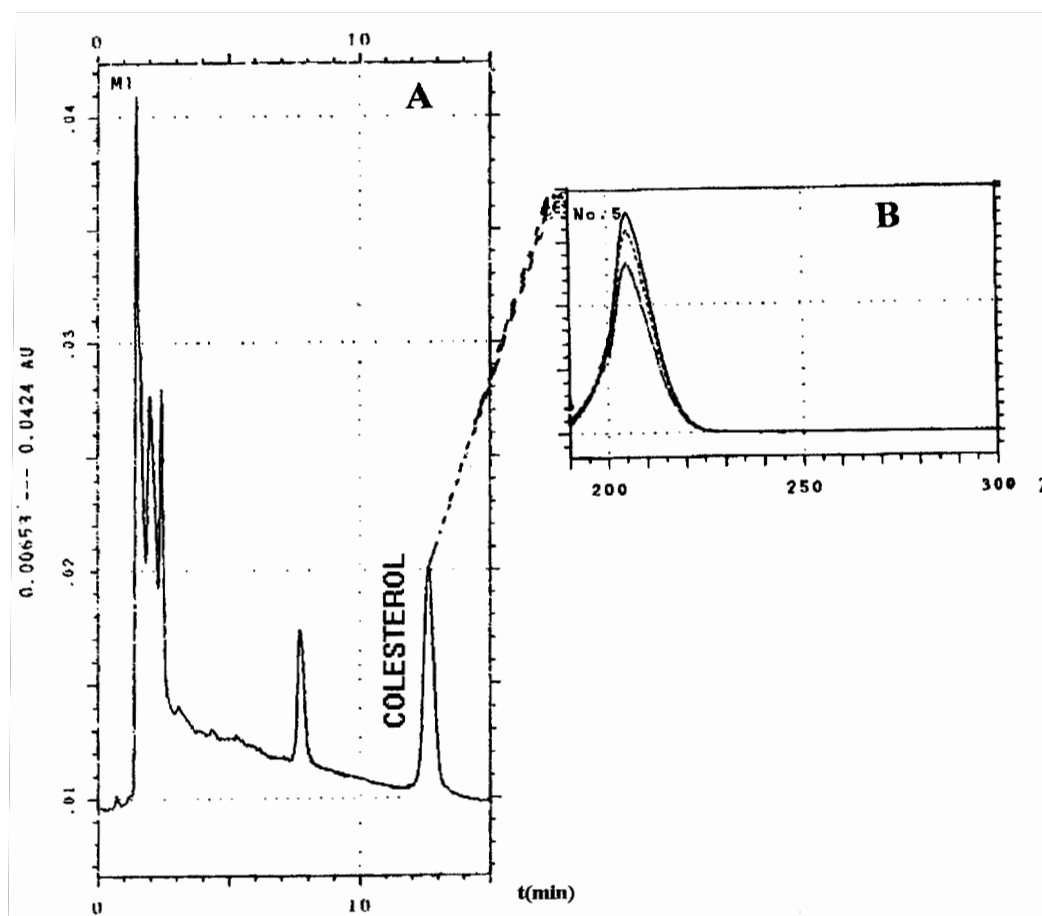


Figura 2. Cromatograma e Espectro de Absorvância Característico de Carne Suína
Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-2, 150 x 4,6 mm, 5µm; fase móvel, acetonitrila:isopropanol (70:30); vazão: 1,0 mL/min; detector de conjunto de diodos.

5. Teste de recuperação

Para verificar a exatidão dos métodos foi realizado um teste de recuperação adicionando-se dois níveis (25 e 50 mg) de colesterol à amostra.

6. Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças entre os dois métodos foi realizada análise de variância de um fator (“one way”) com o programa Statgraphics versão 4.0, 1989. A comparação entre as médias foi feita mediante Teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e as estimativas de desvios-padrões obtidos pelos métodos colorimétrico e por CLAE podem ser observados na Tabela 1.

A análise estatística mostrou que os resultados dos dois métodos foram equivalentes para as 28 amostras analisadas. Os desvios, que são praticamente iguais para os dois métodos, refletem as variações naturais das amostras e não variações analíticas. Os coeficientes de variação entre as duplicatas variaram de 0,1 a 7,9% (média de 2,4) para o método colorimétrico e de 0,0 a 3,5% (média de 1,3) para o método de CLAE. O método por CLAE mostrou melhor repetibilidade, mas a repetibilidade do método colorimétrico, que dependeu do controle rigoroso das condições de reação, foi satisfatória.

Bohac et al.³ obtiveram teores semelhantes de colesterol em carne com o método colorimétrico empregado no presente trabalho e um método utilizando cromatografia gasosa. Encontraram também alguns coeficientes de variação maiores e iguais a 8% pelo método colorimétrico.

Os resultados do teste de recuperação podem ser vistos na Tabela 2, mostrando boa recuperação para os dois métodos. Embora um dos coeficientes de variação do método colorimétrico tenha sido maior (8%), a repetibilidade dos dois métodos foi boa.

CONCLUSÃO

Tanto o método colorimétrico, como o método por CLAE, pode ser utilizado com segurança para amostras de carne.

Tabela 1. Resultados de colesterol (mg/ 100g) em amostras de carne obtidos pela comparação de colorimetria e CLAE

Corte	n	Método CLAE	Método Colorimétrico
		média ± dp	média ± dp
Lombo	6	36 ± 2 a	39 ± 5 a
Pernil	6	48 ± 5 a	43 ± 8 a
Couro	3	87 ± 12 a	86 ± 10 a
Toucinho	4	59 ± 14 a	58 ± 12 a
Leitão (lombo e pernil)	3	68 ± 15 a	71 ± 18 a
Carne bovina (contrafilé)	6	33 ± 6 a	32 ± 6 a

n = número de amostras analisadas

dp = estimativa de desvio-padrão entre as amostras

Os valores observados não apresentam diferença significativa a nível de 5%.

Tabela 2. Recuperação (%) dos métodos

Colesterol adicionado mg/100g de amostra	Colorimétrico		CLAE	
	média ± dp	%CV	média ± dp	%CV
25	100 ± 8	8,0	99 ± 3	3,0
50	94 ± 1	1,4	99 ± 2	2,0

dp = estimativa de desvio-padrão de duplicatas

Entretanto, o método colorimétrico, apesar de ser mais barato e rápido, precisa de controle rigoroso das condições de reação e utiliza reagentes corrosivos. Já o método por CLAE não exige atenção constante, mas é mais oneroso e requer experiência no uso do aparelho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RIALA6/891

Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B. Determination of cholesterol in meat: comparison of colorimetric and hplc methods. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):53-57,2001.

ABSTRACT. A colorimetric method and an HPLC method were compared for the determination of cholesterol in meat. The steps preceding measurement were similar, consisting of extraction of the lipids, saponification and extraction of unsaponifiable matter. The HPLC method utilized a C₁₈ column with acetonitrile:isopropanol (70:30) as mobile phase; detection was set at 210 nm. The colorimetric method involved reaction with concentrated sulfuric acid and acetic acid saturated with ferrous sulfate, the absorbance being measured at 490 nm 10 minutes after cooling. No significant difference was seen in the

results of the two methods for the 28 samples of different cuts of pork and beef analyzed; thus, either method can be reliably used. The colorimetric method is rapid and low-cost, but requires rigorous control of reaction conditions and uses corrosive reagents. The HPLC method does not need constant attention, but is expensive and requires experience in the operation of the instrument.

KEY WORDS. Meat; cholesterol; HPLC; colorimetric.

REFERÊNCIAS

1. American Heart Association. **Dietary Guidelines for Healthy American Adults** (http://www.americanheart.org/Heart_and_Stroke_A_Z_Guide/dietg.html), 29/01/2001.
2. Arneth, W.; Al-Ahmad, H. Cholesterol und seine ester in fleisch – Analytik und Gehalte. **Mitteilungsblatt**, 112: 201-208, 1991.
3. Bohac, C.E. et al. Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. **J. Food. Sci.**, 53(6): 1642-1644, 1988.
4. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de colesterol em carne de frango. **Rev. Farm. Bioquím. USP**, 28(2): 122-131, 1992.
5. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de colesterol em carne suína e bovina e efeito do cozimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 15: 11-17, 1995.
6. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol Chem.**, 226: 497-509, 1957.
7. Heymann, H. et al. Sensory and chemical characteristics of fresh pork roasts cooked to different endpoint temperatures. **J. Food. Sci.**, 55(3): 613-617, 1990.
8. Hutchison, G.I.; Greenfield, H.; Wills, R.B.H. Composition of Australian foods. 35. pork. **Food Tech. Australia**, 39(5): 216-222, 1987.
9. Kritchevsky, D.; Tepper, S A. The free and ester sterol content of various foodstuffs. **J. Nutr.**, 74: 441-444, 1961.
10. Morgan, J.B.; Calkins, C.R.; Mandigo, R.W. Effect of trim level, cooking method, and chop type on lipid retention, caloric content, and cholesterol level in cooked pork. **J. Food Sci.**, 53(6): 1602-1604, 1988.
11. Prusa, K.J.; Hughes, K.V. Cholesterol and selected attributes of pork tenderloin steaks heated by conventional, convection and microwave ovens to two internal endpoint temperatures. **J. Food Sci.**, 51(5): 1139-1140, 1986.
12. Reitmeier, C.A.; Prusa, K.J. Cholesterol content and sensory analysis of ground pork as influenced by fat level and heating. **J. Food Sci.**, 52(4): 916-918, 1987.
13. Sahasrabudhe, M.R.; Stewart, L. Total lipid and cholesterol in selected retail cuts of Canadian beef. **Can. Inst. Food Sci. Technol.**, 22: 83-85, 1989.
14. Slover, H.T. et al. The lipid composition of raw and cooked fresh pork. **J. Food Comp. Anal.**, 1: 38-52, 1987.
15. Swize, S.S. et al. Cholesterol content of lean and fat from beef, pork, and lamb cuts. **J. Food Comp. Anal.**, 5: 160-167, 1992.
16. Tu, C.; Powrie, W. D.; Fenema, O. Free and esterified cholesterol content of animal muscles and meat products. **J. Food Sci.**, 32: 30-34, 1967.

Recebido em 07/02/2001; Aprovado em 13/06/2001

Variação de alguns parâmetros do mel de melato em relação ao mel floral

Comparison of some components between floral honey and honeydew honey

Gisélia CAMPOS^{1*}
Regina Célia DELLA MODESTA²
Teófilo José Pimentel da SILVA³
Délio Soares RASLAN⁴

RIALA6/892

CAMPOS, G. et al. Variação de alguns parâmetros do mel de melato em relação ao mel floral. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):59-64,2001.

RESUMO. O mel de melato que é produzido a partir de secreções de partes vivas das plantas difere do mel floral em vários aspectos. Foram analisadas 14 amostras de mel floral e 11 amostras de mel de melato provenientes de Minas Gerais e de Santa Catarina, assim classificadas de acordo com os métodos de Kirkwood e de White. Foram realizadas as determinações de pH, reação de Lund, viscosidade e condutividade. Foi aplicado o teste exato de Fisher que demonstrou haver associação entre mel de melato e pH acima de 4,2, reação de Lund abaixo de 0,6 e viscosidade acima de 19,4. Foram analisadas misturas contendo diferentes proporções de mel de melato em mel floral e determinados os valores para polarimetria, condutividade, pH, resíduo mineral fixo, açúcares redutores e viscosidade. À medida que aumentou a concentração do mel de melato houve uma alteração significativa nos valores das variáveis analisadas, verificada pelo coeficiente de regressão b. Foi demonstrado que algumas medidas como pH e viscosidade podem ser aplicadas como critério de diferenciação entre estes dois tipos de mel.

PALAVRAS-CHAVE. Mel; mel de melato; características físico-químicas.

INTRODUÇÃO

O mel, sendo produzido naturalmente pelas abelhas, pode ser elaborado a partir do néctar das flores, mel floral, ou de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas, mel de melato.

Em Santa Catarina ocorre o mel de melato da bracatinga (Leguminosae Mimosoideae *Mimosa sp*), produzido de dois em dois anos, época que corresponde ao ciclo da cochonilha¹⁴. Na Espanha ocorre o mel de bosque (*Quercus sp*), assim denominado para designar o mel que contém mistura de mel floral e mel de melato⁴. Em certas regiões da Europa o mel de melato é

¹ Fundação Ezequiel Dias, Divisão de Bromatologia e Toxicologia, Serviço de Química Bromatológica.

² Embrapa Agroindústria de Alimentos - Rio de Janeiro, RJ.

³ Faculdade de Veterinária da UFF - Niterói, RJ.

⁴ Departamento de Química ICEX Universidade Federal de Minas Gerais, BH-MG.

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

melhor aceito do que o floral. Já para os norte-americanos, este é considerado inferior ao mel floral em relação à aparência¹⁶. Os insetos sugadores são vários e dentre as plantas por eles atacadas estão *Rutaceae* (Citrus), *Compositae*, *Mimosoideae* Rubiaceae (café) etc.^{3,12}.

De acordo com Doner⁸ e Siddiqui¹⁶ o mel de melato apresenta uma composição diferente do mel floral: contém menor teor de açúcares redutores, maior pH e maior teor de cinzas. Outras propriedades como condutividade elétrica e viscosidade são citadas na literatura por apresentarem diferentes valores para estes dois tipos de mel¹¹. A legislação para mel vem sendo modificada e atualmente estabelece valores diferentes para estes dois tipos de mel em relação a cinzas, açúcares redutores e sacarose aparente^{5,6}.

Kirkwood et al.^{9,10} estabeleceram uma equação baseada em estudos matemáticos para ser aplicada utilizando os resultados de pH, cinzas e açúcares redutores na matéria seca, obtendo uma função discriminativa X cujo valor mínimo para mel floral é de 73,1. White¹⁸ determinou a rotação ótica de 468 amostras de mel, e converteu os valores encontrados para a “International Sugar Scale” propondo um valor de -2°S para indicar mel com apreciável teor de melato.

O mel de melato, sendo uma ocorrência natural, precisa ser caracterizado e identificado para que seja possível haver um controle sobre a qualidade do produto. É preciso estar atento ao mercado consumidor para que haja uma boa aceitação, principalmente pelo mercado externo que é mais exigente, inclusive o Mercosul.

A finalidade deste trabalho foi estudar as características do mel floral e do mel de melato através de análises físico-químicas. Para os parâmetros determinados quantitativamente como pH, condutividade, viscosidade e outros, foi aplicada avaliação estatística para estabelecer a relação entre os valores encontrados e o tipo de mel. Estes mesmos parâmetros foram analisados em misturas preparadas com quantidades conhecidas de mel floral e mel de melato, a fim de determinar como os valores variavam à medida em que era aumentado o teor de mel de melato.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem e Preparo da Amostra

As amostras de mel foram colhidas aleatoriamente entre o período de 02/01/93 a 30/06/96, sendo 04 amostras mel de melato de Santa Catarina e 21 amostras de apiários localizados em Minas Gerais. As amostras foram classificadas em mel de melato ou floral, de acordo com Kirkwood e White (Campos, 1998)⁷, conforme o quadro 1.

Preparo da amostra

Mel líquido: a amostra, quando livre de granulação, foi bem homogeneizada com o bastão de vidro. Quando granulado, colocou-se o mel em um recipiente fechado em banho-maria sem submergir e aqueceu-se por 30min a 60°C. As análises foram realizadas imediatamente após colhidas, sendo armazenadas à temperatura ambiente durante o período da análise.

Quadro 1. Classificação do mel em floral e mel de melato de acordo com Kirkwood e com White

Nº da amostra	Classificação conforme Kirkwood	Classificação conforme White
1	mel floral	mel floral
2	mel floral	mel floral
3	mel floral	mel floral
4	mel de melato	mel de melato
5	mel de melato	mel de melato
6	mel de melato	mel de melato
7	mel de melato	mel de melato
8	mel de melato	mel de melato
9	mel floral	mel floral
10	mel de melato	mel floral
11	mel floral	mel de melato
12	mel de melato	mel floral
13	mel de melato	mel de melato
14	mel floral	mel floral
15	mel de melato	mel de melato
16	mel floral	mel floral
17	mel floral	mel floral
18	mel floral	mel floral
19	mel floral	mel floral
20	mel floral	mel floral
21	mel floral	mel floral
22	mel de melato	mel de melato
23	mel de melato	mel de melato
24	mel floral	mel de melato
25	mel floral	mel floral

Fonte: Campos, 1998⁷

Foram também analisadas misturas preparadas contendo 5, 10, 15, 20, 25 e 30% de mel de melato em mel floral.

2. Análise físico-química

Foram determinados:

2.1. Resíduo mineral fixo (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985)¹³

2.2. Reação de Lund (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985)¹³

2.3. pH (Brasil, 1981)⁵

2.4. Condutividade elétrica (Brasil, 1981)⁵

2.5. Açúcares Redutores (AR) por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível (Campos, 1998)⁷.

Foi preparada uma solução de mel a 1%, clarificada com creme de alumina. Desta solução foi preparada a solução de trabalho a 0,05%, da qual pipetou-se 1mL para a reação com o ácido 3,5- dinitrossalicílico. Utilizou-se curva padrão de glicose e a leitura foi feita a 540nm.

2.6. Polarimetria (AOAC, 1990)²

Pesou-se 26g de mel e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Adicionou-se cerca de 1g de creme de alumina, completou-se o volume e filtrou-se. Para completar a mutarrotação, a amostra ficou em repouso 24 horas. A leitura foi feita em polarímetro digital Perkin Elmer 341, com lâmpada de Na a 589,3 nm e tubo de 100 mm de comprimento, acoplado a banho de água circulante a 20°C.

Os valores de rotação angular foram convertidos para a **International Sugar Scale (ISS)**, aplicando-se a fórmula seguinte:

$$^{\circ}\text{S} = \frac{\text{Leitura} \times 2 \times 0,26}{0,3462}$$

1°S = 0,3462 graus angulares. A multiplicação por 2 deve ser feita somente quando o tubo utilizado for de 1 dm, pois os valores em ISS requerem tubo de 2 dm (White, 1980)¹⁸.

2.7. Determinação da viscosidade (Campos, 1998)⁷

Os dados reológicos foram medidos em viscosímetro marca Contraves modelo Rheomat 30 à temperatura de 20°C. Os experimentos foram realizados em reômetro de cilindros concêntricos (Contraves Rheomat 30) acoplado ao programador Rheoscan 100, banho termostático e registrador gráfico

(Rikadenk). O sistema de medida padrão utilizado foi o Din 8. A amostra foi submetida à taxa de deformação variando linearmente de 0 (zero) a 452 s⁻¹, durante 4 minutos em velocidade crescente.

3. Delineamento Experimental

Em ambas as classificações (de Kirkwood e White), para se estudar a associação entre as categorias de mel (floral ou melato) e os aspectos quantitativos estudados (pH, reação de Lund, condutividade, viscosidade) utilizou-se o teste exato de Fisher.

Para se estudar o efeito da adição gradativa de melato no mel floral sobre suas características físico-químicas (polarimetria, condutividade, pH, resíduo mineral fixo, açúcares redutores e viscosidade) foi feita uma análise de regressão para cada uma dessas características, sendo o percentual adicionado de melato a variável independente. O coeficiente de regressão encontrado foi testado pelo teste t de Student¹⁷. O nível de significância foi calculado com 95% de confiança. Os cálculos estatísticos foram feitos em computador utilizando-se o Sistema de Análise Estatística¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados da tabela 1, o mel de melato proveniente do estado de Santa Catarina (amostras 4, 5, 22 e 23)

Tabela 1. Valores obtidos pelas análises físico-químicas de mel floral e mel de melato

Amostra	Resíduo mineral fixo (%)	pH	Açúcares redutores %	Reação de Lund (mL)	Condutividade (ms/cm a 20°C)	h (Pa.s)
1	0,39	4,1	71,40	1,2	1002	10,0
2	0,31	4,2	71,48	1,2	840	10,3
3	0,21	4,0	70,44	1,4	545	15,7
4	0,74	4,9	67,20	0,6	1858	36,0
5	0,66	4,7	62,17	0,9	1580	26,9
6	0,10	4,1	58,01	1,0	207	45,7
7	0,11	3,9	58,09	1,0	417	10,9
8	0,11	4,0	59,88	0,8	203	51,7
9	0,60	4,4	71,11	1,0	1350	7,2
10	0,34	4,6	60,72	1,0	830	46,3
11	0,09	4,5	65,44	0,9	265	35,8
12	0,07	4,7	64,72	0,6	433	30,3
13	0,06	4,3	61,64	0,4	234	20,1
14	0,06	4,2	65,70	0,5	266	28,8
15	0,02	4,0	61,93	0,5	163	6,2
16	0,29	4,2	77,11	1,3	341	47,3
17	0,21	3,8	68,97	1,0	302	8,2
18	0,09	4,1	70,47	1,8	329	13,5
19	0,12	3,9	71,48	1,2	356	6,7
20	0,06	3,9	70,51	1,2	508	4,7
21	0,10	4,1	73,67	1,7	465	19,4
22	6,47	5,1	55,73	0,5	1850	23,7
23	0,28	5,3	58,22	0,4	1676	31,6
24	0,11	3,8	66,06	0,6	222	15,7
25	0,13	4,0	66,92	0,7	320	27,1

apresentou valores mais altos de pH, o que está de acordo com a literatura^{8,16}.

A tabela de contingência 2 mostra a frequência de amostras de mel de melato e floral, com valores de pH abaixo e acima de 4,2. De acordo com Kirkwood, das 14 (quatorze) amostras classificadas como floral, 12 apresentaram valor de pH abaixo e duas acima de 4,2. Das 11 (onze) amostras classificadas como mel de melato, 4 (quatro) apresentaram valor de pH abaixo e sete acima de 4,2. Isto demonstra haver uma associação significativa ao nível de 5%, entre mel de melato e valores de pH acima de 4,2. Já com as mesmas amostras classificadas em mel floral ou de melato de acordo com o critério de White, houve uma evidência desta associação que não foi comprovada estatisticamente, face à amostragem reduzida dos dois tipos de mel e a dispersão dos valores de pH encontrada.

Tabela 2. Frequência de amostras de mel de melato e floral, com valores de pH abaixo e acima de 4,2

		Kirkwood pH ≤ 4,2 > 4,2		White pH ≤ 4,2 > 4,2	
Floral		12	2	11	3
Melato		4	7	5	6
		p < 0,02		p < 0,12	

Os resultados da Tabela de contingência 3, relativos ao teste de Lund, foram utilizados para verificar se os méis classificadas como melato ou floral estão associados com valores abaixo ou acima de 0,6mL através do teste exato de Fisher. Em relação a Kirkwood e White, dos 14 méis florais, 2, ou seja, aproximadamente 14% apresentaram resultado inferior a 0,6 mL. Quanto aos méis de melato 6 de 11 amostras (54%) apresentaram resultado nesta faixa. Contudo, o teste de Fisher não foi significativo pois com esta dispersão de amostras não foi possível detectar a diferença, embora os dados a sugiram. Uma amostragem maior poderia levar a resultados conclusivos, em relação à associação entre mel de melato e valores abaixo de 0,6 mL para o teste de Lund.

A Res. 12/78 CNNPA indica valores de 0,6 a 3,0 mL para o mel floral¹.

Em relação à condutividade, apesar das amostras de mel de melato da bracinga (4, 5, 22 e 23) terem apresentado valores

Tabela 3. Frequência de amostras de mel de melato e floral, com valores do teste de Lund abaixo e acima de 0,6mL de precipitado obtido na reação.

		Kirkwood ≤ 0,6mL > 0,6		White ≤ 0,6mL > 0,6	
Floral		2	12	2	12
Melato		6	5	6	5
		p < 0,08		p < 0,08	

elevados, o que está de acordo com Kubisova e Mastny¹¹ e Bonvehi et al.⁴, nem todas as outras classificadas como mel de melato apresentaram tais valores. E ainda a amostra 1, classificada como floral, apresentou resultado semelhante ao mel de melato da bracinga. Aplicando-se o teste de Fisher aos resultados encontrados, não foi possível estabelecer uma associação entre mel floral ou de melato com valores de condutividade abaixo ou acima de 600 ms/cm a 20°C, que foi o valor médio das 25 amostras analisadas (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de amostras de mel de melato e floral, com valores de condutividade abaixo e acima de 600 ms/cm a 20°C

		Kirkwood ≤ 600 > 600 µs/cm		White ≤ 600 > 600 µs/cm	
Floral		11	3	10	4
Melato		6	5	7	4
		p < 0,4		p < 1,0	

Em relação à viscosidade, foi observado que o mel de melato apresentou resultados mais altos que o mel floral, portanto mais viscoso. Foi aplicado o teste exato de Fisher, estabelecendo-se o limite de 19,4 Pa.s, cujas frequências de mel de melato e floral com valores acima e abaixo deste limite, estão na Tabela de contingência 5.

Foi demonstrado haver uma associação entre valores de viscosidade acima de 19,4 Pa.s e mel de melato, pois de acordo com a classificação de Kirkwood o teste foi significativo ao nível de 5% (p<0,02), sendo que 82% dos méis de melato apresentaram valores superiores a 19,4 e apenas 29% dos méis florais apresentaram valores nesta faixa. Para os méis classificadas pelo método de White o resultado não foi significativo (p<0,11), embora 73% dos méis de melato tivessem apresentado valor superior a 19,4 Pa.s. Logo, valores acima de 19,4 Pa.s são indicativos que o mel é de melato.

Tabela 5. Frequência de amostras de mel de melato e floral, com valores de viscosidade abaixo e acima de 19,4 Pa.s.

		Kirkwood ≤ 19,4 > 19,4 Pa .s		White ≤ 19,4 > 19,4 Pa .s	
Floral		10	4	9	5
Melato		2	9	3	8
		p < 0,02		p < 0,11	

Em relação à amostra 22, o valor discrepante de Resíduo mineral fixo ocorreu provavelmente devido ao processo de fumigação mal conduzido. Este resultado não influenciou na classificação, por ser uma amostra previamente conhecida como mel de melato da bracinga, colhida em Santa Catarina.

As misturas preparadas para conter 5, 10, 15, 25 e 30% de mel de melato foram analisadas quanto à polarimetria, condutividade, pH, resíduo mineral fixo, açúcares redutores e viscosidade (Tabela 6). Foi observado que o mel floral é levorrotatório e o mel de melato é dextrorrotatório. As misturas são levorrotatórias, mas à medida que aumenta a quantidade de mel de melato, o valor em °S tende para zero. A condutividade do mel floral é bem menor que a do mel de melato. Os valores aumentam à medida que aumenta a quantidade de mel de melato nas misturas. Os açúcares redutores estão presentes em maior quantidade no mel floral e diminuem à medida que aumenta a quantidade de mel de melato. As cinzas apresentaram valores menores no mel floral e tendem a aumentar com o aumento da quantidade de mel de melato nas misturas. E a viscosidade aumenta à medida que aumenta a presença de melato na mistura. Foi aplicada a regressão linear aos resultados (Tabela 7) mostrando que, à medida que aumentou a concentração do mel de melato misturado ao mel floral houve uma alteração

significativa nos valores das variáveis analisadas, verificada pelo coeficiente de regressão b.

Tabela 7. Análise por Regressão Linear dos resultados da análise de misturas de mel floral com mel de melato nas proporções de 5, 10, 15, 20 e 25% de mel de melato

Variável Y	Coeficiente linear a	Coef. regressão b	Coef. determinação r ²
Polarimetria	- 1,07	0,03*	0,9810
Condutividade	335,53	13,817*	0,9431
PH	4,0302	0,011163*	0,7880
Resíduo mineral fixo	0,1209	0,0046*	0,7929
Açúcares Redutores	72,3720	-0,1301*	0,8693
Viscosidade	27,4800	0,1897*	0,6633

* Resultados significativos, indicando que para cada aumento de 1% de melato, há um aumento ou diminuição de b unidades na variável y

Tabela 6. Alguns parâmetros físico-químicos determinados em misturas de mel floral contendo diferentes quantidades de mel de melato (f+ m)

Amostra	Polarimetria °S	Condutividade µs/cm	pH	Açúcares redutores %	Cinzas %	Viscosidade h (Pa.s)
Mel floral 25	-2,400	320	4,0	66,92	0,13	27,1
Mel de melato 23	+2,373	1676	5,3	58,22	0,28	31,6
Mistura 95+5	-0,943	414	4,1	71,69	0,10	29,9
Mistura 90+10	-0,738	501	4,2	70,57	0,20	29,2
Mistura 85+15	-0,562	483	4,1	70,97	0,25	28,3
Mstura 80+20	-0,396	611	NE	NE	0,29	31,2
Mistura 75+25	-0,312	706	4,3	69,63	0,27	31,8
Mistura 70+30	-	749	4,4	67,94	0,30	34,4

NE = não efetuado

CONCLUSÕES

A medida de viscosidade pode ser considerada como critério de diferenciação entre mel floral e mel de melato, pois cerca de 82% do mel de melato classificado de acordo com Kirkwood apresentou valores acima de 19,4 Pa.s.

Valores de pH acima de 4,2 indicam a presença de melato no mel, pois 64% das amostras classificadas como mel de melato de acordo com Kirkwood apresentaram pH nesta faixa.

A condutividade elétrica mostrou-se eficiente somente para mel de melato puro. Tratando-se de mel de melato em mistura com mel floral, não apresentou resultado conclusivo.

A variação dos resultados da rotação ótica nas misturas, demonstrou que este é um parâmetro que pode ser usado para classificação do mel em floral ou mel de melato, confirmando o critério de White.

A variação dos resultados de açúcares redutores nas misturas confirmou que este parâmetro é decisivo no cálculo da equação de Kirkwood para classificar o mel em floral ou mel de melato.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RIALA6/892

CAMPOS, G. et al. Comparison of some components between floral honey and honeydew honey. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):59-64, 2001

ABSTRACT. Honeydew honey differs of the floral honey in many aspects. In order to check that eleven honeydew honey and fourteen floral honey were analysed for pH, Lund reaction, conductivity and viscosity. The Fisher test was applied to check if there was any association between the kind of honey and the quantitative aspects of this study. It was demonstrated that there is association between honeydew honey and the pH above 4,2, Lund reaction below 0,6 mL and viscosity above 19,4. In order to study the effects of a gradative addition of honeydew honey on floral honey and its characteristics such as polarimetry, conductivity, pH, ashes, reducing sugars and viscosity, a linear regression analysis of these characteristics, was done using a blend of both kind of honey. It was observed by the regression coefficient b that the floral honey mixed with honeydew honey showed a significative modification of variables studied when the concentration of honeydew honey was increased.

KEY WORDS. Honey; honeydew; physical and chemical characteristics.

REFERÊNCIAS

1. ABIA. Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. Compêndio da Legislação Brasileira de Alimentos. Revisão n.5, São Paulo; 1992.
2. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13. ed., Washington D.C.; 1980 – 1995. 1018p.
3. Barth, O.M. **O Pólen Brasileiro**. Rio de Janeiro: Editora Luxor; 1989. 150 p.
4. Bonvehí, J.S.; Pajuelo, A.G.; Galindo, F.G. Composición, Propiedades Físico-químicas y Espectro Polínico de Algunas Mielles Monoflorales de España. **Alimentaria**, 24(185): 61-84, 1987.
5. Brasil. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Lanara-Método Analítico Oficial para controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II - Métodos Físicos e Químicos. Brasília; set. 1981.
6. Brasil. **Ministério da Agricultura**. DAS/DIPOA. Instrução Normativa nº 11, de 20 de Outubro de 2000.
7. Campos, G. **Melato no mel e sua determinação através de diferentes metodologias**. Belo Horizonte, 1998. [Tese de Doutorado em Ciência Animal, Escola de Veterinária - UFMG].
8. Doner, W.L. The sugars of Honey - A review. **J. Sci. Food. Agric.**, 28: 443-456, 1977.
9. Kirkwood, D.C.; Mitchell, T.J.; Smith, D. An examination of the occurrence of honeydew in honey. **Analyst**, 85: 412-416, 1960.
10. Kirkwood, D.C.; Mitchell, T.J.; Rossi, I.C. An examination of the occurrence of honeydew in honey. Part II. **Analyst**, 86: 164-165, 1961.
11. Kubisova, S.; Mastny, V. Comparison of two methods for distinguishing nectar and honeydew honeys. **Vedecke. prace, Vyzkumneho Ustavu Vcelarskeho v Dole u Libcic**, 7: 87-94, 1976.
12. Lima, A C. **Insetos do Brasil 3º tomo**. Homópteros. Escola Nacional de Agronomia. Série Didática nº 4, 1942. 327p.
13. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 1985, v.1.
14. Salomé, L.G. EPGRI, Cidade das abelhas, SC. Brasil. Informação pessoal, setembro, 1996.
15. SAS/STAT Sistema de Análise Estatística. User Guide, version 6, 4ed., impressão 4, 1994, ISBN 1-55544 – 376 – 1, 3vol.
16. Siddiqui, I.R. The sugars of honey. **Adv. Carbohydr. Chem.**, 25: 285-288, 1970.
17. Snedecor, G. W.; Cochran, W. G. **Statistical Methods**. 8 ed., Ames: Iowa State University Press; 1989. 503 p.
18. White Jr., J.W. Detection of Honey Adulteration By Carbohydrate Analysis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 63(1), 1980.

Recebido em 15/06/2000; Aprovado em 05/07/2001

Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* em Jquitiba – Estado de São Paulo – Brasil

Isolation of flavivirus Iguape from mosquitoes *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in Jquitiba – São Paulo State – Brazil

Esther Luiza BOCATO-CHAMELET^{1*}
Terezinha Lisieux Moraes COIMBRA¹
Elza da Silva NASSAR¹
Luiz Eloy PEREIRA¹
Ivani Bisordi FERREIRA¹
Luiza Terezinha Madia de SOUZA¹
Akemi SUZUKI¹

RIALA6/893

Bocato-Chamelet, E.L. et al. Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* em Jquitiba – Estado de São Paulo – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):65-69,2001.

RESUMO. O flavivírus Iguape foi isolado pela primeira vez em 1979, a partir de camundongo sentinela, exposto em floresta no Município de Iguape, Estado de São Paulo, Brasil. Anticorpos inibidores da hemaglutinação, monotípicos para o vírus Iguape, foram detectados em animais domésticos e silvestres na Região do Vale do Ribeira, SP. Anticorpos monotípicos têm sido também detectados em soros humanos, embora não haja evidência de doença clínica. O estudo foi realizado em maio de 1994, no Município de Jquitiba, SP, em área de floresta. Mosquitos foram capturados com armadilhas luminosas. Após identificação sistemática, lotes de cerca de 30 mosquitos da mesma espécie foram processados para isolamento de vírus, empregando-se camundongos. A identificação foi realizada por testes de Hemaglutinação, Inibição de Hemaglutinação, Fixação de Complemento, Neutralização em camundongos e sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio. Uma cepa de vírus (SPAr-158482) foi obtida a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. O agente isolado apresentou significante sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio. A sorologia por Inibição de Hemaglutinação, Fixação de Complemento e Neutralização em camundongos, indicou que a cepa isolada é idêntica ao vírus Iguape. Esses achados sugerem que o *An. cruzii* pode desempenhar algum papel no ciclo de transmissão do vírus Iguape, em ambientes naturais.

PALAVRAS-CHAVE. Arbovírus; *Flavivirus*; Iguape; *Anopheles (Kerteszia) cruzii*; Mata Atlântica.

INTRODUÇÃO

O flavivírus Iguape (IGP) foi isolado pela primeira vez a partir de camundongos sentinelas, expostos em área de Mata Atlântica, no Município de Iguape, Estado de São Paulo².

Empregando-se a técnica clássica de inclusão, a microscopia eletrônica revelou imagens de partículas virais com dimensões aproximadas de 41nm, em tecido de cérebro de camundongo infectado. Nos testes de Fixação de Complemento (FC), Inibição de Hemaglutinação (IH) e Neutralização (N),

¹ Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Brasil.

* Endereço para correspondência: Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 35 – 01246-902 – São Paulo, SP – Brasil – telefone: 11 3068.2901 – fax: 11 3088.3753

técnicas clássicas aplicáveis aos arbovírus, o vírus IGP apresenta reações sorológicas cruzadas com outros membros do gênero *Flavivirus* – Ilhéus (ILH), Encefalite São Luís (SLE), Rocio (ROC), Febre Amarela (YF), Dengue (DEN).

Figueiredo et al.⁴ estudaram o vírus IGP empregando técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para identificação do agente; entretanto, esses autores sugerem a necessidade de estudos adicionais de seqüenciamento do genoma para uma identificação precisa desse vírus.

Soros humanos e de animais, submetidos a testes de IH apresentaram anticorpos monotípicos para o vírus IGP, evidenciando a circulação do agente em pássaros, roedores silvestres, marsupiais, morcegos, aves domésticas e humanos².

As aves migratórias desempenham importante papel na epidemiologia, pois atuam na dispersão do vírus para outras regiões. Ferreira et al.³ relatam a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação, monotípicos para o IGP, em plasmas de 50 aves silvestres, capturadas em área de Mata Atlântica, na Região do Vale do Ribeira. Esses autores relatam ainda que, classificadas segundo os hábitos de residência, 2 aves apresentavam hábitos migratórios, 24 eram espécies residentes, outras 20 eram de hábitos residente-migratório e 4 cujas características de dispersão não foram ainda determinadas.

O estudo da patogenia do IGP, a partir de infecções naturais, não foi descrito até o momento em virtude de não ter sido encontrado na espécie humana e/ou animal quadro clínico de doença determinado por esse agente. Embora faltem evidências de doença clínica, não se pode descartar a possibilidade de que infecções humanas tenham ocorrido de forma

assintomática, leve ou branda. Todavia, esse fato pode ser comprovado em laboratório, pela presença de anticorpos para o vírus IGP, em soros humanos.

A quase totalidade dos anofelinos do sub-gênero *Kerteszia* utiliza-se de bromeliáceas como criadouros⁵. Estudos realizados em ecossistema de Mata Atlântica demonstram a alta frequência de *An. cruzii* em ambientes com cobertura florestal primitiva^{6,10}, onde são encontradas grande diversidade de bromeliáceas.

Embora tenham hábitos predominantemente silvestres, são encontrados com frequência em áreas peri-domiciliares, principalmente quando o domicílio situa-se dentro ou próximo de área de floresta; buscam repasto sanguíneo nessas áreas, mas logo procuram abrigo nos ambientes naturais^{8,7}. Esse comportamento proporciona a essa espécie a possibilidade de servir como vetora de agentes de ocorrência silvestre para ambientes frequentados pelo homem.

Este trabalho relata o isolamento do vírus IGP a partir de mosquitos *An. cruzii*, naturalmente infectados, capturados no Município de Jujutiba, SP, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Área de estudo

Os trabalhos de campo foram realizados em área florestal da Serra do Mar, a 20km a sudoeste da cidade de Jujutiba (24° 03'S 47° 00'W) e cerca de 70km do Município de São Paulo, na região Sul do Estado (Figura 1). A área estudada faz parte do ecossistema da Mata Atlântica e está inserida nos 9%

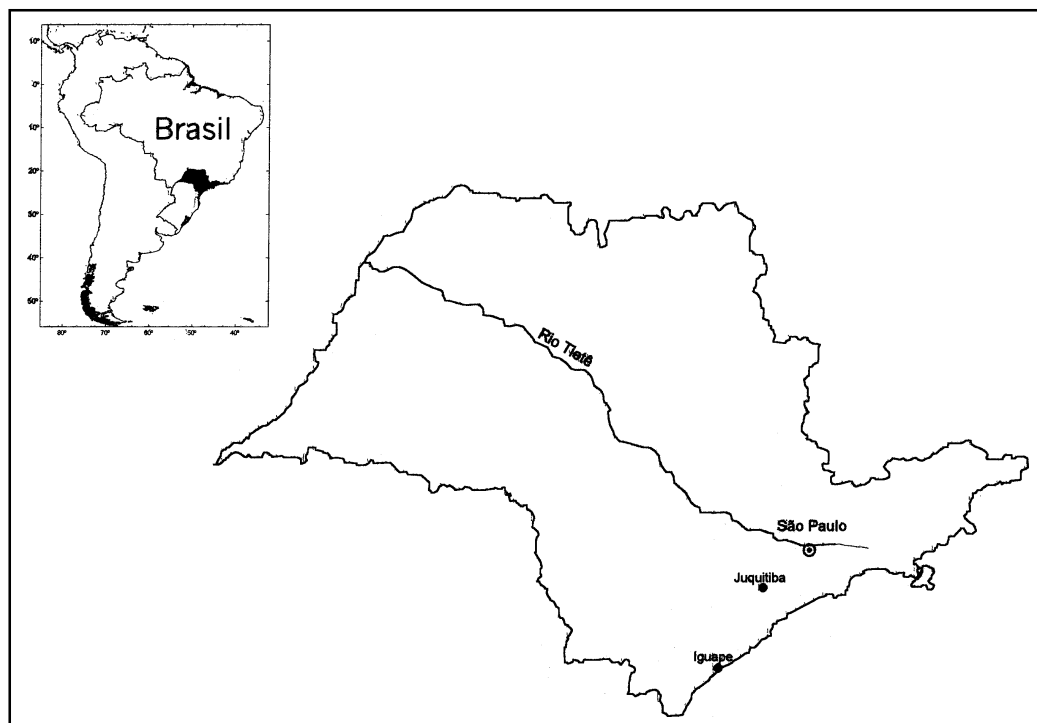


Figura 1. Localização dos Municípios de Jujutiba e Iguape, onde a presença do vírus Iguape foi detectada

remanescentes, preservados da mata original, que se estendia desde o Norte até o Sul do Brasil, ao longo da Costa Atlântica. Trata-se, tipicamente, de floresta densa umbrófila, com altos índices pluviométricos e temperatura média de 18°C. Os vários rios, riachos e lagoas presentes na área justificam o nome Juititaba, que significa “terra de muitas águas”.

2. Captura de mosquitos

Os mosquitos foram capturados em área florestada do Município de Juititaba, no mês de maio de 1994. Armadilhas luminosas do tipo CDC-miniatura, tendo como isca CO₂ de gelo seco, foram colocadas a 1,5m da superfície do solo, durante um pernoite. Os mosquitos foram transportados em nitrogênio líquido até o laboratório, onde foram mantidos em congelador a -70°C. A identificação taxonômica foi realizada sobre mesa fria, constituindo-se lotes de 30 espécimes de mesma espécie. Os espécimes ingurgitados foram descartados do experimento.

3. Isolamento de vírus e identificação

Os lotes de mosquitos foram triturados e suspensos em solução de albumina bovina a 1,8% e submetidos a 10.000 rpm em centrífuga refrigerada, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram inoculados em camundongos *swiss* albinos recém-nascidos, 0,02ml por via intracerebral, em famílias constituídas por mãe e 6 filhotes. Realizou-se observação diária desses camundongos, por período de 14 dias, para detecção de sinais característicos de infecções por arbovírus. Foram processadas passagens seriadas de cérebro dos camundongos com sinais clínicos característicos de infecção, até a obtenção do isolamento de cepas virais.

Na identificação dos isolados foram empregados testes clássicos para os arbovírus, ou seja: Hemaglutinação (HA)¹, Inibição da Hemaglutinação (IH)¹, Fixação de Complemento (FC)⁹, Neutralização em camundongos (N)¹¹ e teste de sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio (DCA)¹².

As técnicas de preparo de antígenos e soros imunes empregados nos procedimentos de identificação da cepa viral foram descritas por Clarke e Casals¹ e Tikasingh et al.¹³, respectivamente.

Nos testes sorológicos (IH, FC e N) foram utilizados antígenos de vírus do gênero *Flavivirus*, num total de 8 protótipos distintos: Febre Amarela (YF - SPH 144990), Ilhéus (ILH - BeAn 7445), Encefalite São Luís (SLE - SPAn 11916), Iguape (IGP - SPAn 71686), Rocio (ROC - SPH 34675), Dengue 1 (DEN1 - Hawaii), Dengue 2 (DEN2 - Tr 1051) e Dengue 4 (DEN4 - BeH 402276). A sigla SP indica que a cepa foi isolada originalmente no Estado de São Paulo; as outras cepas foram isoladas e/ou cedidas pelo Instituto Evandro Chagas e pelo Centers for Disease Control and Prevention - CDC, EUA.

RESULTADOS

Mosquitos *An. cruzi* foram os mais abundantes nessa coleta (Tabela 1). Em seguida, compareceram mosquitos *Anopheles* sp. Pode-se afirmar que a quase totalidade desses

Tabela 1. Frequência de mosquitos capturados com armadilhas luminosas tipo CDC-miniatura, iscadas com CO₂. Juititaba-SP, maio de 1994

Espécie	Número de mosquitos	%
<i>Anopheles cruzi</i>	1.295	67,65
<i>Anopheles</i> sp	591	30,87
<i>Culex (Culex) spp.</i>	7	0,37
<i>Cx. (Melanoconion) sp.</i>	6	0,31
<i>Aedes scapularis</i>	4	0,21
<i>Coquillettidia venezuelensis</i>	3	0,16
<i>Phoniomyia davisii</i>	3	0,16
<i>Rhunchomyia sp.</i>	3	0,16
<i>Limatus</i>	1	0,05
<i>Wyeomyia confusa</i>	1	0,05
Total	1.914	99,99

espécimes eram *An. cruzi*, os quais foram assim identificados devido ao fato de estarem danificados. Outros gêneros também foram identificados na captura, embora com frequência nitidamente menor, inclusive mosquitos de hábito essencialmente diurno, como *Limatus*, *Phoniomyia*, *Wyeomyia* e *Rhunchomyia*.

De acordo com os testes sorológicos de IH, FC e N, observados no Quadro 1, o vírus SPAr-158482 é antigenicamente relacionado com o vírus IGP, ou seja, apresenta forte reação cruzada com o vírus IGP.

Empregando-se suspensão contendo vírus, testes preliminares revelaram um título de 10^{8,63} DL₅₀ (dose letal para 50% de camundongos lactentes inoculados) na suspensão-controlada não tratada. Após o tratamento da suspensão com Desoxicolato de Sódio, o título sofreu sensível redução para 10^{6,3} DL₅₀, sugerindo assim, tratar-se de um vírus envelopado. A prova de sensibilidade ao desoxicolato de sódio, que é um detergente de ação deslipinizante, é uma prova complementar utilizada na caracterização de arbovírus em geral.

DISCUSSÃO

Na identificação da cepa isolada, os ensaios sorológicos apresentaram reações cruzadas, com títulos variados, com protótipos do grupo *Flavivirus*. Esses dados definem o gênero ao qual pertence o agente. Com base na resposta exuberante, observada quando cruzada com o protótipo IGP-SPAn71686, definiu-se a sua identidade.

A ocorrência de isolamento do vírus IGP, em condições naturais, demonstra a continuidade, espacial e temporal, de sua circulação em áreas de floresta pertencentes ao mesmo ecossistema. Ressalta-se que entre o primeiro e o presente relato de isolamento são transcorridos cerca de 20 anos, período de quiescência comum para muitos arbovírus, os quais, sob condições favoráveis, voltam a circular.

Vale ressaltar que não foram observadas até o momento, infecções clínicas em animais e/ou humanos que pudessem incri-

Quadro 1. Resultados dos testes de HI, FC e N utilizados na identificação da cepa SPAr-158482, isolada a partir de *An. (Ker.) cruzii*

Antígenos	Inibição de Hemaglutinação								Fixação de Complemento								Neutralização				
	SPAr158482	IGP	SLE	ROC	ILH	YF	DEN1	DEN2	DEN4	SPAr158482	IGP	SLE	ROC	ILH	YF	DEN1	DEN2	DEN4	SPAr158482	IGP	ILH
SPAr158482	160	160	20	20	20	40	20	20	20	512	256	32	64	64	64	nr	32	64	5.1	5.0	1.1
IGP (SPAn71686)	160	160								256	256								5.0	5.0	0.0
SLE (SPAn11916)	80	640								32	256								3.3	1.8	0.7
ROC (SPH34675)	80	640								64	128								3.0	nr	0.9
ILH (BeAn7445)	80	320								8	64								2.9	1.6	4.8
YF (SPH144990)	4	640								16	256								1.9	nr	nr
DEN1 (Hawaii)	0	320								nr	nr								nr	nr	0.7
DEN2 (Tr1751)	40	160								0	64								nr	nr	0.6
DEN4 (BeH402275)	40	40								0	32								nr	nr	0.8

* recíproca do melhor título do soro/melhor diluição do antígeno.
 nr - não realizado; IH- <20 = negativo; FC- <8 = negativo; N- <1,0 = negativo
 IGP – Iguape; SLE – Encefalite São Luís; ROC – Rocio; ILH – Ilhéus; YF – Febre Amarela; DEN – Dengue

minar o vírus IGP como agente patogênico. Entretanto, anticorpos monotípicos e heterotípicos são observados em inquéritos sorológicos e em investigações de rotina, evidenciando assim, a ocorrência de infecções brandas ou assintomáticas.

O registro, pela primeira vez, de isolamento a partir de mosquitos capturados naturalmente infectados, acresce ao estudo da cadeia epidemiológica, a possível indicação da participação desse vetor, altamente antropofílico, na disseminação desse vírus. Entretanto, a detecção do agente em mosquitos *An. cruzii* não comprova seu papel como transmissor nem o peso dessa atuação na manutenção da cadeia de transmissão desse vírus nos ambientes naturais; são ainda necessárias observações adicionais, relativas à capacidade e competência vetora desse mosquito em relação ao vírus IGP para confirmação dessa tese.

Entretanto, o fato de ter sido recuperado em condições naturais indica que o vírus está intrinsecamente ligado a esse ecossistema.

AGRADECIMENTOS

À Pesquisadora Evelyn Oliver Sarmento, pela atenção e profissionalismo no fornecimento de animais de laboratório utilizados no experimento. À Técnica de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica Antonia Torres Marti, pela realização dos testes de Inibição de Hemaglutinação e à equipe de Apoio à Pesquisa da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz.

RIALA6/893

Bocato-Chamelet, E.L. et al. Isolation of flavivirus Iguape from mosquitoes *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in Juquitiba - São Paulo State - Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):65-69,2001.

ABSTRACT. The flavivirus Iguape was isolated for the first time in 1979, from a sentinel mouse exposed in a forested area in Iguape County - SP, Brazil. Monotypic hemagglutination inhibition antibodies for Iguape virus were detected in domestic and sylvan animals, in Ribeira Valley region, São Paulo State. Monotypic antibodies have also been detected in human sera, although there is no evidence of clinical disease. The authors report the isolation of a new strain of Iguape virus from naturally infected mosquitoes. The study was conducted in May, 1994 in Juquitiba County – São Paulo State, in a forested area. Mosquitoes were captured by light traps After systematics identification, pools of mosquitoes were processed for virus isolation in suckling mice. An isolate (SPAr-158482) was obtained from *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Tests of Hemagglutination, Hemagglutination Inhibition, Complement Fixation, Neutralization in suckling mice and sensitivity to Sodium Deoxycholate were employed for identification of the isolate.. According to tests of Complement Fixation, Hemagglutination Inhibition and Neutralization in mice, the virus was identified as the same as Iguape virus. This finding suggests that this species of mosquito may play a role in the transmission cycle of Iguape virus in natural environment.

KEY WORDS. Arbovirus; *Flavivirus*; Iguape; *Anopheles (Kerteszia) cruzii*; Atlantic Rain Forest.

REFERÊNCIAS

1. Clarke, D.H.; Casals, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 7: 561-573, 1958.
2. Coimbra, L.T.M. et al. Iguape: a newly recognized flavivirus from São Paulo State, Brazil. **Intervirology**, 36: 144-152, 1993.
3. Ferreira, I.B. et al. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Rev. Inst. Med. trop.**, 36: 265-274, 1994.
4. Figueiredo, L.T.M. et al. Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using *Flavivirus* universal primers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 59: 357-362, 1998.
5. Forattini, O.P. **Entomologia Médica**. 1ª ed. São Paulo – SP: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962.
6. Forattini, O.P. et al. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, 20: 178-203, 1986.
7. Forattini, O.P. et al. Freqüência ao ambiente humano e dispersão de mosquitos culicidae em área adjacente à Mata Atlântica primitiva da planície. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, 24: 101-107, 1990.
8. Forattini, O.P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 1- Parity of blood seeking *Anopheles (Kerteszia)* in South-Eastern Brazil. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, 27: 1-8, 1993.
9. Fulton, F.; Dumbell, K.R. The serological comparison of strains of influenza virus. **J. Gen. Microbiol.**, 3: 97-111, 1949.
10. Seto, M.I. **Ocorrência de mosquitos (Diptera-Culicidae) em bromélias da localidade de Aldeia dos Índios, área endêmica de malária, no Município de Peruibe (SP), no período de julho de 1985 a julho de 1987**. São Paulo, 1992. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
11. Shope, R.E.; Sather, G.E. Arboviruses In: Lennette, E.H.; Schmidt, N.J., eds. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**, 5th ed., Baltimore: American Public Health Association; 1979, p.767-814.
12. Theiler, M. Action of sodium desoxycholate on arthropod-borne viruses. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 96: 380-382, 1957.
13. Tikasingh, E.S.; Spence, L.; Down, W.G. The use of adjuvant and sarcoma 180 cells in the production of mouse hyperimmune ascitic fluids for arboviruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 15: 219-226, 1967.

Recebido em 25/10/2000; Aprovado em 23/08/2001

Hepatite E: Atualização

Hepatitis E: An Update

Alessandra Stilhano NASCIMENTO¹
Regina Célia MOREIRA^{1*}

RIALA6/894

Nascimento, A. S.; Moreira, R. C.. Hepatite E: Atualização. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(1):71-77, 2001.

RESUMO. Após a identificação dos vírus das hepatites A e B, novos casos de hepatites virais, de etiologia desconhecida, ainda surgiam em todo o mundo. A introdução de técnicas de biologia molecular nos estudos dos agentes virais tem possibilitado o conhecimento dos novos agentes envolvidos nesses casos. Dois agentes têm sua participação comprovada em casos de hepatites não A não B, um de transmissão parenteral (vírus da hepatite C) e outro de transmissão entérica (vírus da hepatite E). O vírus da hepatite E (HEV) é um vírus RNA de fita simples, de forma esférica, e que, por sua semelhança morfológica, foi classificado como membro da família *Caliciviridae*, mas devido à distância filogenética entre estes agentes, o HEV não está atualmente classificado nesta família, não pertencendo até o momento a nenhuma família de vírus já bem definida. Surto e epidemias de hepatite de possível transmissão entérica foram relatados já na década de 50 na Índia, porém a identificação do agente responsável por estes casos só foi possível na década de 90. Nosso objetivo foi apresentar uma atualização de alguns dados disponíveis sobre a hepatite E em várias partes do mundo, inclusive no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE. Vírus da hepatite E; HEV; hepatite não A não B de transmissão entérica.

INTRODUÇÃO

Desde os anos 50, apontava-se para a existência de uma outra forma de hepatite não A não B, de transmissão primordialmente entérica³⁶. A primeira descrição desta infecção foi em 1955 quando houve uma epidemia em Nova Delhi (Índia)^{13,14,48} envolvendo aproximadamente 29 mil indivíduos, após a ingestão de água de abastecimento contaminada com esgoto³⁶. Um dos relatos de hepatite epidêmica mais recente foi registrado em 1991, entre refugiados da Somália^{26,53}. Outros surtos ocorreram em Cachemira (Índia)²⁴, no vale do Catmandu (Nepal)²², na cidade do México e no norte da África, acometendo militares franceses^{51,52}. É interessante ressaltar que pesquisas realizadas no Egito e em Hong Kong, países onde não haviam

sido constatados surtos epidêmicos, revelaram elevada incidência do vírus da hepatite E (HEV) entre os casos de hepatite aguda. Estes dados indicam que o HEV pode estar muito mais disseminado do que inicialmente se supunha²⁸.

1. O Vírus da Hepatite E (HEV)

As partículas do vírus da HEV são esféricas, não-envelopadas, com aparência semelhante aos Calicivírus e aos agentes do grupo dos Norwalk Vírus, quando visualizadas por imunomicroscopia eletrônica.

As características, como tamanho das partículas, morfologia e coeficiente de sedimentação, são consistentes com aquelas observadas para os Calicivírus. Sendo assim, temporariamente, o HEV foi classificado na família *Caliciviridae*.

¹ Laboratório de Hepatites do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

* Endereço para correspondência: Laboratório de Hepatites do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César – São Paulo – 01246-902.

E-mail: rmoreira7@hotmail.com

Entretanto, após a análise genômica mais detalhada verificou-se que o HEV é um vírus filogeneticamente distante dos outros agentes da família *Caliciviridae*,^{29,54}. Na classificação atual, o vírus da hepatite E pertence ao gênero “Hepatites E-like viruses”, sem estar incluído em nenhuma família^{18,29}.

2. Organização Genômica do Vírus da Hepatite E

O genoma do HEV tem aproximadamente 7.5 kb e RNA de polaridade positiva^{19,54}. Foram identificados códigos abertos de leitura (ORFs), que codificam para proteínas não-estruturais, (ORF1-RNA-polimerase RNA-dependente), estruturais (ORF2-proteínas do capsídeo) e outra de função ainda não determinada (ORF3). Cepas identificadas em regiões geograficamente distintas, como as do México e Burma, apresentam variação no seu genoma⁴². A detecção de uma nova cepa de HEV, designada de US-1 divergente das cepas do México e de Burma, identificada de um paciente norte-americano, representa a heterogenicidade dos isolados humanos⁴¹.

Portanto, três genótipos de HEV foram identificados: genótipo I (Ásia-África), genótipo II (Estados Unidos) e genótipo III (México). O genótipo I foi dividido em dois subgenótipos, Ásia e África. No subgenótipo da Ásia foram observados três

pequenos grupos: as cepas da China e de Burma e cepas de casos de HEV fulminante⁵⁰.

O genoma de várias cepas de HEV originadas da África e México tem sido sequenciado e as análises das seqüências revelam significativa divergência entre essas duas cepas. As cepas circulantes da Ásia apresentam uma divergência na seqüência de nucleotídeos que varia entre 1 a 8%, e mais de 25% entre os achados das cepas do México. As análises filogenéticas de todo o genoma do HEV mostram que existem pelo menos dois genótipos distribuídos universalmente.

A variação nas seqüências de diferentes cepas de HEV pode significar problemas quanto ao diagnóstico da infecção e ao desenvolvimento de vacinas, sendo importante avaliar a extensão da diversidade genética das cepas do HEV nas diferentes partes do mundo (30).

A representação do genoma do HEV está apresentada na Figura 1.

3. Transmissão

A via de transmissão do HEV é a fecal-oral^{18,25,37,54}. Evidências da contaminação fecal em água de abastecimento tem sido associadas a epidemias severas de hepatite E em

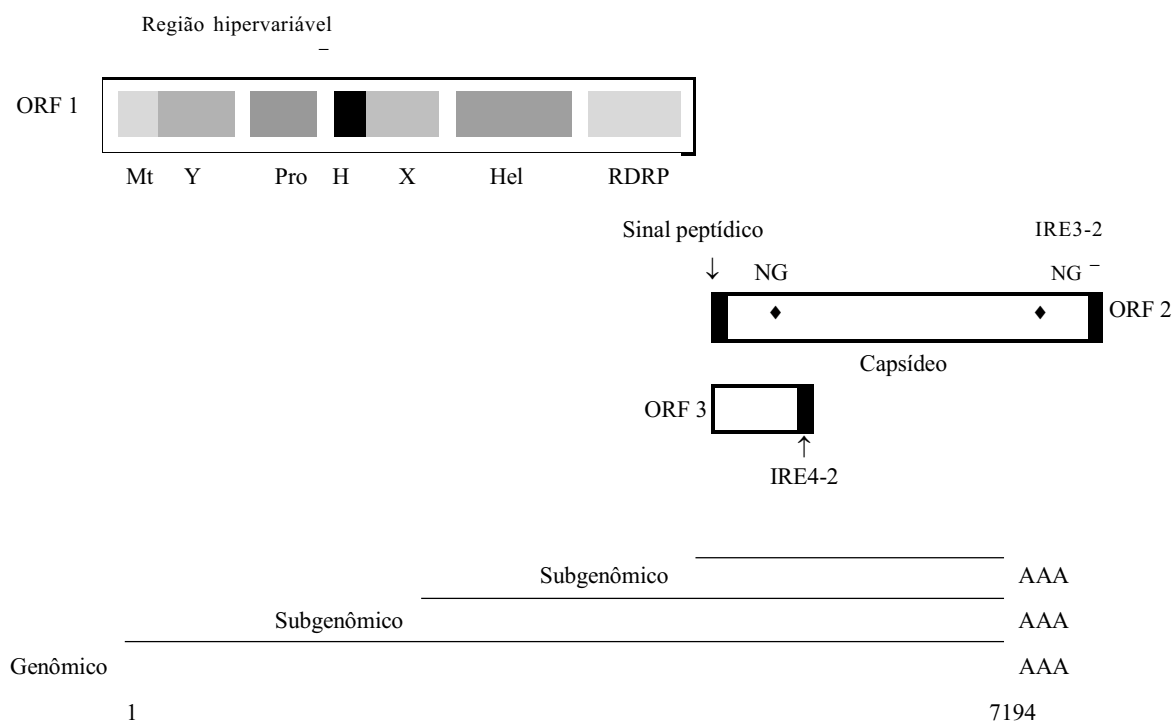


Figura 1. Organização genômica do vírus da Hepatite E, descrevendo os três códigos aberto de leitura (ORFs) e a localização de dois RNAs subgenômicos poliadenilados. Os domínios dos genes não-estruturais são identificados por análises das seqüências e são indicados na figura: **ORF1**: Mt, metiltransferase; Y, domínio Y; Pro, protease papaína-like; H, domínio rico em prolina; X, domínio X; Hel, helicase; RDRP, RNA-dependente RNA polimerase. **ORF2** proteínas do capsídeo: NG, potencial de glicosilação N-like encontrado na seqüências de aminoácidos, em um subtipo derivado de uma cepa de HEV em Burma. IRE3-2 e IRE4-2 representam epítomos imunoreativos presentes na porção terminal de ORF2 e ORF3 respectivamente. **ORF3**: sua função biológica ainda não foi determinada. Os números 1 e 7194 representados na porção final 5' e 3' na seqüência de nucleotídeos de HEV, são seqüências poliadeniladas⁴⁸.

Ahmeddabad, Kashmir e Kanpur (Índia). Epidemias ocorrem principalmente nos meses de inverno quando há queda do nível de água, concentrando assim os contaminantes. A transmissão por contato de pessoa a pessoa tem sido relatada em algumas epidemias, sendo observado o aparecimento de novos casos ictericos durante longo período, mesmo alguns meses após a epidemia³¹.

Estudos realizados em homossexuais do sexo masculino sugerem a transmissão de HEV por práticas sexuais e a informação da transmissão parenteral ainda é escassa e limitada^{25,31}.

Pode haver também a transmissão vertical pelo HEV. Em um estudo realizado na Índia, crianças nascidas de mães infectadas apresentaram uma hepatite transitória e se curaram, com ocorrência de uma morte por necrose hepática²⁵.

4. Quadro Clínico

O quadro clínico da hepatite E aguda pode ser dividido em quatro fases ou períodos: incubação, prodrômico, icterico e convalescença. O período de incubação é de 2 a 9 semanas, com média de seis semanas após a contaminação. O período prodrômico é caracterizado por astenia, febre, anorexia, náusea, vômitos e desconforto abdominal, perdurando por cerca de uma semana. Logo após, aparecem a icterícia, colúria e hipocolia fecal, que persistem por aproximadamente uma semana, quando o paciente passa a apresentar melhora do estado geral, iniciando-se a convalescença. Ainda não se constatou persistência de sinais ou sintomas da hepatite pelo HEV por períodos longos, não havendo relatos de evolução para forma crônica desta infecção^{28,54}.

A hepatite E apresenta evolução fulminante em 20% entre as mulheres no segundo ou no terceiro trimestre de gestação^{25,37,45,46,54}. Alguns autores admitem que a mortalidade do HEV aumente com o progredir da gravidez, chegando a 1,5%, 8,5%, e 21% no 1º, 2º, 3º trimestre de gestação, respectivamente²⁸. A transmissão do HEV ao feto ainda não está definida^{44,54}.

5. Replicação Viral

O ponto primário da replicação não foi até o momento identificado, mas pode ser o trato intestinal. Ainda não está definido como o vírus chega no fígado; presume-se que a porta de entrada seja a veia porta. A replicação ocorre no citoplasma dos hepatócitos, o vírus é liberado para a bile e posteriormente eliminado pelas fezes⁵³.

A viremia é detectada 22 dias após a exposição ao agente, antes do início da icterícia, podendo durar até 30 dias. A partícula viral pode ser detectada nas fezes em até 34 dias após a exposição³¹.

6. Resposta Imunológica

Anticorpos anti-HEV IgM alcançam níveis mais elevados durante as primeiras 4 semanas depois do aparecimento dos sintomas, porém os títulos diminuem entre 10 a 12 semanas depois da fase aguda⁵⁴.

Os anticorpos IgG atingem altos níveis na fase aguda da doença, entretanto, não há consenso quanto à persistência desses níveis após a fase de convalescença^{19,38,54}. Estudo realizado por Bryan e col., durante epidemia no Paquistão, demonstrou que o título dos Acs IgG atinge o pico máximo 2 semanas após o início dos sintomas, permanecendo detectável no soro por até 20 meses, com títulos inferiores aos observados durante a fase aguda⁷.

7. Diagnóstico Laboratorial

Até recentemente, não existiam métodos de rotina para a detecção de marcadores sorológicos do HEV, sendo o diagnóstico desta infecção baseado na exclusão de outros agentes causadores de hepatites⁴³.

A hepatite E aguda pode ser comprovada por meio da identificação de partículas virais nas fezes; da detecção de antígenos nos hepatócitos; da pesquisa do HEV-RNA nas fezes ou no soro e da pesquisa de anticorpos séricos contra o HEV²⁸.

As partículas do HEV podem ser detectadas nas fezes por imunomicroscopia eletrônica cerca de quatro dias antes até seis dias depois do início da sintomatologia^{28,48,54}.

O antígeno do HEV tem sido identificado no citoplasma de hepatócitos de macacos experimentalmente infectados, utilizando-se sondas imunofluorescentes constituídas a partir de soros da fase de convalescença^{28,55}.

A determinação da sequência nucleotídica do genoma do HEV possibilitou a detecção do HEV-RNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)^{19,25,28,55}.

A clonagem do HEV em *Escherichia coli* ou baculovírus também propiciou a construção de antígenos recombinantes, além de peptídeos sintéticos para a elaboração de testes de detecção de anticorpos. O método para pesquisa de anticorpos anti-HEV é o por ensaio imunoenzimático (EIE)⁵⁴, ou por técnica de “immunoblot” (Western-blot)²⁸.

8. Infecção Experimental em Animais

Várias espécies de primatas tem sido envolvidas em estudos sobre a hepatite E. Os seguintes primatas, incluindo os do Velho Mundo, podem ser susceptíveis à infecção com HEV: chimpanzés, macacos (*Cynomolgus*, Rhesus e macaco “rabichudo”), macacos verdes da África; e espécies do Novo Mundo como marmotas tamarins, macaco “coruja”, e macacos esquilos. Os mais utilizados tem sido o *Cynomolgus* e macacos Rhesus. HEV tem sido transmitido aos primatas por vias intravenosa e oral. O curso da infecção experimental em primatas é similar ao do homem. O anticorpo anti-HEV naturalmente adquirido tem sido encontrado em macaco *Cynomolgus* selvagem e macaco Rhesus em cativeiro³⁸.

A dispersão zoonótica do HEV em países desenvolvidos foi originalmente sugerida com base da infecção pelo HEV descrita em ratos, suínos e outros animais da Ásia Central. Este dado mostra que suínos e ratos testados nos Estados Unidos foram infectados com um vírus semelhante ao HEV, o que sugere

que este agente pode também ocorrer em países desenvolvidos. Sorologicamente foi observada correlação entre as cepas encontradas em humanos e em suínos nos Estados Unidos³⁹.

9. Epidemiologia

A hepatite E é caracterizada pelo aparecimento de epidemias, ocorrendo grande número de casos. Tais epidemias tem sido freqüentemente descritas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, ainda que a predominância seja em áreas tropicais e subtropicais. A primeira epidemia ocorreu em 1955 em Nova Delhi, (Índia) com 29.000 casos de hepatite icterica, pela contaminação fecal em águas de abastecimento. Além dessa epidemia, tem sido identificados surtos por HEV em áreas geográficas distintas, tais como: Índia, Nepal, Myanmar, Paquistão, México, União Soviética, África, América do Norte, Europa e Austrália³¹.

A infecção pelo HEV tem sido descrita entre viajantes que retornam de regiões endêmicas³¹. Casos esporádicos de hepatite E aguda tem sido relatado nos USA, Grécia, França, Holanda, Alemanha. A prevalência dos anticorpos anti-HEV na população geral, em países industrializados, está em torno de 1 a 2%³¹.

A infecção por HEV é hiperendêmica em Nova Delhi, apresentando maior gravidade quando comparada a outras

partes do mundo, estando relacionada a metade dos casos de insuficiência hepática. Coinfecções do HEV, com a Hepatite A, têm significativo aumento da mortalidade neste país²⁷.

No Brasil, casos esporádicos de hepatite E foram descritos na Bahia em 1993, em 3 pacientes com hepatite não-A, não-B, não-C³⁵. No mesmo ano, um levantamento sorológico realizado na região amazônica, detectou anticorpos anti-HEV em 6 de 97 trabalhadores de minas de ouro³². Focaccia et al.¹⁵, em 1996, em estudo realizado com amostras de 1.059 indivíduos da população residente no município de São Paulo, estimaram prevalência de 1,68% de anticorpos anti-HEV.

O aparecimento de sintomas na hepatite E é raro em crianças, sendo inaparente ou anictérica, ao contrário quando a infecção atinge adultos jovens, que é a população mais atingida por este agente^{19,31}.

A Tabela 1 mostra dados de soroprevalência provenientes de alguns estudos realizados no Brasil.

A Tabela 2 mostra estudos realizados em diferentes populações de alguns países.

10. Profilaxia e Tratamento

Não existe tratamento específico para hepatite E aguda. Assim como para outras hepatites virais agudas, recomendam-se medidas como repouso e a dieta habitual, além da proibição

Tabela 1. Soroprevalência de HEV em estudos realizados no Brasil

Autor	População	Prevalência
Pang et al., 1995	Trabalhadores de minas de ouro	6%
Focaccia et al., 1995	Funcionários de limpeza	4%
	Hemodialisados	5%
	Amostragem aleatória (sexo masculino acima de 30 anos)	1,7%
Paraná et al., 1997	Doadores de sangue	2%
	Pacientes com hepatite aguda	17,7%
	Hemodialisados	0,0%
	Portadores de esquistossomose	10%
Souto et al., 1997	Casos de hepatite aguda	12,5%
	Familiares dos casos suspeitos	10,6%
Gonçales et al., 2000	Doadores de sangue	4,2%
	Mulheres atendidas no centro de triagem anônima para HIV	17,9%
	Trabalhadores do hospital universitário	6,0%
Paraná et al., 1999	Pacientes com hepatite aguda esporádica	12%

Tabela 2. Resultados de estudos realizados em diferentes populações de alguns países.

Autor	População	Prevalência
Dalekos, G.N. et al., 1998	Hemodialisados	9,7%
	Hepatite crônica viral	5,3%
	Refugiados	4,8%
	Doadores de sangue	0,2%-0,5%
Zanetti, A.R. et al., 1999	Hepatite viral aguda NA NC	10,1%
Rapicetta, M. et al., 1999	População entre 29 e 79 anos	1,5%
Bartoloni, A. et al., 1999	População rural	7,3%
Divizia, M. et al., 1999	Hepatite aguda	24,2%
	Hepatite crônica	44,5%
Tarrago, D. et al., 2000	Imigrantes	5,5%
	Doadores de sangue	2,9%
Karenyi, Y.V. et al., 1999	Hepatites NANC	4,9%
	Pacientes saudáveis	5,7%
Abdelaad, M. et al., 1998	Doadores de sangue	16,9%
Pang, Z. et al., 1998	Trabalhadores da saúde	1,2%
	Prostitutas	3,6%
	Doadores de sangue	2,3%
	Jornalistas	5,9%
	Pacientes com DST	6,8%
Alvarez-Munoz, M.T. et al., 1999	Adultos jovens e crianças	10,5%
Hsieh, S.Y. et al., 1999	Hepatite aguda	10%
Benjelloun, S. et al., 1997	Hepatite aguda	77,3%
Ibarra, H. et al., 1997	Doadores de sangue	8,0%
	Trabalhadores da saúde	12,5%
	Presos	7,5%
	Índios	17%
Balayan, M.S. et al., 1997	População saudável	1,7%
	Pacientes com HIV	11,1%
	Prisioneiros	8,0%
Fainboim, H. et al., 1999	Pacientes com HIV	6,6%
Arankalle, et al., 2000	População de Kudal	12,9%
	População de Atet	15,8%
Lemon, S.M. et al., 2000	População com menos de 25 anos	1,9%
	Hepatite aguda	4,6%

do consumo de bebidas alcoólicas. Em casos de febre mais acentuada ou de vômitos, deve-se orientar o uso de antipiréticos ou antieméticos, tornando-se rara a necessidade do emprego de medicação ou hidratação por via parenteral²⁸.

São encontrados na literatura poucos trabalhos a respeito dos avanços terapêuticos na hepatite fulminante pelo HEV²⁸.

Para aqueles que viajam para áreas endêmicas, a prevenção deve ser baseada nos cuidados para evitar trans-

missão fecal-oral, como higiene pessoal, o consumo de água de fonte segura e de alimentos limpos e bem cozidos^{9,28}.

Diferentemente da comprovada eficácia da imunoglobulina para a hepatite do tipo A, existem controvérsias em relação a eficácia da imunização passiva para o HEV^{9,28}.

Enfim, em decorrência dos conhecimentos adquiridos com estudos do genoma do HEV, em um futuro próximo será possível a elaboração da vacina contra o vírus da hepatite E^{19,25,28}.

Nascimento, A. S.; Moreira, R. C. Hepatitis E: An update. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):71-77,2001.

ABSTRACT. Hepatitis A and B viruses were identified a long time ago, but cases of hepatitis without markers of infection by these viruses have been described around the world. Molecular biology methods have been used to study other viruses involved in non-A, non-B hepatitis cases. Two agents have been associated with these cases, one parenterally transmitted (Hepatitis C Virus) and other enterically transmitted (Hepatitis E Virus). The hepatitis E virus (HEV) is a single strand RNA virus, shaped spherical and was primarily defined as a *Caliciviridae* member, but because of some phylogenetic diversity between these agents, HEV has not been classified yet. Hepatitis epidemic and outbreak transmitted by fecal-oral route had been described since 1950, but the identification was possible only in 1991. In this paper, we show an update about Hepatitis E Virus infection around the world, with a special focus on Brazil.

KEY WORDS. Hepatitis E virus; HEV; hepatitis non-A, non-B enterically transmitted.

REFERÊNCIAS

1. Abdelaad, M. et al. Epidemiology of hepatitis E virus in male blood donors in Jeddah, Saudi Arabia. **Ir. J. Med. Sci.**, 167 (2): 94-6, 1998.
2. Alvarez-Munoz, M.T. et al. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. **Arch. Med. Res.**, 30(3): 251-4, 1999.
3. Arankalle, V.A. et al. **Indian J. Gastroenterol.**, 19(1): 24-8, 2000.
4. Balayan, M.S. et al. **J. Viral Hepatol.**, 4(4): 279-83, 1997.
5. Bartoloni, A. et al. Prevalence of antibodies against hepatitis A and E viruses among rural populations of the Chaco region, south-eastern Bolivia. **Trop. Med. Int. Health**, 4(9): 596-601, 1999.
6. Benjelloun, S. et al. Seroepidemiology study of an acute hepatitis E outbreak in Morocco. **Res. Virol.**, 148(4): 279-87, 1997.
7. Bryan, J.P. et al. Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. **J. Infect. Dis.**, 170: 517-21, 1994.
8. Carrilho, F.J.; Silva, L.C. Epidemiologia In: Silva, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**, 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1995, cap. 7, p. 86-7.
9. Carrilho, F.J.; França, A.V.C.; Silva, L.C. Profilaxia das hepatites por vírus In: Silva, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**, 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1995, cap.29: 269.
10. Dalekos, G.N. et al. Antibodies to hepatitis E virus among several populations in Greece: increased prevalence in an hemodialysis unit. **Transfusion**, 38(6): 589-95, 1998.
11. Divizia, M. et al. HAV and HEV infection in hospitalised hepatitis patients in Alexandria, Egypt. **Eur. J. Epidemiol.**, 15(7): 603-9, 1999.
12. Fainboim, H. et al. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. **J. Viral Hepatol.**, 6(1): 53-7, 1999.
13. Favorov, M.O. et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. **J. Med. Virol.**, 36: 246-250, 1992.
14. Favorov, M.O. et al. IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) detected by an enzyme immunoassay based on an HEV-specific artificial recombinant mosaic protein. **J. Med. Virol.**, 50: 50-58, 1996.
15. Focaccia, R. et al. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the Municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **Braz. J. Infect. Dis.**, 2(6): 269-284, 1998.
16. Focaccia, R.; Sette Jr, H.; Conceição, O.J.G. Hepatitis in Brazil. **Lancet**, 246: 1165, 1995.
17. Gonçalves, N.S. et al. Hepatitis E virus Immunoglobulin G antibodies in different population in Campinas, Brazil. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, 7(5), 2000.
18. Green, K.Y. et al. Taxonomy of the caliciviruses. **J. Infect. Dis.**, 181(Suppl 2): S322-30, 2000.
19. Harrison, T.J. Hepatitis E virus – an update. **Liver**, 19: 171-176, 1999.
20. Hsieh, S.Y. et al. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. **J. Clin. Microbiol.**, 37(12): 3828-34, 1999.
21. Ibarra, H. et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile. **Rev. Med. Chile**, 125(3): 275-8, 1997.
22. Kane, M.A. et al. Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal: recovery of possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. **JAMA**, 252: 3140-5, 1984.
23. Karenyi, Y.V.; Gilchrist, M.J.; Naides, S.J. Hepatitis E virus infection prevalence among selected population in Iowa. **J. Clin. Virol.**, 14(1): 51-5, 1999.
24. Khuroo, M.S. Vertical transmission of hepatitis E virus. **Lancet**, 345: 1025-6, 1995.
25. Krawczynski, K.; Mast, E.E. Epidemiology, natural history and experimental models In: Zuckerman, A.J. e Thomas, H.C. **Viral Hepatitis**, 2ª ed. United Kingdom: Churchill Livingstone; 1998 cap.31, p.403-9.
26. Krawczynski, K.Z. Hepatitis E: clinical course and prevention In: hepatitis A to F: an update. Postgraduate course. **American Ass. of the Study of Liver Disease**, 11-12, Chicago, 83-99, 1994.
27. Lemon, S.M. et al. The 20th United States – Japan joint hepatitis panel meeting. **Hepatology**, 31, 3, 800-6, 2000.
28. Lopes Neto, E.P.A.; Sette Jr, H. Hepatite E In: Focaccia, R. **Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu; 1998, cap.8, p. 81-7.
29. Melaman, M.L.; Narro, G.E.C.. Hepatite E. In: Gayotto, L.C.C. e Alves, V.A.F. **Doenças do Fígado e Vias Biliares**, São Paulo: Editora Atheneu; 2001, p.441-467.
30. Meng, J. et al. Primary structure of open reading frame 2 and 3 of hepatitis E virus isolated from Morocco. **J. Med. Virol.**, 57: 126-133, 1999.
31. Panda, S.K.; Jameel, S. Hepatitis E virus: from epidemiology to molecular biology. **Viral Hepatitis**, 4: 227-51, 1997.
32. Pang, L. et al. Short report: hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 52(4): 347-48, 1995.
33. Pang, Z.; Chu, Q.; Xu, Y. Research on risk factors of 5 types of viral hepatitis among population with high risk. **Chung Hua Liu Hsing Ping Hsueh Tsa Chih**, 19(3): 141-3, 1998.
34. Paraná, R. et al. Acute Sporadic Non-A, Non-B Hepatitis in Northeastern Brazil: Etiology and natural History. **Hepatology**, 30(1): 289-93, 1999.
35. Paraná, R. et al. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit liver diseases in Salvador, Bahia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 57(1): 60-1, 1997.

36. Pinho, J.R.R.; Bassit, L.; Saez-Alquézar, A. Estrutura dos vírus das hepatites In: Silva, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**, 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1995, cap. 2, p.19-20.
37. Pujol, F.H. et al. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. **J. Med. Virol.**, 42: 234-6, 1994.
38. Purcell, R.H. Hepatitis E In: Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. et al. editors. **Fields Virology**, 3ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996, p.2831-44.
39. Purcell, R.H.; Emerson, S.U. Hepatitis E virus infection. **Lancet**, 355: 578, 2000.
40. Rapicetta, M. et al. Seroprevalence and anti-HEV persistence in the general population of the Republic of San Marino. **J. Med. Virol.**, 58(1): 49-53, 1999.
41. Schlauder, G.G. et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in United States. **J. Gen. Virol.**, 79: 447-456, 1998.
42. Silva, L.C.; Granato, C.F.H. Importância clínica dos marcadores virais. In: Silva, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**, 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1995, cap.3, p.35.
43. Silva, L.C. Aspectos peculiares e história natural da hepatite E. In: Silva, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**, 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1995, cap.16, p.175.
44. Silva, L.C. Hepatites por vírus na gravidez. In: Silva, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**, 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1995, cap. 19, p.189-90.
45. Skidmore, S.J. Factors in spread of hepatitis E. **Lancet**, 354: 1049-1050, 1999.
46. Skidmore, S.J. et al. Hepatitis E virus: The cause of a waterborne hepatitis outbreak. **J. Med. Virol.**, 37: 58-60, 1992.
47. Souto, F.J.D. et al. Short report: further evidence for hepatitis E in Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 57(2): 1049-50, 1997.
48. Tam, A.W.; Bradley, D.W. Structure and Molecular virology In: Zuckerman, A.J. e Thomas, H.C. **Viral Hepatitis**, 2ª ed. United Kingdom: Churchill Livingstone; 1998 cap. 30, p.395-401.
49. Tarrago, D. et al. Prevalence of hepatitis E antibodies in immigrants from developing countries. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.**, 19 (4): 309-11, 2000.
50. Tsarev, S.A. et al. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. **J. Med. Virol.**, 57: 126-133, 1999.
51. Tsega, E. et al. Outbreak of acute hepatitis E virus infection among military personal in northern Ethiopia. **J. Med. Virol.**, 34: 232-6, 1991.
52. Velasquez, O. et al. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1996-1997. **JAMA**, 263: 3281-5, 1990.
53. Viswanathan, R. Infections hepatitis in Delhi (1995-1996): a critical study: epidemiology. **Indian J. Med. Res.**, 45:1-30, 1997.
54. Yarbough, P.O. Hepatitis E Virus. **Intervirology**, 42: 179-184, 1999.
55. Yarbough, P.O.; Diagnosis In: Zuckerman, A.J. e Thomas, H.C. **Viral Hepatitis**, 2ª ed. United Kingdom: Churchill Livingstone; 1998, cap. 32, p.411-5.
56. Zanetti, A.R. et al. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. **J. Med. Virol.**, 57(4): 356-60, 1999.

Recebido em 08/06/00; Aprovado em 04/05/01

Como obter resultados confiáveis em cromatografia

How to obtain reliable results in chromatography

Lucia M. VALENTE SOARES^{1*}

RIALA6/895

Valente Soares, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(1): 79-84, 2001.

RESUMO. Resultados analíticos que não tenham passado por um processo de validação carecem de qualquer valor. O presente trabalho enfoca etapas algumas vezes negligenciadas em laboratórios de cromatografia e que, no entanto, são cruciais para obtenção de resultados analíticos confiáveis: uso de métodos analíticos validados e como validá-los, confirmação da identidade do composto de interesse, escolha de métodos de quantificação adequados, emprego de amostras de referência e testes de recuperação na rotina de controle de qualidade e participação em testes de proficiência.

PALAVRAS-CHAVE. Cromatografia; validação de métodos analíticos; controle de qualidade analítico.

INTRODUÇÃO

A razão de ser de um laboratório é produzir resultados analíticos confiáveis. O analista, no seu dia a dia, preocupa-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida razoável com respeito a sua exatidão e que possuam uma precisão adequada para a finalidade a que se destinam. Para que esta confiabilidade seja atingida, algumas etapas são necessárias, e estarão necessariamente incluídas em qualquer bom programa de controle e segurança de qualidade analítica: uso de métodos analíticos validados, confirmação da identidade do composto de interesse, escolha de métodos de quantificação adequados, emprego de amostras de referência e testes de recuperação na rotina de controle de qualidade e participação em testes de proficiência. Sem tentar cobrir todos os aspectos de segurança e controle de qualidade analíticas, o presente artigo visa rever algumas das etapas essenciais na obtenção de resultados confiáveis em métodos cromatográficos.

1. Validação de um Método Analítico

O primeiro passo para a obtenção de resultados analíticos confiáveis está na validação do método analítico escolhido. Um método analítico pode ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No próprio laboratório, através de testes de recuperação e um ou dois dos enfoques seguintes, o analista pode validar um método analítico: (a) comparação com um método independente; (b) emprego de material de referência certificado⁷. Interlaboratorialmente, a validação pode ser obtida através de um estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios. Note-se que se o método escolhido já foi objeto de um estudo colaborativo; ainda assim, o analista está obrigado a validá-lo intralaboratorialmente para provar que pode ser usado no seu laboratório.

Em testes de recuperação faz-se a adição do componente de interesse à matriz, seguida da execução do método sendo avaliado. O teor medido do componente adicionado é dividido pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100,

* Endereço para correspondência - Área de Análise de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13081-970 Campinas, SP
E-mail: valente@fea.unicamp.br

obtendo-se assim a percentagem de recuperação. Este enfoque sofre com o fato que o analito (composto de interesse sendo analisado) não sendo parte integrante da amostra, sua extração pode ser mais fácil do que a de uma amostra que o contenha naturalmente, por ter sido nela produzido ou, ainda, com ela produzido. Porém, os resultados deste tipo de teste, quando associado a outros enfoques, pode fornecer um panorama do comportamento do método com relação ao composto de interesse no tipo de matriz usado no teste. Amostras formuladas sinteticamente e, ainda, o método de adições, podem também ser empregadas no teste de recuperação.

Na comparação com um método independente, a condição mais importante é escolher um método baseado em princípios físicos ou químicos diversos do método sendo testado. Por exemplo, se o método a ser testado faz uso de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama, o outro método pode ser cromatografia líquida com detecção por fluorescência, ou ainda outro tipo de coluna e outro tipo de detector na cromatografia gasosa. Preferencialmente, o método empregado na comparação deve já ter sido validado anteriormente.

Ao empregar material de referência certificado, deve-se escolher aqueles cujas matrizes (tudo que o material contém menos o composto de interesse) mais se aproximem do tipo de amostra para o qual o método sendo testado será usado. A ISO¹¹ (International Standardization Organization) define material de referência como um material ou substância na qual uma ou mais propriedades estão suficientemente estabelecidas para serem usados para a calibração de um instrumento, avaliação de um método analítico ou para designar valores a materiais. Neste sentido, cada laboratório pode criar seus próprios materiais de referência para o controle de qualidade rotineiro. Para a validação de métodos, no entanto, emprega-se material de referência certificado¹¹, o qual é um material de referência onde teores de uma ou mais propriedades estão certificados por um procedimento tecnicamente válido, acompanhado por um certificado proveniente de um organismo certificador acreditado. Alguns exemplos de organizações que fornecem materiais de referência certificados: Community Bureau of Reference (União Européia), Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Reino Unido), National Institute for Standards and Technology (antigo National Bureau of Standards, EUA), National Research Council (Canada), National Institute for Environmental Studies (Japão) e, ainda, firmas particulares.

Avaliação interlaboratorial de um método é realizada através de um estudo colaborativo. Protocolo para execução destes estudos foi harmonizado pela ISO, IUPAC e AOAC e é reconhecido pelo Codex Alimentarius e dentro da União Européia¹⁶. Nele, uma ou várias amostras homogêneas são distribuídas a laboratórios, onde o método é executado por analistas experientes. Os resultados vão indicar a exatidão do método, sua precisão interlaboratorial (R, reprodutibilidade) e intralaboratorial (r, repetibilidade). Métodos estudados colaborativamente são publicados por entidades governamentais ou

privadas que se dedicam a este tipo de estudo. É sempre vantajoso para o analista utilizar estes métodos devido à sua confiabilidade.

As condições para a realização de um estudo interlaboratorial são: (a) participação de 8 ou mais laboratórios, (b) amostras homogêneas e representativas do produto e um mínimo de 5 materiais diferentes distribuídos entre os laboratórios participantes, (c) um mínimo de um par de duplicatas “cegas” (d) analistas competentes para executar a análise, (e) a média de todos os resultados é considerada a melhor estimativa da quantidade do composto sendo determinado^{1,8,9}.

É oportuno lembrar que estudos interlaboratoriais podem servir para várias finalidades, tais como^{7,15}: (a) prover estimativas da repetibilidade e da reprodutibilidade de um método analítico, (b) prover uma estimativa objetiva do desempenho do laboratório, (c) encorajar a autocrítica e a percepção dos erros cometidos durante análises, (d) ajudar a identificar as necessidades de treinamento do pessoal do laboratório.

Ainda na década de 80, Horwitz et al.¹⁰ publicaram um estudo dos métodos colaborativamente estudados e aceitos pela “Association of Official Analytical Chemists” (atualmente AOAC International). Eles demonstraram que o coeficiente de variação interlaboratorial de qualquer método não depende do instrumento utilizado, da matriz, ou técnica empregada, e sim, do teor em que o componente analisado se encontra no alimento e que pode ser descrito pela equação:

$$CV (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

A concentração C é expressa como potência de 10. Por exemplo: 1 ppm = 10⁻⁶ g/kg, o que nos dá um CV % = 16%.

Para o analista é útil conhecer ainda algumas outras propriedades do método analítico que pretende empregar. O conceito de limite de detecção tem sido objeto de diferentes definições conforme a área de trabalho. É bom saber que o próprio analista pode criar sua própria definição de limite de detecção desde que expresse claramente qual é o seu conceito desta medida. De uma maneira geral, pode-se definir como limite de detecção a menor concentração do analito da qual podemos estar confiantes na sua medição. Uma boa definição é proposta por Caulcutt e Boddy², os quais nos dizem ser o limite de detecção a menor concentração do analito da qual temos 95% de confiança que será detectada pelo método. Uma outra definição é ainda fornecida pelo Codex Alimentarius³, que declara ser o limite de detecção convencionalmente aceito como 3 vezes o desvio padrão do branco da amostra. Limite de quantificação tem sido usualmente definido como 5 vezes o limite de detecção.

2. Confirmação da Identidade de um Composto

A cromatografia é um poderoso método de separação de compostos mas não de identificação. A cromatografia apenas fornece dados auxiliares na identificação de compostos. Algumas das técnicas mais comumente empregadas para auxiliar na identificação de compostos estão descritas a seguir e são

decisivas em casos negativos, isto é, para comprovar que um composto com um certo tempo de retenção (cromatografia líquida ou gasosa) ou distância de retenção (cromatografia em camada delgada ou em papel) não é o que se julgava ser:

- (a) Comparação do tempo de retenção ou distância de retenção do composto com o dos padrões. Uma coincidência de tempos de retenção entre o analito e o padrão significa que o analito talvez seja o mesmo composto que o padrão. Em caso negativo, pode-se afirmar que não é.
- (b) Co-cromatografia - adiciona-se uma quantidade de padrão na amostra e depois verifica-se se há aumento do pico ou da mancha ou se há surgimento de outro pico ou mancha. No primeiro caso, o analista tem um “presuntivo positivo” e a análise merece progredir para uma etapa de confirmação de identidade. No segundo caso, o analista está diante de uma negativa, isto é, o composto não é sem sombra de dúvida o que se supunha inicialmente.
- (c) Gráfico do log do tempo de retenção corrigido *versus* número de carbono de compostos pertencentes a uma série homóloga. Muito útil em cromatografia de séries homólogas e se o processo de isolamento dos compostos de interesse da matriz for suficientemente específico, pode-se, em alguns casos, ser aceito como prova de identidade.
- (d) Índices de retenção: o índice de Kovatz é o mais interessante e foi desenvolvido originalmente para hidrocarbonetos.
- (e) Fatores de separação: são baseados no princípio de que para qualquer série homóloga, em condições constantes de temperatura e vazão de gás de arraste, o tempo levado por um composto com N carbonos para eluir da coluna tem uma relação constante com os tempos de retenção dos componentes com N + 1 e N - 1 átomos de carbono. Exemplos: $t'_{n+1}/t'_n = F = t'_n/t'_{n-1}$; $t'_{n+2}/t'_n = F^2 = t'_n/t'_{n-2}$; $t_{n+x}/t'_n = F^x$

Um presuntivo positivo vai normalmente requerer do analista outras medidas comprobatórias. A identidade de um composto pode ser confirmada através de características químicas, tais como: (a) reações químicas que alterem as propriedades cromatográficas do composto de interesse; (b) espectro de massas; (c) testes de imunoafinidade e por características físicas, tais como: (d) espectro ultravioleta, (e) espectro infravermelho, (f) detectores em série, (g) detector ultravioleta/visível ou de fluorescência.

- (a) Reações químicas – reações químicas específicas e capazes de modificar as características cromatográficas do composto sendo identificado¹³. O tempo de retenção do composto e do padrão devem mudar de maneira idêntica e os picos originais devem sumir ou reduzir substancialmente (a reação de confirmação não precisa ser quantitativa).
- (b) Espectro de massas – o espectrômetro de massas ioniza as moléculas e separa íons de acordo com a razão m/z (massa/

carga) e nos fornece um histograma das abundâncias relativas de íons individuais com diferentes razões massa/carga geradas por um composto em condições especificadas. Obtemos através deste processo um padrão de fragmentação característico e informações sobre características estruturais do composto. Muitas vezes consegue-se também o peso molecular. O monitoramento de um íon isolado não constitui confirmação e a presença de 20% de impurezas no composto, após a separação cromatográfica, inviabiliza a comparação com o padrão durante a confirmação. A confirmação pode ser obtida com o auxílio dos seguintes critérios: a intensidade relativa e a razão entre 4 picos característicos são empregados para comparação entre padrão e composto sendo identificado. No caso de não existirem 4 picos característicos pode-se usar dois métodos diferentes de derivação do analito ou dois métodos diversos de ionização. Em cada caso pelo menos dois ou três picos característicos devem ser obtidos. As intensidades relativas dos picos escolhidos devem ser as mesmas dos padrões com uma margem de 10% para impacto de elétrons e 20% para ionização química⁵.

- (c) Testes de imunoafinidade – colunas ou *kits* de imunoafinidade podem ser usados em paralelo com a separação e quantificação por cromatografia gasosa servindo de confirmação devido a sua especificidade¹³. Os *kits* antes devem ser testados com padrões para verificar se não estão degradados por armazenamento prolongado ou por terem sido submetidos a temperaturas inadequadas. A qualidade deve ser avaliada verificando se não há reações cruzadas com outros compostos com estruturas químicas semelhantes. É necessário também testar o comportamento do *kit* diante de cada tipo diferente de matriz para verificar se nesta não existem substâncias capazes de interferir nos resultados.
- (d) Espectro ultravioleta – em cromatografia líquida, o detector de arranjo de diodos é cada vez mais empregado e cumpre bem as funções de quantificar e confirmar a identidade do composto de interesse. Porém, para que haja confiabilidade é necessário que o comprimento de onda máximo do padrão coincida com o do composto de interesse dentro de ± 2 nm e que nos demais aspectos do espectro haja coincidência⁵. Alguns instrumentos possuem *softwares* que fornecem o grau de pureza do pico sendo examinado comparando os espectros em diversos pontos do pico cromatográfico, como por exemplo, na subida, no ápice e na descida. Este cálculo fornece um dado extra para o analista que assim saberá se há ou não interferentes eluindo ao mesmo tempo que o analito.
- (e) Espectro infravermelho – aqui devemos procurar máximos de absorção no espectro do padrão que preencham os seguintes critérios: o máximo de absorção aparecendo entre 1800–500 cm^{-1} , a intensidade não deve ser menos que 12,5% do pico mais intenso da região. Um mínimo de 6 picos são requeridos para esta comparação entre os espectros do padrão e do composto sendo identificado⁵.

- (f) Detectores em série – dois detectores baseados em princípios diferentes tais como ultravioleta/visível e fluorescência são úteis para confirmação de identidade em cromatografia líquida¹³. A razão entre duas características marcantes do analito, tais como absorvância no comprimento de onda máximo e fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima, são características físicas constantes. O sistema cromatográfico empregado deve ser o mesmo para o analito e o padrão e a razão calculada deve se manter, permitindo-se no máximo 5% de variação.
- (g) Detector ultravioleta/visível ou de fluorescência – um único detector pode fornecer confirmação de identidade através da razão entre as absorvâncias ou fluorescências em cromatografia líquida¹³. O espectro de absorvância ou de fluorescência do analito deve possuir comprimentos de onda suficientemente distintos e significativos onde ocorrem máximos ou mínimos de absorvância ou fluorescência. O padrão e o analito devem ser analisados no mesmo sistema cromatográfico. Também neste caso diferenças entre a razão calculada para o padrão e a calculada para o analito podem divergir em até 5%. Valores superiores a 5% indicariam que o analito não está eluindo isoladamente e sim em conjunto com interferentes. O mesmo pode ser observado com relação ao item (f).

Note-se que alguns procedimentos analíticos são específicos o suficiente para dispensar maiores esforços em confirmação, isto é, o processo de extração do analito da matriz, a remoção de interferentes e a etapa cromatográfica são suficientemente específicas para dar ao analista a segurança necessária para afirmar qual a identidade do composto. Tais situações, no entanto, são a exceção e não a regra em química analítica. Um bom exemplo é a determinação de ácidos graxos por cromatografia gasosa. A fração lipídica do alimento é extraída, os triglicerídios são hidrolizados e em seguida esterificados, para depois serem submetidos à cromatografia. Quando as amostras não são complexas, uma simples comparação com os tempos de retenção de padrões, ou o uso de um gráfico número de carbonos versus logaritmo do tempo de retenção, ou ainda o emprego do ECL (*equivalent chain length*) é suficiente para comprovar a identidade de cada ácido graxo. Em resumo, cabe ao analista avaliar o grau de confirmação necessário em cada tipo de análise de maneira que satisfaça outros profissionais usuários dos dados gerados.

3. Quantificação: métodos e elaboração de uma curva padrão

Na etapa de quantificação o analista estabelece a correlação entre o sinal do detector e quantidade do componente de interesse no caso de métodos cromatográficos instrumentais. Os sistemas usados para quantificação são^{4,12}: (a) normalização, (b) padronização externa, (c) padronização interna e, ainda, (d) método de adições.

- (a) Normalização: as áreas de todos os picos são medidas e somam-se todas as áreas. O teor do composto é expresso como % composto $A = (\text{área de } A / \text{área total dos picos}) \times 100$. Este método é válido quando todos os compostos da fração injetada foram detectados. Fatores de resposta devem ser estabelecidos e usados para correção no caso de compostos para os quais o detector tenha sensibilidade diferente. É mais utilizado para séries homólogas onde diferença na resposta pode ser considerada desprezível ou facilmente corrigida por um fator de resposta.
- (b) Padronização externa: neste caso interessa apenas um composto ou poucos compostos. Os padrões são cromatografados separadamente em quantidades conhecidas para possibilitar o traçado de uma curva padrão que relacione a área com o peso do composto. Para se obter uma melhor precisão deve-se manter as mesmas condições cromatográficas durante a análise, alternar os padrões com as amostras, manter o mesmo volume de injeção para os padrões e para a amostra (para evitar distorções dos picos), manter a concentração ou massa do padrão próxima à do componente de interesse, utilizar padrões de alta pureza. Lembrar que zero quantidade deve dar zero resposta pois a curva deve passar pela origem. Alguns fatores podem levar a curva a não passar pelo zero, tais como: presença de impurezas, adsorção irreversível, degradação no injetor ou na coluna. Todos estes fatores são indesejados e devem ser eliminados.
- (c) Padronização interna: usa-se um padrão interno para o qual deve ser escolhida uma substância que não existe na amostra. É normalmente incorporada à solução da amostra antes da injeção no cromatógrafo. Especialmente aconselhável quando alta precisão é necessária porque o padrão interno sofre as mesmas condições da substância de interesse durante a corrida cromatográfica^{6,12}. Pequenos desvios de tempo de retenção e na sensibilidade do detector que ocorrem entre corridas diferentes em um mesmo dia de trabalho são corrigidos¹⁵. O tempo de retenção do composto de interesse pode ser calculado relativo ao padrão interno minimizando diferenças no tempo de retenção que ocorrem entre corridas diferentes. Uma das grandes utilidades de um padrão interno está nos casos em que o analito não é estável para armazenamento sob a forma de padrão, dificultando, portanto, seu uso como padrão externo, ou ainda quando é difícil de ser encontrado como padrão ou este apresenta preços proibitivos. Reduz ainda os erros devido às variações no volume de injeção, o que representa um problema maior em cromatografia gasosa⁶. O padrão interno deve ser escolhido dentro de alguns requisitos. O composto escolhido deve eluir da coluna adequadamente separado de todos os compostos da amostra, deve eluir o mais perto possível dos compostos de interesse, deve ser estável nas condições de análise, a quantidade injetada deve ser próxima à da substância de interesse e deve ser suficientemente estável para permitir a estocagem por um tempo adequado¹⁵. Para

uso de um padrão interno, uma curva padrão deve ser construída como se segue: (a) injeta-se quantidades conhecidas do composto de interesse junto com um padrão interno; (b) traça-se um gráfico da concentração do composto de interesse versus a razão entre a área do padrão interno e a área do composto de interesse. Alguns pesquisadores têm usado padrões internos para medir a recuperação em uma análise além do seu uso na quantificação¹², o que pode não ser recomendável, pois a medida da recuperação só é confiável quando o próprio composto de interesse é empregado nesta finalidade. Estes pesquisadores escolhem neste caso compostos com estruturas químicas o mais próximo possível do analito.

- (d) Método de Adições: quantidades conhecidas do composto de interesse são adicionadas a quantidades conhecidas da amostra e cromatografadas. As quantidades da amostra devem ser sempre as mesmas. Uma curva de calibração é construída. O ponto onde a curva corta o eixo das ordenadas corresponde ao pico do composto de interesse na amostra sem adição de padrão. A extrapolação da reta dará o ponto zero e permitirá a medida, diretamente no gráfico, da concentração da substância de interesse na amostra.

Quando cromatografia planar está sendo usada, o analista tem a opção de realizar a quantificação *in situ* por comparação visual ou densitométrica ou ainda extrair a substância de interesse e quantificá-la por métodos espectrofotométricos. No primeiro caso, um dos métodos acima descrito pode ser escolhido para quantificação.

Alguns analistas julgam que elaborar uma curva de calibração é uma das etapas mais simples de uma análise. No entanto, a exatidão dos resultados repousam na confiabilidade da curva elaborada. Preparação e diluição das soluções padrão e das amostras são geralmente as maiores causas de erros. Durante a calibração podem aparecer: (a) erros sistemáticos (determinados); (b) erros aleatórios (indeterminados); (c) erros devidos ao uso de uma matriz para o padrão diferente da matriz das amostras (erros determinados ou indeterminados).

Um ponto freqüentemente discutido é o número de pontos necessário em uma curva de calibração. Esta dúvida foi resolvida por um par de estatísticos dedicados a problemas analíticos² que demonstraram ser um número maior que 6 pontos desnecessário. Isto porque a faixa de confiabilidade ou invólucro de segurança a nível de 95% de confiança de uma curva de calibração não diminui de maneira vantajosa para o analista quando este toma mais que seis pontos. No entanto, o alargamento do invólucro de confiança aumenta acentuadamente quando menos de seis pontos são usados para a curva de calibração.

4. Aspectos da Rotina de Controle de Qualidade Analítica

Um laboratório, ao utilizar métodos analíticos validados, cumpriu apenas uma etapa no seu controle de qualidade interno. Além de métodos confiáveis, terá que demonstrar que em seu

dia a dia produz resultados confiáveis. Isto é conseguido com a inclusão de materiais de referência e a execução de análises em duplicata no trabalho de rotina e a participação em estudos colaborativos para teste de proficiência do laboratório¹⁶.

O material de referência usado na rotina não precisa ser certificado. O próprio laboratório pode preparar material de referência doméstico em quantidade suficiente para alguns meses de trabalho. Para tanto é recomendável que escolha um material semelhante em composição aos que são objeto freqüente de análises. O material de referência doméstico deve ser caracterizado por análises executadas em dias diferentes até que se consiga um número elevado de resultados, permitindo o conhecimento da incerteza associada aos resultados obtidos, assim como a eliminação de eventuais resultados espúrios da média. De preferência, o processo de caracterização do material de referência doméstico deve incluir análises de material de referência certificado e testes de recuperação que confirmam maior segurança à caracterização.

Na realidade, a rotina de controle de qualidade em um laboratório é simples, como pode ser visto no esquema sugerido e descrito a seguir: realizar cada análise em duplicata e as duplicatas, de preferência, em dias diferentes. Cada batelada de amostras deve ser acompanhada de uma amostra de referência, ou na impossibilidade da inclusão desta, de um teste de recuperação. Periodicamente, uma amostra de referência certificada deve ser analisada. A vantagem deste esquema está no fato que qualquer anomalia no equipamento ou no procedimento empregado será rapidamente apontado pelos resultados das duplicatas e das amostras de referência. E melhor ainda, o laboratório poderá sempre demonstrar a confiabilidade de suas análises. Este pequeno programa pode ser enriquecido pela participação do laboratório em estudos colaborativos promovidos por entidades nacionais ou internacionais acreditadas (definidos na ISO Guia 25¹¹ como ensaios de proficiência).

Uma pergunta natural que o analista poder-se-ia fazer neste ponto: qual seria o tamanho adequado para uma batelada de amostras? Como as amostras de uma batelada são analisadas dentro de um período curto de tempo, é de se esperar que as condições do laboratório não sofram modificação, mantendo, portanto, o erro determinado associado às condições de trabalho no laboratório também, pelo menos aproximadamente, constante. Esta capacidade do laboratório em realizar análises em um curto espaço de tempo é que irá definir o número de amostras de uma batelada.

O nosso hipotético analista, que aqui nos representa a todos, poderia ainda perguntar: quando os resultados podem ser considerados bons? Esta é uma pergunta que qualquer analista se faz. A resposta está na equação desenvolvida por Horwitz para precisão interlaboratorial¹⁰. Os resultados intralaboratoriais foram observados apresentando a metade ou um terço da precisão dos observados em resultados interlaboratoriais. Desta maneira, o analista pode prever quais seriam os resultados aceitáveis para um determinado tipo de análise.

Valente Soares, L. M. How to obtain reliable results in chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(1): 79-84, 2001.

ABSTRACT. Analytical results that did not go through a validation process lack any value. The present review focus into steps for chromatography labs but some times neglected and that are essential for obtaining reliable analytical results: use of validated analytical methods and how to validate analytical methods, confirmation of identity of analytes, choice of adequate confirmation methods, routine use of reference materials and recovery tests for analytical quality control and participation in proficiency tests.

KEY WORDS. Chromatography; validation of analytical methods; analytical quality control.

REFERÊNCIAS

1. AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**, 16^a edição, 3^a revisão, Gaithersburg: AOAC International; 1997.
2. Caulcutt, R.; Boddy, R. **Statistics for analytical chemists**, 1^a edição, Londres: Chapman and Hall; 1983, 253 p.
3. Codex Alimentarius Commission. **Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes**, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Documento CX/MAS 98/5, 1998.
4. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 6^a edição, Campinas: Editora da Unicamp; 1995, 279 p.
5. De Ruig, W.G.; Stephany, R.W.; Dijkstra, G. Criteria for the detection of analytes in test samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72: 487-490, 1989.
6. Engelhardt, H. **High performance liquid chromatography**. Saarbrücken: Springer Verlag; 1979. 248 p.
7. Garfield, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**, 3^a edição, Arlington: AOAC International; 1991, 196 p.
8. Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies. *Pure Appl. Chem.*, 60: 855-867, 1988.
9. Horwitz, W. International coordination and validation of analytical methods. *Food Add. Contam.*, 10: 61-69, 1993.
10. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W., Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal Chem.*, 63: 1344-1355, 1980.
11. ISO (International Standardization Organization). Accreditation of laboratories, **ISO Guide 25**, Genebra, 1990.
12. Poole, C.F.; Poole, S.K. **Chromatography today**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1991. 1026 p.
13. Scott, P.M. Methods of analysis for mycotoxins—an overview. In: Rossel, J.B.; Pritchard, J.L.R., editors. **Analysis of oil seeds, fats and fatty foods**. London: Elsevier Applied Science; 1991. p.141-184.
14. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J. **Introduction to modern liquid chromatography**. New York: John Wiley and sons; 1974. 534 p.
15. Wernimont, G.T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists; 1985, 183 p.
16. Wood, R. Progress in developing European statutory methods of analysis. In: Gilbert, J., editor. **Progress in food contaminant analysis**. London: Blackie Academic and Professional; 1996. p. 368-416.

Recebido em 21/09/2000; Aprovado em 07/06/2001

Nota sobre o ciclo evolutivo de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera – Reduviidae) alimentados em ratos e sangue de ratos desfibrinado

Note on the life cycle of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera-Reduviidae)
reared in rats and defibrinated rats' blood

Ana Maria MARASSÁ^{1*}
Benedito Carlos PREZOTO²
Lídia Mara CAETANO³

RIALA6/896

Marassá, A. M.; Prezoto, B. C.; Caetano, L. M. Nota sobre o ciclo evolutivo de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera – Reduviidae) alimentados em ratos e sangue de ratos desfibrinado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):85-87,2001.

RESUMO. Estudou-se, em laboratório, o desenvolvimento de *Triatoma infestans* alimentados em duas diferentes fontes sangüíneas. Foram formados dois grupos com ninfas recém-eclodidas: sendo alimentados em ratos (Grupo 1) e em sangue de ratos que receberam de veneno de *Lonomia obliqua* (inibidor da coagulação sangüínea) (Grupo 2). Os insetos foram mantidos em estufa a $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com UR 60-80%. As médias de duração em dias do ciclo evolutivo foram maiores para o Grupo 1 nos estádios I, II e III, entretanto no estágio V foi maior no Grupo 2. Ao comparar-se os dois grupos verificou-se que não apresentaram diferenças significativas na duração do ciclo evolutivo e no percentual de mortalidade, concluindo-se que a quantidade de veneno utilizada como anticoagulante parece não alterar o ciclo evolutivo dessa espécie.

PALAVRAS-CHAVE. *Triatoma infestans*; alimentação; ciclo evolutivo; veneno de *Lonomia obliqua*.

Dada a importância de *Triatoma infestans* na epidemiologia da doença de Chagas, seja pela ampla distribuição e domiciliação em alguns países da América Latina¹³, seja pela utilização desta espécie em xenodiagnóstico, avaliações sobre o seu ciclo evolutivo a partir da alimentação em diferentes fontes têm sido objeto de estudo por diversos autores^{2,3,6,10}.

Diferentes técnicas de alimentação artificial vêm sendo empregadas como metodologia alternativa para a criação de *Triatoma infestans* em laboratório^{1,5,8,9,15}, sendo que alguns

autores obtiveram sucesso no desenvolvimento desses insetos^{1,15}.

Lake e Friend⁷ utilizaram técnica de alimentação artificial adicionando vitaminas para determinar efeitos de *Nocardia rhodnii* no desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*. Observaram que a presença ou não de *N. rhodnii* influi em seu desenvolvimento normal.

Neste experimento, objetivou-se avaliar o desenvolvimento de *T. infestans* até a fase adulta, comparando duas

¹ Instituto Adolfo Lutz - SP - Laboratório de Parasitoses Sistêmicas

² Instituto Butantan - SP - Laboratório de Farmacologia

³ Bolsista da Fundação do Desenvolvimento Administrativo (FUNDAP)

* Endereço para correspondência: Laboratório de Parasitoses Sistêmicas/ Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 355, 01246-902 - São Paulo - SP - Brasil.

diferentes fontes de alimentação (repasto em ratos e sangue de ratos desfibrinado) e, também, verificar a possível influência do veneno de lagartas da espécie *Lonomia obliqua*, causadoras de Síndrome Hemorrágica em humanos⁴, no ciclo evolutivo desses insetos.

Foram utilizadas 108 ninfas de *Triatoma infestans* recém-ecloídas, obtidas de colônia de criação do Instituto Adolfo Lutz.

Formaram-se dois grupos: Grupo 1, constituído de 61 exemplares alimentados em ratos anestesiados com nembital (75mg/kg) e Grupo 2, constituído de 47 exemplares alimentados em sangue desfibrinado de ratos que foram pré-tratados com veneno de lagarta da espécie *Lonomia obliqua* (injeção endovenosa de 20mg/kg). Esta dose inibe a coagulação sangüinea por consumo de fibrinogênio plasmático em animais de laboratório (ratos, camundongos e coelhos) por no máximo 10 horas (BC Prezoto: comunicação pessoal, 1998)¹².

Os insetos foram criados individualmente em frascos de Borrel em estufa mantida a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e 60-80% UR.

Os dois grupos tiveram alimentação controlada, obedecendo-se intervalos de freqüência de 14 dias em cada uma das fontes, com tempo de repasto de 20 minutos durante todo o experimento.

Para os exemplares alimentados em sangue, foram utilizados frascos de plástico de 5 cm de diâmetro x 5 cm de altura e recobertos por parafilm. Nos dois grupos, os insetos foram alimentados em estufa a 37°C , para padronizar a técnica alimentar.

Neste experimento foi aplicado o teste de Mann-Whitney com $p < 0,001$ para análise estatística.

Das 108 ninfas mantidas individualmente, 95 atingiram o estágio adulto, sendo 27 fêmeas e 28 machos pertencentes ao Grupo 1, e 15 fêmeas e 25 machos ao Grupo 2. As durações mínimas, máximas e médias em dias em cada estágio evolutivo e o percentual de mortalidade referentes aos Grupos 1 e 2 são apresentadas na Tabela 1.

Ao serem comparados os resultados observados em cada estágio de desenvolvimento foram obtidas diferenças estatisticamente significativas, ao teste de Mann-Whitney, entre os Grupos 1 e 2 ($p < 0,001$) para os estádios I, II, III e V. A duração média, em dias, foi maior para o Grupo I nos estádios I, II e III, invertendo-se no estágio V, com duração maior no Grupo 2.

Todavia, ao serem comparadas as médias de tempo de evolução total, da eclosão à fase adulta, não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,169$) na duração do ciclo de desenvolvimento entre os dois grupos.

Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando-se diferentes fontes alimentares para *Triatoma infestans*^{3,6,10,11}.

Corrêa³ concluiu que exemplares de *T. infestans* alimentados em gambá tinham maior regularidade no ciclo evolutivo quando comparados a lotes alimentados em galinha e cão, apesar de ter obtido a mesma média de duração para os alimentados em galinha e gambá.

Juarez⁶ verificou um encurtamento da duração do ciclo evolutivo em lotes de triatomíneos alimentados em camundongo,

Tabela 1. Duração em dias do ciclo evolutivo em *Triatoma infestans* em função do grupo de tratamento (G1 alimentados em ratos anestesiados e G2 alimentados em sangue de ratos desfibrinado)

Grupol	Estádio					Total
	I	II	III	IV	V	
Grupo1						
Média	31,36	31,16	31,62	43,63	70,64	208,09
DP	10,62	10,57	8,87	16,27	25,74	30,83
Mínimo	15,00	14,00	15,00	14,00	20,00	147,00
Máximo	69,00	58,00	58,00	89,00	135,00	286,00
N	61,00	61,00	58,00	57,00	55,00	55,00
M	0,00	0,00	4,92	1,73	3,51	10,16
Grupo2						
Média	18,55	22,09	22,00	38,24	97,55	197,30
DP	7,52	12,95	12,91	19,49	36,58	52,60
Mínimo	12,00	13,00	14,00	15,00	51,00	125,00
Máximo	39,00	71,00	58,00	94,00	189,00	308,00
N	44,00	43,00	43,00	42,00	40,00	40,00
M	6,39	2,27	0,00	2,33	4,46	15,75

N= número de exemplares, M= Percentual de mortalidade
DP= Desvio Padrão

quando comparados aos alimentados em galinha, obtendo média com variação entre 81,7-181,3 dias.

Buralli et al.¹ estudaram a evolução de quatro lotes de *T. infestans* no período de 180 dias, utilizando método de alimentação artificial com sangue humano citratado, heparinizado, desfibrinado e com adição de EDTA, encontrando melhores resultados com sangue humano citratado, que resultou em 85% de adultos e oviposição satisfatória.

Niel et al.⁸ observaram o comportamento de *T. infestans* empregando alimentação artificial com sangue de ave, adicionando os anticoagulantes fluoreto, citrato, oxalato e heparina, obtendo melhores resultados com sangue heparinizado.

Souza et al.¹⁴, utilizando sangue citratado e desfibrinado de galinha e Isola et al.⁵, empregando sangue citratado de galinha, observaram que este método anticoagulante influenciou no desenvolvimento de *T. infestans*. Por outro lado, Ubierno et al.¹⁵, utilizando método artificial de alimentação com sangue desfibrinado de galinhas e vacas, não observaram diferenças significativas no desenvolvimento quando comparados aos lotes controle alimentados em galinha.

Os resultados obtidos neste experimento referentes à duração do ciclo evolutivo vão de encontro apenas aos obtidos por Isola et al.⁵, que observou para *T. infestans* a duração de 207,3 dias em exemplares alimentados semanalmente em galinha.

No entanto, ao comparar a equivalência dos dois grupos, pode-se apenas relacioná-los aos resultados obtidos por Ubierno et al.¹⁵ que também não encontraram diferenças significativas na duração dos dois grupos, o que leva a indicar que a quantidade de veneno utilizada como anticoagulante parece não alterar o ciclo evolutivo dessa espécie.

Marassá, A. M.; Prezoto, B. C.; Caetano, L. M.. Note on the life cycle of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera-Reduviidae) reared in rats and defibrinated rats' blood. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):85-87,2001.

ABSTRACT. Comparative observations were made on the development of *Triatoma infestans* fed on two kinds of blood meal. Two groups from 108 hatched nymphs were formed and fed on rats (Group 1) and comparatively on blood from rats receiving a dose of venom extract from *Lonomia obliqua* caterpillars that inhibits blood coagulation (Group 2). Both groups were maintained at laboratory conditions of 26°C ± 2°C and 60-80% humidity and fed fortnightly. No significant differences on the developmental period and mortality rate were observed between the two groups. We concluded that the amount of venom used did not seem to affect the life cycle of *T.infestans*.

KEY WORDS. *Triatoma infestans*; feeding; life cycle; *Lonomia obliqua* Venom.

REFERÊNCIAS

1. Buralli, G.M. et al. Alimentação de *Triatoma infestans* em laboratório. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, 32: 42-52,1980.
2. Cerisola, J.A et al. **El xenodiagnóstico**. Buenos Aires: Ciba Geigy; 1974.
3. Corrêa, F.M.A. Estudo comparativo do ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* alimentado em diferentes animais – (Hemiptera - Reduviidae). **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia Secretaria da Agricultura - São Paulo**, 15: 177-200, 1962.
4. Donato, J.L. et al. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of Factor X and Prothrombin. **Thrombosis Haemostasis**, 79: 539-42, 1998.
5. Isola, E.D.D; Sanchez, D.; Katzin, V. *Triatoma infestans*: Influencia de la alimentación artificial sobre su ciclo de vida. **Medicina** (Buenos Aires), 40(supl.1): 207-12, 1980.
6. Juarez, E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. **Rev. Saúde Públ.** S. Paulo, 4: 147-66, 1970.
7. Lake, P.; Friend, W.G. The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii* on the development of *Rhodnius prolixus*. **J. Insect Physiol.**, 14: 543-62, 1968.
8. Niel, L.L. et al. Effects of the addition of anticoagulants in the artificial feeding of *T. infestans*. **Medicina** (Buenos Aires), 40: (supl.1) 259, 1980.
9. Núñez, J.A.; Lazzari, C.R Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Het., Reduviidae) in the absence of a live host. I. Some factors affecting the artificial feeding. **J. Applied Entomol.**, 109: 87-92, 1990.
10. Perlowagora-Szumlewicz, A. Ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* em condições de Laboratório. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, 5: 35-47, 1953.
11. Perlowagora-Szumlewicz, A. Estudos sobre a biologia do *Triatoma infestans*, o principal vetor da doença de Chagas no Brasil (Importância de algumas de suas características biológicas no planejamento de esquemas de combate a esse vetor). **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, 21: 117-159, 1969.
12. Prezoto, B.C; Maffei, F.H.A.; Mattar, L.; Chudzinsky- Tavassi A.M.; Kelen E.M.A. Extrato de cerda de *Lonomia obliqua* (ECLO) na prevenção e lise de trombos venosos experimentais. **XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Caxambú - MG, 26-29 de agosto 1998.
13. Schofield, C.J. Triatominae. **Biologia y control**. Eurocomunica Publications, Bognor Regis, West Sussex, 1994.
14. Souza, H.B.W.T. et al. Tentativas de criação de triatomíneos por meio de alimentação “in vitro”. **Rev. Inst. Med. trop.** São Paulo, 33: 221-226, 1991.
15. Ubierno, G.O.; Niel L.L.; Fontanarossa M.E. Artificial feeding of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) with defibrinated blood. **J. Med. Entomol.**, 19: 109-110, 1982.

Recebido em 30/06/2000; Aprovado em 21/03/2001

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP – Brasil

Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in vegetables commercialized in Ribeirão Preto City, São Paulo State, Brazil

Divani M. CAPUANO^{1*}
Madalena H. T. OKINO¹
Maria José do C.B. BETTINI¹
Ana Célia S. MANGINI²

RIALA6/897

Capuano, D. M. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):89-91,2001

RESUMO. O *Cryptosporidium* sp tem sido mundialmente descrito como importante agente causal de diarreia severa e prolongada, principalmente em indivíduos com imunodeficiência, como nos casos de infecção pelo HIV. Nos EUA, têm sido comprovados nos últimos anos surtos de diarreia causados pela contaminação da água de abastecimento por oocistos deste parasita. No entanto, são poucos os relatos sobre o papel dos alimentos como possíveis fontes de infecção da criptosporidiose. Visando detectar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, foram analisadas no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, entre julho de 1997 a junho de 1998, 198 verduras coletadas de diferentes pontos comerciais do município. Foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* sp em duas hortaliças, uma rúcula e uma alface. Concluiu-se que o método parasitológico utilizado, concentração pelo formol-éter modificado com posterior coloração pelo método de Kinyoun, possa ser utilizado na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp em hortaliças, contribuindo na avaliação das condições higiênico-sanitárias das mesmas.

PALAVRAS-CHAVE. *Cryptosporidium* sp; hortaliças; Ribeirão Preto, SP.

Os coccídeos do gênero *Cryptosporidium* são protozoários parasitas capazes de infectar os trato digestivo e respiratório de humanos, mamíferos, aves e outros animais. Inicialmente considerado um parasita comensal, a partir da década de 50, passou a ter interesse veterinário, devido a sua associação com a mortalidade em aves e em bezerros. A partir de então, foram reportados casos de criptosporidiose em várias

espécies de animais. Os primeiros casos de doença no homem foram relatados a partir de 1976. Enquanto que em indivíduos imunocompetentes este parasita causa diarreia geralmente auto-limitada e de curso benigno, em imunocomprometidos, principalmente em pacientes infectados pelo HIV^{1,18}, produz diarreia prolongada e severa, que pode levar à desidratação e à síndrome de má-absorção. Também têm sido responsável por

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto - Área de Parasitologia

² Instituto Adolfo Lutz Central-Seção de Enteroparasitoses

* Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto, Rua Minas, 877 – Campos Elíseos – 14085-410 – Ribeirão Preto – SP – Fone: (0xx16) 625-5046

E-Mail: dmcapuano@ig.com.br

surtos de diarreia entre as crianças^{4,7}, principalmente em faixa etária abaixo de 5 anos de idade, e também entre os viajantes¹².

O modo de transmissão dos oocistos é diversa: de pessoa a pessoa, animal-homem, homem-animal, ou através da contaminação da água^{6,14} e dos alimentos^{16,17}. Este coccídio é resistente à maioria dos desinfetantes normalmente utilizados no tratamento de água de abastecimento, e é também bastante resistente à dessecação e ao congelamento⁴. Como o oocisto é pequeno (4 a 6 mm), isto permite que ele passe por filtros comumente usados em sistemas clássicos de filtração de água, contaminando águas de abastecimento público¹⁴ e de recreação¹³, causando surtos de diarreia. Recentemente, vários países desenvolvidos, onde ocorreram surtos de criptosporidiose provocados pela contaminação de águas de abastecimento público, foram obrigados a adotar modificações nos processos de tratamento da água.

A ampla cadeia de hospedeiros, o grande número de oocistos infectantes excretados nas fezes e a carência de desinfetantes efetivos aumentam as chances da contaminação do meio ambiente e dos alimentos. No entanto, diferentemente da água, o papel do *Cryptosporidium* como causador de surtos de diarreia por contaminação alimentar não tem sido bem estabelecido¹⁰. Em 1993, o primeiro surto bem documentado da criptosporidiose veiculada por alimento ocorreu em Maine, USA, causada por um suco de maçã¹⁶. Mais recentemente, outros alimentos vêm sendo incriminados como possíveis fontes de infecção para o *Cryptosporidium*^{5,15}.

O limitado número de oocistos nas amostras suspeitas e a falta de métodos sensíveis de detecção do *Cryptosporidium* em alimentos, uma vez que os métodos desenvolvidos são para a detecção nas fezes e em amostras de águas ambientais, contribuem para o pouco relato da contaminação de alimentos¹⁰. Vários métodos para a detecção deste parasita em alimentos têm sido testados, como RIFI com anticorpos monoclonais marcado com fluoresceína, aglutinação em látex, ELISA (enzime-linked immunosorbent assays), quimioluminescência e PCR (Polymerase Chain Reaction)¹⁰. O PCR, combinado com a sonda de hibridização de DNA, é um método de detecção promissor¹⁰.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, São Paulo.

A amostragem foi constituída por 198 hortaliças, coletadas aleatoriamente pela equipe da VISA (Vigilância Sanitária) Municipal de Ribeirão Preto, entre julho de 1997 a

junho de 1998, de estabelecimentos como supermercados, feiras livres, quitandas e varejões, CEASA, hortas e vendedores ambulantes, dando-se preferência à alface. As verduras foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos de primeiro uso, sem contato manual e enviadas ao IAL de Ribeirão Preto, para análises bacteriológica e parasitológica.

A análise parasitológica das hortaliças foi realizada segundo descrito por Takayanagui et al.¹⁹, com posterior coloração das lâminas pelo método de Kinyoun¹¹. A análise bacteriológica consistiu na determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais^{3,20} e pesquisa de *Salmonella*^{2,3}. Para o cálculo do NMP de coliformes fecais utilizou-se a tabela de Hoskins⁸.

Os resultados revelaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp, medindo entre 4 a 5 mm de diâmetro, em 2 hortaliças, uma rúcula e uma alface. Ambas também apresentaram concentração de coliformes fecais acima do permitido pela legislação em vigor, mas com ausência de *Salmonella*.

A contaminação fecal de alimentos representa um sério problema de saúde pública, principalmente nos países sub-desenvolvidos, onde as condições higiênico-sanitárias são deficientes. Entretanto, não se conhece a real magnitude do problema, devido à inexistência de sistemas eficazes de vigilância sanitária⁹. Como não há legislação adequada para as parasitoses transmitidas por contaminação de hortaliças, o controle tem se baseado principalmente em medidas de educação sanitária e de saneamento básico. Neste contexto, o laboratório exerce um papel importante, buscando novos métodos diagnósticos na análise parasitológica, bem como aprimorando as já existentes.

As técnicas atualmente desenvolvidas para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em alimentos como o PCR envolvem um alto custo, impossibilitando o uso das mesmas na rotina de muitos laboratórios. No entanto, os métodos de estudo desenvolvidos para a detecção deste parasita nas fezes e em amostras de água já estão bem estabelecidos. Pensamos que algumas destas técnicas poderiam ser utilizadas para a detecção do parasita em alimentos, dependendo do nível de contaminação e do pré-tratamento da amostra. Assim, este estudo veio demonstrar a possibilidade da detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp, utilizando uma técnica já padronizada para a pesquisa deste parasita nas fezes, e contribuiu para um melhor monitoramento das condições higiênico-sanitárias das hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto.

RIALA6/897

Capuano, D. M. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in vegetables commercialized in Ribeirão Preto City, São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):89-91, 2001

ABSTRACT. *Cryptosporidium* spp. has been described worldwide as an important causal agent of severe and prolonged diarrhea, mainly in immunocompromised patients, particularly those with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Outbreaks of cryptosporidiosis due to contaminated public water supplies have been documented in the United States. Nevertheless, there are only a few reports about the

role of food as a possible source of infection of cryptosporidiosis. The objective of the present study was to detect the presence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in vegetables marketed in the city Ribeirão Preto, Brazil. From July 1997 to June 1998, 198 vegetables collected in different commercial points of the city were analysed in Adolfo Lutz Institute – Ribeirão Preto. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were found in two vegetables, one in arrugula and one in lettuce. We concluded that the parasitological methods used can be useful in the detection of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in vegetables and contribute to the evaluation of the hygienic and sanitary conditions of vegetables.

KEY WORDS. *Cryptosporidium* spp.; vegetables; Ribeirão Preto.

REFERÊNCIAS

1. Baraldi, S.R.; Marques, E.G.L.; Dias, R.M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1): 97-103, 1999.
2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, **Diário Oficial da União**, Seção 1, p. 45, 10 de janeiro de 2001.
3. Brasil. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 451, **Diário Oficial da União**, Seção 1, p. 4, 02 de julho de 1998.
4. Cordel, R.L.; Addis, D.G. Cryptosporidiosis in child care settings: A review of the literature and recommendations for prevention and control. **Ped. Infect. Dis. J.**, 13: 210-217, 1994.
5. Fayer, R. et al. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. **Emerging Infect. Dis.**, 5(5): 706-710, 1999.
6. Fricker, C.R. e Crabb, J.H. Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. In: Baker, J.; Muller, R. e Rollinson, D. Opportunistic protozoa in humans. **Advances Parasit.**, 40: 241-278, Academic Press, San Diego, 1998.
7. Griffiths, J.K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. In: Baker, J.; Muller, R. e Rollinson, D. Opportunistic protozoa in humans. **Advances Parasit.**, 40: 37-85, Academic Press, San Diego, 1998.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. University of Toronto, Toronto, 1978.
9. Käferstein, F.K. Food safety: a commonly underestimated public health issue. **World Health Statistics Quarterly**, 50: 3-4, 1997.
10. Laberge, I.; Griffiths, M.W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **Int. J. Food Microbiol.**, 31: 1-26, 1996.
11. Lennette, E.H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 4th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1985.
12. Ma, P. et al. Cryptosporidiosis in tourists returning from Caribbean. **New England J. Med.**, 312: 647-648, 1985.
13. MacKenzie, W.R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England J. Med.**, 331: 161-167, 1994.
14. MacKenzie, W.R.; Kasmierzak, J.S.; Davis, J.P. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. **Epidemiol. Infect.**, 115: 545-553, 1995.
15. Mead, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infect. Dis.**, 5(5): 607-625, 1999.
16. Millard, P.S.; Gensheimer, K.F.; Addis, D.G. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **JAMA**, 272: 1592-1596, 1994.
17. Petersen, C. *Cryptosporidium* and the food supply. **Lancet**, 345: 1128-1129, 1995.
18. Sauda, F.C. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **J. Parasit.**, 79(3): 454-456, 1993.
19. Takayanagi, O.M. et al. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. **Rev. Soc. Bras. Med. trop.**, 33(2): 169-174, 2000.
20. Vanderzant, C.; Splittsoesser, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3rd ed. American Public Health Association; 1992, 1100p.

Recebido em 26/04/2001; Aprovado em 02/08/2001

Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil

Pinto, P. L. S. **Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil.** São Paulo; 2000. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

A circulação de *Trypanosoma cruzi* foi estudada em animais silvestres, capturados em duas regiões do Estado de São Paulo com características ecológicas e epidemiológicas distintas, tendo como parâmetros a transmissão humana, em áreas com ou sem domiciliação de triatomíneos. As áreas estudadas compreenderam a região do Planalto Ocidental Paulista, município de Araraquara, antiga área endêmica e regiões do Vale do Ribeira e Litoral Norte, municípios de Eldorado, Iguape e Ilha Bela, consideradas áreas indenes.

Dos 198 animais capturados, foram isoladas 16 amostras de tripanossomos de 11 hospedeiros mamíferos, sendo 1 *Didelphis albiventris*, 5 *D. marsupialis*, 2 *Proechimys iheringi* e 3 *Philander opossum*.

Das 16 amostras, 9 foram isoladas de xenocultura, 4 de hemocultura e 3 de cultura do aspirado de fígado e baço. Em um marsupial (*D. marsupialis*) foram isolados flagelados pelos três métodos, em outros marsupiais (1 *D. albiventris* e 2 *P. opossum*) os parasitas foram isolados por dois métodos e em sete animais (5 marsupiais e 2 roedores) por um único procedimento.

Os critérios morfológicos permitiram classificar os 16 isolados como *T. cruzi*. Todas as amostras mostraram-se de baixa virulência para ratos e camundongos. Foi possível através da

utilização dessas 3 técnicas, selecionar diferentes populações de *T. cruzi* de um mesmo hospedeiro.

A amplificação do minicírculo de kDNA dos isolados, pela técnica de PCR, com os “primers” P35/36 confirmaram o diagnóstico de *T. cruzi*. A caracterização molecular dos isolados foi baseada na amplificação, pela técnica de PCR, de um segmento da região intergênica do gene de mini-exon, que define dois grupos genéticos maiores, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Das 9 amostras isoladas de *Didelphis*, 7 foram classificadas como do tipo *T. cruzi* I e 2 como do tipo *T. cruzi* II. Estes achados confirmam a circulação preferencial da linhagem *T. cruzi* I em marsupiais do gênero *Didelphis*. Os isolados de *Proechimys* e *Philanders*, todos procedentes do município de Ilha Bela, não puderam ser definidos pelo marcador molecular do gene de mini-exon.

A variabilidade dos isolados foi estudada pela técnica de RAPD. Os padrões dos isolados *T. cruzi* I foram distintos dos observados nos isolados *T. cruzi* II. Maiores similaridades foram observadas em isolados pertencentes à mesma espécie de animal reservatório e originário da mesma área geográfica. Estes dados sugerem uma maior homogeneidade das populações de *T. cruzi* circulando em uma mesma área geográfica.

* Tese disponível na biblioteca do I.A.L.

Análise enantiosseletiva de atenolol em fluidos biológicos e formulações

Iha, Maria Helena. **Análise enantiosseletiva de atenolol em fluidos biológicos e formulações.** Ribeirão Preto – SP; 2001. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP].

O atenolol é um antagonista β_1 -adrenoceptor, usado no tratamento de várias doenças cardiovasculares tais como a hipertensão e a angina pectoris, entre outras. Estudos têm mostrado que a atividade farmacológica principal reside no S-enantiômero e que a disposição cinética também é estereosseletiva, sendo, portanto, necessário analisar os enantiômeros individualmente em fluidos biológicos. Neste estudo, foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos para análise dos enantiômeros do atenolol em fluidos biológicos, empregando a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida para preparação das amostras. Também foi desenvolvido um

método para análise enantiosseletiva de atenolol em formulações. Primeiramente foram avaliadas nove colunas quirais para serem utilizadas na análise cromatográfica: duas colunas baseadas em proteínas, a Chiral AGP e a Ultron ES-OVM, duas colunas baseadas em derivados de amilose, a Chiralpak AS e a Chiralpak AD e cinco colunas baseadas em derivados de celulose, a Chiralcel OD-H, a Chiralcel OB-H, a Chiralcel OJ, a Chiralcel OD-R e a Chiralcel OJ-R. A coluna que apresentou melhor resolução dos enantiômeros do atenolol foi a Chiralcel OD-H, empregando como fase móvel hexano:etanol (85:15) adicionado de 0,1% de dietilamina. Esta coluna foi utilizada

Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil

Pinto, P. L. S. **Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil.** São Paulo; 2000. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

A circulação de *Trypanosoma cruzi* foi estudada em animais silvestres, capturados em duas regiões do Estado de São Paulo com características ecológicas e epidemiológicas distintas, tendo como parâmetros a transmissão humana, em áreas com ou sem domiciliação de triatomíneos. As áreas estudadas compreenderam a região do Planalto Ocidental Paulista, município de Araraquara, antiga área endêmica e regiões do Vale do Ribeira e Litoral Norte, municípios de Eldorado, Iguape e Ilha Bela, consideradas áreas indenes.

Dos 198 animais capturados, foram isoladas 16 amostras de tripanossomos de 11 hospedeiros mamíferos, sendo 1 *Didelphis albiventris*, 5 *D. marsupialis*, 2 *Proechimys iheringi* e 3 *Philander opossum*.

Das 16 amostras, 9 foram isoladas de xenocultura, 4 de hemocultura e 3 de cultura do aspirado de fígado e baço. Em um marsupial (*D. marsupialis*) foram isolados flagelados pelos três métodos, em outros marsupiais (1 *D. albiventris* e 2 *P. opossum*) os parasitas foram isolados por dois métodos e em sete animais (5 marsupiais e 2 roedores) por um único procedimento.

Os critérios morfológicos permitiram classificar os 16 isolados como *T. cruzi*. Todas as amostras mostraram-se de baixa virulência para ratos e camundongos. Foi possível através da

utilização dessas 3 técnicas, selecionar diferentes populações de *T. cruzi* de um mesmo hospedeiro.

A amplificação do minicírculo de kDNA dos isolados, pela técnica de PCR, com os “primers” P35/36 confirmaram o diagnóstico de *T. cruzi*. A caracterização molecular dos isolados foi baseada na amplificação, pela técnica de PCR, de um segmento da região intergênica do gene de mini-exon, que define dois grupos genéticos maiores, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Das 9 amostras isoladas de *Didelphis*, 7 foram classificadas como do tipo *T. cruzi* I e 2 como do tipo *T. cruzi* II. Estes achados confirmam a circulação preferencial da linhagem *T. cruzi* I em marsupiais do gênero *Didelphis*. Os isolados de *Proechimys* e *Philanders*, todos procedentes do município de Ilha Bela, não puderam ser definidos pelo marcador molecular do gene de mini-exon.

A variabilidade dos isolados foi estudada pela técnica de RAPD. Os padrões dos isolados *T. cruzi* I foram distintos dos observados nos isolados *T. cruzi* II. Maiores similaridades foram observadas em isolados pertencentes à mesma espécie de animal reservatório e originário da mesma área geográfica. Estes dados sugerem uma maior homogeneidade das populações de *T. cruzi* circulando em uma mesma área geográfica.

* Tese disponível na biblioteca do I.A.L.

Análise enantiosseletiva de atenolol em fluidos biológicos e formulações

Iha, Maria Helena. **Análise enantiosseletiva de atenolol em fluidos biológicos e formulações.** Ribeirão Preto – SP; 2001. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP].

O atenolol é um antagonista β_1 -adrenoceptor, usado no tratamento de várias doenças cardiovasculares tais como a hipertensão e a angina pectoris, entre outras. Estudos têm mostrado que a atividade farmacológica principal reside no S-enantiômero e que a disposição cinética também é estereosseletiva, sendo, portanto, necessário analisar os enantiômeros individualmente em fluidos biológicos. Neste estudo, foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos para análise dos enantiômeros do atenolol em fluidos biológicos, empregando a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida para preparação das amostras. Também foi desenvolvido um

método para análise enantiosseletiva de atenolol em formulações. Primeiramente foram avaliadas nove colunas quirais para serem utilizadas na análise cromatográfica: duas colunas baseadas em proteínas, a Chiral AGP e a Ultron ES-OVM, duas colunas baseadas em derivados de amilose, a Chiralpak AS e a Chiralpak AD e cinco colunas baseadas em derivados de celulose, a Chiralcel OD-H, a Chiralcel OB-H, a Chiralcel OJ, a Chiralcel OD-R e a Chiralcel OJ-R. A coluna que apresentou melhor resolução dos enantiômeros do atenolol foi a Chiralcel OD-H, empregando como fase móvel hexano:etanol (85:15) adicionado de 0,1% de dietilamina. Esta coluna foi utilizada

durante o desenvolvimento dos métodos para a análise enantiosseletiva do atenolol, em plasma, urina e formulações. Na extração líquido-líquido, o atenolol foi extraído do plasma e urina em meio alcalino, empregando como solvente extrator 5 mL de clorofórmio:iso-propanol (8:2). Na extração em fase sólida foi empregada a coluna C_8 e o solvente de eluição do atenolol foi o metanol. Ambas as extrações foram eficientes na recuperação do atenolol e na eliminação dos interferentes endógenos. Na avaliação da precisão foram obtidos valores de

coeficiente de variação inferiores a 10% e não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos resultados obtidos em cinco dias. Para a exatidão, o valor do erro sistemático encontrado foi menor que 10% e o teste t de Student mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das concentrações reais e encontradas utilizando ambos os métodos. O limite de quantificação foi de 10 ng/mL e a linearidade se estendeu até 5000 ng/mL para os dois métodos, o que permite o uso em estudos de disposição cinética.

Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo

Moreno, R.B. **Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo.** São Paulo; 2001. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – USP].

O pescado é uma fonte importante de proteínas, vitaminas e minerais, porém tem rápida deterioração, no qual enzimas descarboxilantes produzidas por bactérias formam as aminas biogênicas. A mais estudada é a histamina, por causar intoxicações após o consumo de peixes com alto teor dessa substância. Portanto, em 1997, a quantificação desta amina biogênica em pescado, por servir como índice químico de qualidade, passou a fazer parte do quadro de análises preconizadas pela vigilância sanitária. Justifica-se o estudo em razão da falta de dados relevantes sobre esse índice nos pescados comercializados em São Paulo. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os níveis de histamina em pescado fresco como índice de qualidade, aplicando a técnica oficial recomendada pela legislação brasileira (método fluorimétrico). O estudo foi realizado em amostras de sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), espécie marinha de peixe da família *Clupeidae*, comercializada

na CEAGESP na cidade de São Paulo, que foram limpas, tendo seus filés triturados, homogeneizados e as análises realizadas imediatamente após coleta, perfazendo um total de 40 amostras, sendo cada uma analisada em triplicata. A análise de histamina foi feita pelo método fluorimétrico, recomendado pela AOAC (2000). Verificou-se que as concentrações de histamina quantificadas nas amostras, com média de $4,14 \pm 1,92$ mg de histamina livre por 1000 g de amostra, foram mais baixas do que o limite estabelecido pela legislação brasileira, que é de 100 mg de histamina livre por 1000 g de pescado. Quanto ao método utilizado para a análise, constatou-se ser este satisfatório para a rotina laboratorial. Com relação aos teores de histamina, concluiu-se que para este conjunto de amostras de sardinhas frescas coletadas para análise, os níveis de histamina obtidos estavam dentro do limite permitido pela legislação brasileira e, segundo a literatura, considerados não-tóxicos.

* Tese disponível na biblioteca do
Faculdade de Saúde Pública da USP.

Fibra alimentar e valor nutritivo de preparações servidas em restaurantes “por quilo” (Cerqueira César) São Paulo, SP.

Garbelotti, Maria Lima. **Fibra alimentar e valor nutritivo de preparações servidas em restaurantes “por quilo” (Cerqueira César) São Paulo, SP; 2000.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Estudos têm evidenciado a importância do papel da fibra alimentar – FA – na diminuição da incidência e prevenção de doenças. O conhecimento da composição dos alimentos habitualmente consumidos pela população brasileira é útil em

razão da deficiência de dados nacionais com a metodologia adequada e sua relevância para qualquer estudo em nutrição humana. Atualmente, a procura pelos restaurantes “por quilo” vem sendo uma alternativa crescente. Uma avaliação das

durante o desenvolvimento dos métodos para a análise enantiosseletiva do atenolol, em plasma, urina e formulações. Na extração líquido-líquido, o atenolol foi extraído do plasma e urina em meio alcalino, empregando como solvente extrator 5 mL de clorofórmio:iso-propanol (8:2). Na extração em fase sólida foi empregada a coluna C_8 e o solvente de eluição do atenolol foi o metanol. Ambas as extrações foram eficientes na recuperação do atenolol e na eliminação dos interferentes endógenos. Na avaliação da precisão foram obtidos valores de

coeficiente de variação inferiores a 10% e não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos resultados obtidos em cinco dias. Para a exatidão, o valor do erro sistemático encontrado foi menor que 10% e o teste t de Student mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das concentrações reais e encontradas utilizando ambos os métodos. O limite de quantificação foi de 10 ng/mL e a linearidade se estendeu até 5000 ng/mL para os dois métodos, o que permite o uso em estudos de disposição cinética.

Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo

Moreno, R.B. **Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo.** São Paulo; 2001. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – USP].

O pescado é uma fonte importante de proteínas, vitaminas e minerais, porém tem rápida deterioração, no qual enzimas descarboxilantes produzidas por bactérias formam as aminas biogênicas. A mais estudada é a histamina, por causar intoxicações após o consumo de peixes com alto teor dessa substância. Portanto, em 1997, a quantificação desta amina biogênica em pescado, por servir como índice químico de qualidade, passou a fazer parte do quadro de análises preconizadas pela vigilância sanitária. Justifica-se o estudo em razão da falta de dados relevantes sobre esse índice nos pescados comercializados em São Paulo. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os níveis de histamina em pescado fresco como índice de qualidade, aplicando a técnica oficial recomendada pela legislação brasileira (método fluorimétrico). O estudo foi realizado em amostras de sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), espécie marinha de peixe da família *Clupeidae*, comercializada

na CEAGESP na cidade de São Paulo, que foram limpas, tendo seus filés triturados, homogêneos e as análises realizadas imediatamente após coleta, perfazendo um total de 40 amostras, sendo cada uma analisada em triplicata. A análise de histamina foi feita pelo método fluorimétrico, recomendado pela AOAC (2000). Verificou-se que as concentrações de histamina quantificadas nas amostras, com média de $4,14 \pm 1,92$ mg de histamina livre por 1000 g de amostra, foram mais baixas do que o limite estabelecido pela legislação brasileira, que é de 100 mg de histamina livre por 1000 g de pescado. Quanto ao método utilizado para a análise, constatou-se ser este satisfatório para a rotina laboratorial. Com relação aos teores de histamina, concluiu-se que para este conjunto de amostras de sardinhas frescas coletadas para análise, os níveis de histamina obtidos estavam dentro do limite permitido pela legislação brasileira e, segundo a literatura, considerados não-tóxicos.

* Tese disponível na biblioteca do
Faculdade de Saúde Pública da USP.

Fibra alimentar e valor nutritivo de preparações servidas em restaurantes “por quilo” (Cerqueira César) São Paulo, SP.

Garbelotti, Maria Lima. **Fibra alimentar e valor nutritivo de preparações servidas em restaurantes “por quilo” (Cerqueira César) São Paulo, SP; 2000.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Estudos têm evidenciado a importância do papel da fibra alimentar – FA – na diminuição da incidência e prevenção de doenças. O conhecimento da composição dos alimentos habitualmente consumidos pela população brasileira é útil em

razão da deficiência de dados nacionais com a metodologia adequada e sua relevância para qualquer estudo em nutrição humana. Atualmente, a procura pelos restaurantes “por quilo” vem sendo uma alternativa crescente. Uma avaliação das

durante o desenvolvimento dos métodos para a análise enantiosseletiva do atenolol, em plasma, urina e formulações. Na extração líquido-líquido, o atenolol foi extraído do plasma e urina em meio alcalino, empregando como solvente extrator 5 mL de clorofórmio:iso-propanol (8:2). Na extração em fase sólida foi empregada a coluna C_8 e o solvente de eluição do atenolol foi o metanol. Ambas as extrações foram eficientes na recuperação do atenolol e na eliminação dos interferentes endógenos. Na avaliação da precisão foram obtidos valores de

coeficiente de variação inferiores a 10% e não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos resultados obtidos em cinco dias. Para a exatidão, o valor do erro sistemático encontrado foi menor que 10% e o teste t de Student mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das concentrações reais e encontradas utilizando ambos os métodos. O limite de quantificação foi de 10 ng/mL e a linearidade se estendeu até 5000 ng/mL para os dois métodos, o que permite o uso em estudos de disposição cinética.

Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo

Moreno, R.B. **Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo.** São Paulo; 2001. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – USP].

O pescado é uma fonte importante de proteínas, vitaminas e minerais, porém tem rápida deterioração, no qual enzimas descarboxilantes produzidas por bactérias formam as aminas biogênicas. A mais estudada é a histamina, por causar intoxicações após o consumo de peixes com alto teor dessa substância. Portanto, em 1997, a quantificação desta amina biogênica em pescado, por servir como índice químico de qualidade, passou a fazer parte do quadro de análises preconizadas pela vigilância sanitária. Justifica-se o estudo em razão da falta de dados relevantes sobre esse índice nos pescados comercializados em São Paulo. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os níveis de histamina em pescado fresco como índice de qualidade, aplicando a técnica oficial recomendada pela legislação brasileira (método fluorimétrico). O estudo foi realizado em amostras de sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), espécie marinha de peixe da família *Clupeidae*, comercializada

na CEAGESP na cidade de São Paulo, que foram limpas, tendo seus filés triturados, homogeneizados e as análises realizadas imediatamente após coleta, perfazendo um total de 40 amostras, sendo cada uma analisada em triplicata. A análise de histamina foi feita pelo método fluorimétrico, recomendado pela AOAC (2000). Verificou-se que as concentrações de histamina quantificadas nas amostras, com média de $4,14 \pm 1,92$ mg de histamina livre por 1000 g de amostra, foram mais baixas do que o limite estabelecido pela legislação brasileira, que é de 100 mg de histamina livre por 1000 g de pescado. Quanto ao método utilizado para a análise, constatou-se ser este satisfatório para a rotina laboratorial. Com relação aos teores de histamina, concluiu-se que para este conjunto de amostras de sardinhas frescas coletadas para análise, os níveis de histamina obtidos estavam dentro do limite permitido pela legislação brasileira e, segundo a literatura, considerados não-tóxicos.

* Tese disponível na biblioteca do Faculdade de Saúde Pública da USP.

Fibra alimentar e valor nutritivo de preparações servidas em restaurantes “por quilo” (Cerqueira César) São Paulo, SP.

Garbelotti, Maria Lima. **Fibra alimentar e valor nutritivo de preparações servidas em restaurantes “por quilo” (Cerqueira César) São Paulo, SP; 2000.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Estudos têm evidenciado a importância do papel da fibra alimentar – FA – na diminuição da incidência e prevenção de doenças. O conhecimento da composição dos alimentos habitualmente consumidos pela população brasileira é útil em

razão da deficiência de dados nacionais com a metodologia adequada e sua relevância para qualquer estudo em nutrição humana. Atualmente, a procura pelos restaurantes “por quilo” vem sendo uma alternativa crescente. Uma avaliação das

refeições oferecidas aos indivíduos é fundamental para se conhecer seus hábitos alimentares. Neste intuito, realizou-se um estudo para avaliar: o teor das fibras alimentares totais, solúveis, insolúveis e o valor nutritivo das preparações mais consumidas em restaurantes por quilo; a quantidade de fibras alimentares nas preparações, segundo porção individual servida; o teor médio da fibra alimentar oferecida semanalmente nos restaurantes estudados e a colaboração com dados das tabelas de composição de alimentos. O estudo foi realizado em quatro restaurantes na região de Cerqueira César, São Paulo, SP, durante cinco dias, por quatro semanas, no mês de julho de 1999. Foram analisadas 53 amostras colhidas. A determinação da composição centesimal dos alimentos seguiu os métodos oficiais do Instituto Adolfo Lutz. Para o cálculo do valor calórico, foram utilizados os fatores de conversão de Atwater. A fibra alimentar e suas frações solúveis e insolúveis foram determinadas conforme o método enzimico-gravimétrico. Os teores de fibras insolúveis são mais elevados que os das solúveis na

maioria dos alimentos. O feijão representa a principal fonte de fibras totais e insolúveis. Os alimentos que oferecem maior quantidade de fibra por porção servida são a feijoada com 12,10g e o feijão com 9,72 g. Observa-se uma faixa de 39,10 a 47,10 g/100g de lipídios nas refeições oferecidas nos restaurantes acima do recomendável (máx. de 30 g/100g). A quantidade de carboidratos oferecida nas refeições destes restaurantes é 36,40 a 44,80 g/100g, abaixo das recomendações atuais (mín. de 55 g/100g). O restaurante “por quilo” é uma boa alternativa para conseguir a ingestão ideal de fibra alimentar. Porém, a quantidade “per capita” de lipídios oferecida é alta e a de carboidratos, baixa considerando-se a quantidade recomendada. Os dados experimentais de fibra alimentar encontrados para os alimentos neste estudo estão de acordo com pelo menos uma das obras da literatura consultada ou estiveram dentro das médias dos valores registrados nas demais. Os dados de umidade, cinza e proteínas, exceto lipídios, encontrados na literatura, não diferem da maioria dos valores dos alimentos analisados.

* Tese disponível na biblioteca na
Faculdade de Saúde Pública da USP

ERRATA DO VOLUME ANTERIOR
Rev. Instituto Adolfo Lutz, 59(1/2), 2000

Artigo RIALA6/875

Pg. 3 – Figura 2. Faltaram as legendas. Imagem superior esquerda (Controle CHO-K1), imagem superior direita (Membrana PVP(0% SEO), imagem inferior esquerda (Controle Negativo) e imagem inferior direita (Controle Positivo).

Artigo RIALA6/ 880

Os nomes dos sorotipos de Salmonella apresentam nomenclatura diferenciada. Portanto onde se lê o nome do sorotipo em itálico o correto é a grafia em tipo normal.

pg. 33 resumo linha 4 *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo *enteritidis* (*S. enteritidis*) ler *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis (*S. Enteritidis*)

pg. 33 resumo linha 7 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 33 resumo linha 10 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – parágrafo 1 linha 9, *S. typhimurium* ler *S. Typhimurium* e *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – parágrafo 2 linha 8 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 1 linha 6 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 1 linha 8 *S. berta* ler *S. Berta*, *S. dublin* ler *S. Dublin*,

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 1 linha 9 *S. heidelberg* ler *S. Heidelberg*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 2 linha 4 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 2 linha 7 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 3 linha 1 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 4 linha 3 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 5 linha 5 *S. oranienburg* ler *S. Oranienburg*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 5 linha 8 *S. albany* ler *S. Albany*, *S. agona* ler *S. Agona*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 6 linha 2 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 34 – Resultados e discussão parágrafo 6 linha 5 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 36 – Resultados e discussão parágrafo 1 linha 1 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 36 – Resultados e discussão parágrafo 1 linha 5 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 37 – abstract – linha 3 *S. enterica* subsp. *Enterica* serotype *enteritidis* (*S. enteritidis*) ler *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*)

pg. 37 – abstract – linha 6 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

pg. 37 – abstract – linha 9 *S. enteritidis* ler *S. Enteritidis*

AGENDA DE EVENTOS 2001

World Congress Aoac

Kansas City – EUA
09 a 13/09/2001

Congresso Brasileiro de Microbiologia

Foz Do Iguaçu – Paraná/Brasil
21 a 25/10/2001

XII Congresso Paulista de Farmacêuticos 4º Seminário Internacional de Farmacêuticos

EXPOFAR/2001
01 a 04/11/2001
São Paulo – SP – Brasil

Encontro Nacional de Analistas de Alimentos

04 a 08/11/2001
Maceió – Alagoas – Brasil
Hotel Meliá

Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Campinas – São Paulo Brasil
06 a 09/11/2001

XII Congresso Brasileiro de Toxicologia

Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brasil
11 a 15/11/2001

AOAC América Latina E Caribe

Montevideo – Uruguai
18 a 22/11/2001

XII Env – Encontro Nacional de Virologia

4º Encontro de Virologia do Mercosul
25 a 28/11/2001
Rio Quente Resorts – Caldas Novas – GO
E-mail: sbv@icb.ufmg.br

XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia

17 a 22/02/2002
Itajaí – Santa Catarina
E-mail: cbz2002@cttmar.univali.br

The Tenth Internation Congress of Parasitology

04 a 10/08/2002
Vancouver, Canada

CURSOS

Biotecnologia Biossegurança de Engenharia Genética

Data: 2002
Rio de Janeiro – RJ
E-mail: seca@ensp.fiocruz.br

Doenças Transmissíveis Epidemiologia, Diagnóstico das Doenças Transmitidas por Vetores

Data: 2002
Rio de Janeiro – RJ
E-mail: seca@ensp.fiocruz.br

ISSN 0073-9855



9 770073 985009