



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

# REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855

RIALA 6

VOLUME 52

NÚMERO 1/2

JANEIRO/JUNHO 1992



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

**REVISTA**  
do  
**INSTITUTO**  
**ADOLFO LUTZ**

Endereço/ Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 335 — Caixa Postal 7027  
01246-902 — São Paulo, SP — Brasil

## Editora Letras & Letras

Atendimento ao consumidor:  
Av. Ceci, 1945 — Planalto Paulista  
Fone: (011) 577-5746 — CEP 04065-003  
Caixa Postal, 42070 — São Paulo, SP.

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

(\*)

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

1941 — 1900, 1-50  
1992, 52(1/2)

ISSN 0073-9855  
RIALA6

CDD18614.07205

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

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

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## DIRETOR RESPONSÁVEL

ANÍSIO DE MOURA

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz - 1992

LENI HELENA CALIXTO SOUZA DIAS

Diretora Geral do Instituto Adolfo Lutz - 1993

## COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSÉ EDUARDO TOLEZANO, Presidente

CARMO ELIAS ANDRADE MELLES

JÚLIA MARIA MARTINS DE SOUZA FELIPPE

DILMA SCALA GELLI

HEIDI PINTO MARTINS

ALICE MOMOYO ATA SAKUMA

KINUE IRINO

## REDATOR-SECRETÁRIO

LIEGE APARECIDA DE CASTRO SANTOS

---

## EDITORA LETRAS & LETRAS

DIRETOR EDITORIAL

*Carlos José Linardi*

SUPERVISÃO GRÁFICA

*Waldenes Ferreira Japyassú Filho*

FOTOCOMPOSIÇÃO, PAGINAÇÃO E FILMES

*Página Um - Programação Visual*

---

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos

- 719 Mel: Fraudes e Condições Sanitárias.  
Honey, adulteration and sanitary condition.  
CANO, C.B. E Col. .... 1-4
- 720 Efeito Cumulativo de Dicofol em larvas e imagos de *Drosophila melanogaster*.  
*Cumulative effect of Dicofol in larvae and imagines of Drosophila*.  
BARRETTO, H.H. C. e col. .... 5-8
- 721 *Rabies virus in McCoy cell line. Cytopathic effect and replication. Part I.* Vírus da raiva em linhagem celular McCoy: Parte I - Efeito citopático e replicação.  
NOGUEIRA, Y.L. .... 9-16
- 722 *Rabies virus in McCoy cell line Titration. Part II.* Vírus da raiva em linhagem celular McCoy: Parte II.  
NOGUEIRA, Y.L. .... 17-21
- 723 Análise histológica e bioquímica de *Momordica charantia* L. (melão-de-são-caetano).  
*Histological and biochemical analysis of Momordica charantia L. (melão-de-são-caetano)*.  
JORGE, L.I.F.; SAKUMA, A.G. INOMATA, E. I. .... 23-26
- 724 *Presumptive rapid infection diagnosis of parvovirus in patients with erythema infectiosum-like illness.* Diagnóstico preventivo rápido de infecção por parvovírus em pacientes com eritema infeccioso.  
TAKIMOTO, S.; TANAKA, H.; WALDMAN, E. A.; UEDA, M.; ISHIDA, M.A.; NAGAMORI, A.H.; PAIVA, T.M.; ISHIMAU, T. LACERDA, A. M. & SOUZA, M.C.O. .... 27-30
- 725 Determinação de bixin em sementes de urucum: estudo colaborativo.  
*Determination of bixin in annatto seeds: Collaborative Study*.  
YABIKU, H. Y. & TAKAHASHI, M. Y. .... 31-36
- 726 Perfil da Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990.  
*Resistance pattern of Mycobacterium tuberculosis from São Paulo State, Brazil, 1986 to 1990*.  
SILVA, E.A.M.S. e col. .... 37-40
- 727 Estabilidade do teor de iodo no sal, após tempo de prateleira e cocção.  
*Iodine content stability in salt after boiling and shelf life*.  
SILVEIRA, N.V.V e col. .... 41-45
- 728 *Ocimum micranthum* Willd - Manjerição do Brasil: Caracterizações histológica e química.  
*Ocimum micranthum Willd - Manjerição of Brazil. Histological and Chemical Characterizations*.  
JORGE, L.I.F. e col. .... 47-50
- 729 Composição em ácidos graxos de óleos vegetais comestíveis comercializados no Estado de São Paulo.  
*Fatty acid composition of edible vegetable oils commercialized in São Paulo State*.  
BADOLATO, E.S.G. e col. .... 51-62

730	Bacteriófagos fecais em águas, verduras cruas não lavadas e outros produtos alimentícios: observações quanto ao seu achado durante surto de hepatite infecciosa e em condição normal. <i>Fecal bacteriophages in water, not washed and fresh green salads and other food products - Observation about its presence during infectious hepatitis outbreak and in normal condition.</i> GELLI, D.S.; e col. ....	63-69
731	A Bacteriologia da tuberculose: Atividades do Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, São Paulo, Brasil. <i>Tuberculosis bacteriology: activities of Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, São Paulo, Brazil.</i> SILVA, E.A.M. e col. ....	71-76
732	Avaliação de parâmetros físico-químicos na detecção do extrato solúvel de soja em misturas lácteas. <i>Evaluation of physical-chemical parameters for detection of soy soluble extract in lacteous mixture.</i> SILVEIRA, N.V.V. e col. ....	77-81
733	Incidência de aflatoxinas em paçocas de amendoim consumidas na cidade de Campinas, Estado de São Paulo. <i>Incidence of aflatoxins in peanut sweet bars, consumed in Campinas, São Paulo, Brazil.</i> FREITAS, V.P.S. & BADOLATO, M.I.C. ....	83-87
734	Estudo Comparativo de métodos de extração para determinação de cafeína em café. <i>Comparative study of extraction methods to determine caffeine in coffee.</i> AMARAL MELLO, M.R.P. e col. ....	89-85
735	Níveis de pesticidas organoclorados em gordura de frango 1988-1991. <i>Levels of organochlorine pesticide residues in chicken fat 1988-1991.</i> BARRETTO, H.H.C. e col. ....	97-100
736	Frutosaminas: uma revisão dos últimos dez anos. <i>Fructosamine: a review for the last ten years.</i> MARTINS, H.P. e col. ....	101-104
737	Anomalia em genitália de um exemplar de fêmea de <i>Lutzomyia intermedia</i> Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). Nota científica. <i>Genitalia anomaly found in a female specimen of Lutzomyia intermedia Lutz &amp; Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). - Scientific note.</i> TANIGUCHI, H.H.; NOVELLI, M.A. & TOLEZANO, J.E. ....	105-106

## MEL: FRAUDES E CONDIÇÕES SANITÁRIAS\*

Cristiane B. CANO \*\*  
Claydes de Quadro ZAMBONI \*\*  
Helena Ide ALVES \*\*  
Nazareth SPITERI \*\*  
Márcia Bittar ATUI \*\*  
Marlene Correia dos SANTOS \*\*  
Luzia Ilza Ferreira JORGE \*\*  
Ulysses PEREIRA \*\*  
Regina Maria M. RODRIGUES \*\*

RIALA 6/719

CANO, C. B. e col. Mel: Fraudes e condições sanitárias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 1-4, 1992.

**RESUMO:** A fim de verificar as condições higiênicas e a genuinidade do mel consumido em São Paulo, Capital, foram analisadas 173 amostras de méis enviadas ao Instituto Adolfo Lutz por consumidores ou pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo, SP. Foram condenadas 12 amostras (6,8%) como fraudadas, porque, tanto as determinações físico-químicas, como as microscópias, demonstraram que os produtos eram constituídos por xarope de açúcar; 122 (70,5%) condenadas pela análise microscópica, por estarem em condições higiênicas insatisfatórias, contendo fragmentos de insetos mortos, fungos, nematóides, ácaros ou por conter elementos histológicos de cana-de-açúcar ou de vegetais não caracterizados; 58 (33,5%), condenadas pela análise físico-química, por estarem fora dos padrões das Normas Higiênicas Sanitárias e Tecnológicas para mel, aprovadas pela Secretaria de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

**DESCRITORES:** Mel: adulteração em - Fraudes em - Condições sanitárias de/ Análise físico-química. Análise microscópica.

### INTRODUÇÃO

Mel é o produto natural elaborado pelas abelhas a partir de néctar de flores e/ou exsudatos sacarínicos de plantas<sup>1</sup>. O pólen é utilizado pelas abelhas como fonte de proteínas e pode ou não estar presente no produto, dependendo do modo de coleta e do processo de extração e purificação<sup>2</sup>. O mel pode conter fragmentos de cera de abelha, abelhas mortas e grãos de pólen; com a filtração os insetos e a cera são removidos, assim como o pólen<sup>2,8</sup>.

Com o incremento do consumo de produtos naturais, o mel tem sido utilizado e comercializado mais intensamente, de modo que aumenta também a

possibilidade de fraudes, adulterações e manipulação inadequada.

O objetivo desta pesquisa foi o de divulgar técnicas de análise físico-química e microscópica do mel, tendo em vista que na literatura existem poucos trabalhos com essa finalidade, além de verificar as condições sanitárias e a genuinidade dos méis consumidos na cidade de São Paulo, procurando contribuir para a defesa do consumidor e estimular os apicultores na realização de um trabalho íntegro e confiável.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 173 amostras de méis enviadas ao Instituto Adolfo Lutz por consumidores e pelo

\* Realizado nas Seções de Bebidas e de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado na 3ª Reunião do Instituto Biológico em São Paulo, SP, 1990.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo, de 1987 a 1990.

A análise físico-química obedeceu aos seguintes paradigmas: determinações de acidez, glicose, sacarose, resíduo mineral fixo e umidade, além das reações Fiehe, Lugol e Lund, e foi realizada segundo as técnicas descritas nas *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3ª edição<sup>3,7</sup>.

A análise microscópica compreendeu a identificação dos grãos de pólen, de elementos histológicos de vegetais, amidos, substância amilífera alterada, substância amorfa, partículas carbonizadas e pesquisa de matérias estranhas (insetos, fragmentos de insetos, larvas de insetos nematóides, ácaros, etc), segundo metodologia da Seção de Microscopia Alimentar<sup>5,9,10</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos estão relacionados no quadro 1 e nas Tabelas 1 e 2.

O quadro 1 apresenta o percentual de méis condenados pelas análises físico-químicas e microscópicas.

A tabela 1 apresenta o número de amostras de méis condenados em cada determinação físico-química em relação aos 58 méis condenados.

A tabela 2 apresenta as matérias estranhas identificadas microscopicamente e o número de amostras contendo cada uma, em relação às 122 amostras condenadas.

QUADRO 1  
Amostra de méis condenados pelas análises físico-química e microscópica

Amostra	Total	Condenação			
		Físico-química		Microscópica	
		n.º	%	n.º	%
Mel	173	58	33,5	122	70,5

TABELA 1  
Determinação Físico-química dos 58 méis condenados

	Mel	
	n.º	%
Fiehe	28	48,3
Lugol	10	17,2
Lund	30	51,7
Acidez	21	36,2
Glicose	10	17,2
Sacarose	6	10,3
Resíduo Mineral Fixo	4	6,9
Umidade	14	24,1

TABELA 2  
Matérias estranhas em 122 méis condenados por microscopia

Matérias estranhas	Amostras	
	n.º	%
Vegetais não caracterizados	43	35,2
Amido e substância amilífera alterada	19	23,2
Substâncias amorfas	13	10,7
Cana-de-açúcar	10	8,2
Partículas carbonizadas	2	1,6
Fragmentos de insetos	82	67,2
Fungos	39	32,0
Nematóides e protozoários	6	4,9
Insetos	6	4,9
Ácaros	2	1,6
Protozoários	2	1,6

Obs.: Os insetos e os fragmentos de insetos encontrados eram da espécie *Apis mellifera* (abelha).



## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados das análises de 173 amostras de mel levaram à conclusão de que 58 (33,5%) estavam fora dos padrões da legislação em vigor, em relação à análise físico-química e 122 (70,5%) em relação à análise microscópica. 47 (27,2%) amostras de mel foram condenadas tanto pelas determinações físico-químicas como pela análise microscópica, sendo que 12 (6,8%) estavam fraudadas, ou seja, os produtos eram constituídos por xarope de açúcar. Dos 58 méis condenados pela análise físico-química, verificou-se que 48,3% das amostras apresentaram reação de Fiehe positiva, indicando adição de xarope de glicose ao mel ou superaquecimento<sup>2,8</sup>. 51,7% das amostras apresentaram reação de Lund fora do intervalo estabelecido para o precipitado<sup>1</sup>, indicando que houve adição de proteínas ou perdas durante o processamento, 17,2% das amostras apresentaram reação de Lugol positiva, enquanto que ao exame microscópico 23,6% das amostras apresentaram amido ou substância amilífera alterada. Esta diferença pode ser explicada pela baixa sensibilidade do método químico para detectar quantidades pequenas de amido ou dextrina, 36,2% e 24,1% das amostras apresentaram teores, respectivamente, de acidez e umidade elevados, indicando processo tecnológico inadequado, acelerando o processo de fermentação<sup>8</sup>.

A presença de matérias estranhas em 122 (70,3%) amostras indica as péssimas condições de higiene dos méis analisados.

A detecção microscópica de vegetais não caracterizados e substância amorfa indica, predominantemente, filtração inadequada, e de amido, de substância amilífera alterada e de cana-de-açúcar, fraude e a de partícula carbonizada, o emprego de aquecimento e filtração impróprios.

Em alguns países, como Inglaterra e França, a identificação dos grãos de pólen, conhecida como melissopalinoLOGIA, é utilizada para indicar a procedência geográfica do mel<sup>4,5,6</sup>. Entretanto, os resultados das análises microscópicas e físico-químicas dos méis fraudados, levaram à conclusão que aqueles foram confeccionados com xarope de açúcar e adicionados de pólen. Isto pode sugerir que, em muitos méis, haja adição de pólen; se fôssemos pesquisar a origem geográfica dos méis do comércio pela identificação da espécie de planta através do pólen, poderíamos chegar a conclusões errôneas.

A presença de nematóides pode ser explicada pela falta de cuidado do apicultor no trato com o mel e a cera de abelha, uma vez que os nematóides vivem no intestino da traça da cera (*Galeria melonella*)<sup>8</sup>.

Os fragmentos de insetos foram responsáveis pela condenação do maior número de méis analisados (67,2%); em seguida aparecem os fungos filariformes, leveduriformes e esporos (32% das amostras).

RIALA 6/719

CANO, C. B. *et al.* Honey, adulteration and sanitary condition. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2):1-4, 1992.

Samples of 173 honeys from the commerce of São Paulo city, were analysed by microscopical and chemical analysis to verify their authenticity and their sanitary condition. The results showed that 12 samples (6,8%) were adulterated, because they were cane sugar sirup, 122 samples (70,51%), were disapproved by microscopical examination, in unsanitary condition, containing insect fragments, dead insects, mold, nematode, mite or by the detection of cane sugar histologic elements or another vegetable not characterized elements; 58 samples (33,5%) were disagreeing with the pattern of Brazilian Legislation.

DESCRIPTORS: Honey adulteration in Sanitary condition; Chemical analysis; Microscopical analysis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, Leis, decretos, etc. Portaria SIPA nº 006 de 27 de julho de 1985. *Diário Oficial*, Brasília, 2/ago/85, Seção I, p. 11103. Aprova normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para o mel.
2. GUIMARÃES, N. F. — *Apicultura: a ciência da longa vida*. Belo Horizonte, Editora Itatiaia, 1989, p. 148.
3. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3ª ed, São Paulo, 1985, p. 159-65.
4. JAMES, G. N. - The examination of pollen from honey. *J. Ass. Publ. Anal.*, 7: 128-32, 1969.
5. LOUVEAUX, J. — *Atlas photographique d'analyse pollinique des miels*. Paris, Service de la répression des fraudes et du controle de la qualité, 1970. (Annexes microphotographiques aux méthodes officiels d'analyse). V.3.
6. SAWYER, R. W. — MellissopalinoLOGY in the determination of geographical and floral origin of honey. *Ass. Publ. Anal.*, 13, 64-71, 1975.
7. VALENCIANO, O. A. — *Guia practica des analisis bromotologicas*, Buenos Aires, Ed. Hispano-Americano, s.d. p. 776.
8. VIDAL, R. — Mel: *análise e adulterações*. In: Simpósio sobre apicultura, Jaboticabal, 1984. *Anais*, p. 47-55.

9. WALLIS, T. E. — *Microscopia Analítica: sus fines y metodos en relation a los alimentos, agua y medicamentos*. Zaragoza, Acribia, 1968, p. 122-4.
10. ZAMBONI, C. Q. *et alii* - Métodos para pesquisa de material estranho (sujidades) e elementos histológicos de vegetais em alimentos. In: *Manual de Análise Microscópica de Alimentos*, 1986, p. 27.

*Recebido para publicação em 23 de maio de 1991.*

## FRUTOSAMINA: UMA REVISÃO DOS ÚLTIMOS DEZ ANOS

Heidi Pinto MARTINS\*  
Lúcia Nassi CASTILHO\*

Riala 6/736

Martins, H.P. e col. — Frutosaminas: uma revisão dos últimos dez anos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 52(1/2):101-104, 1992.

A manutenção da taxa de glicose sangüínea tão próxima quanto possível dos níveis normais tem sido amplamente aceita como um bom índice de acompanhamento, podendo reduzir significativamente as seqüelas do diabetes<sup>7</sup>. Medidas diárias múltiplas da glicemia não são freqüentemente um caminho prático no controle do diabético, embora pudessem ser consideradas como o melhor método de controle.

Durante a década de 70, diversas técnicas para a mensuração das hemoglobinas glicadas tornaram-se acessíveis à grande maioria dos laboratórios<sup>5</sup>, fornecendo uma indicação retrospectiva dos níveis de glicose sanguínea das últimas quatro semanas e têm sido largamente adotadas como uma maneira usual deste mesmo controle diabético. A maioria das técnicas tentam medir a HbA<sub>1c</sub>, originalmente descrita como a mais abundante das frações glicadas da hemoglobina que se encontram aumentadas nos diabéticos.

Durante a última década vários métodos foram desenvolvidos para mensurar outras proteínas glicadas além da HbA<sub>1c</sub>. A descoberta de que outras proteínas séricas são glicadas em caminhos análogos ao da hemoglobina despertou muito interesse quanto à sua aplicação clínica. A albumina glicada tem sido indicada como um índice para o controle glicêmico num tempo de duas, três semanas, um período menor do que o da hemoglobina glicada, mas suficiente para ser adotada como controle<sup>28</sup>.

### INTRODUÇÃO

Os métodos para a medida das proteínas glicadas incluem afinidade cromatográfica<sup>7,28</sup>, espectrofotometria baseada na reação do ácido tiobarbitúrico<sup>5</sup> e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de resíduos lisina glicados após hidrólise das proteínas<sup>22</sup>. Cada um desses métodos é capaz de dar bons resultados em mãos experientes. Contudo, com exceção do método da afinidade cromatográfica os outros são muito caros, exigindo aparelhagem especial, o que dificulta sua utilização na rotina da maioria dos laboratórios clínicos.

Em 1983 Johnson, Metcalf e Baker<sup>11</sup> descreveram um ensaio de frutosamina baseado na habilidade dos resíduos cetoaminas glicados das proteínas séricas em reduzir o corante azul de nitrotetrazólio (NBT). O termo *frutosamina* se refere à estrutura do produto de

rearranjo da cetoamina (1-deoxi-1-E-llsl-albumina-frutose) formada como o resultado da reação não enzimática entre a glicose e o grupo E amino dos resíduos lisina da albumina. A interferência de outras substâncias redutoras do soro (glicosos e uratos) na determinação das frutosaminas pode ser evitada mantendo o pH da reação, ao redor de 10, 35.

A concentração da frutosamina reflete largamente o nível da albumina glicada e só 20% da atividade redutora se deve a outras proteínas séricas<sup>12</sup>.

A facilidade com que o ensaio da frutosamina pode ser automatizado e a excelente precisão analítica dos aparelhos atuais proporcionam um coeficiente de variação de 5%, mostrando que o ensaio é um ótimo monitoramento para os pacientes diabéticos<sup>17</sup>. Apesar destas vantagens, problemas surgidos com a calibração e otimização das condições de reação têm limitado sua aplicação em muitos laboratórios.

\* Pesquisadoras Científicas da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Mais recentemente, têm sido estudados os efeitos da concentração protéica, que influem principalmente na especificidade analítica, ocasionando confusão na interpretação dos resultados. A falta de consenso nas características importantes do ensaio reduz a confiança nas avaliações clínicas efetuadas e revela dificuldades quando comparamos concentrações de frutosamina obtidas em centros diferentes.

O objetivo desta revisão é recomendar certos procedimentos técnicos para evitar erros devido à falta de conhecimento técnico. Não é nossa intenção recomendar o uso de um ensaio de frutosamina sérica em lugar de outro, mas sim analisar as diversas etapas da reação:

1. Condições do ensaio
2. Calibração
3. Influência da concentração protéica

#### MECANISMO DE REAÇÃO

O mecanismo preciso pelo qual a proteína glicada reduz o corante azul de nitrotetrazólio (NBT) em Formazana é muito discutido mas não totalmente elucidado. Jones e cols.<sup>13</sup> observaram que 47% da atividade redutora da frutosamina seria inibida pela adição da enzima superóxido desmutase (uma enzima da fermentação do lixo). Isto permite então propor um mecanismo de reação com o estudo dos radicais livres intermediários. A cetoamina que resulta da glicação das proteínas existe em equilíbrio com seu tautômero eneaminol. Tanto a cetoamina como o eneaminol são capazes de reduzir o oxigênio molecular, formando então um radical superóxido que por sua vez reduz o NBT. A formação do radical superóxido implica numa auto-oxidação simples de elétrons da cetoamina produzindo um radical livre intermediário de proteína glicada.

Sakural e Tsuchiya<sup>20</sup> propuseram recentemente um mecanismo alternativo no qual a forma enediol da cetoamina é oxidada a radical alcoxi pelos íons de metal pesado presentes como traços contaminantes no tampão do ensaio. O radical alcoxi é então capaz de produzir radicais superóxidos.

#### CONDIÇÕES DA REAÇÃO

Das condições do ensaio depende a sensibilidade da reação.

##### a) Temperatura

A reação entre a proteína glicada e NBT se realiza mais facilmente em temperaturas elevadas e a temperatura de eleição foi 40°C, devendo ser constante durante todo o período da reação. A temperatura dos banhos nos instrumentos utilizados na grande maioria dos laboratórios clínicos oscila entre 25, 30 ou 37°C. Alguns autores<sup>1</sup> estudaram as diferenças entre 37 e 40°C e a temperatura de 37°C parece ser a que melhor se adapta ao ensaio.

##### b) Comprimento de onda

Proteínas glicadas reduzem o corante NBT produzindo a formazana que liga-se preferencialmente à albumina. O espectro de absorção da proteína glicada/ complexo corado reduzido parece ser diferente de acordo com a fonte de proteína glicada<sup>19</sup>. Howey e cols.<sup>9</sup> observaram detalhadamente o espectro de absorção do NBT reduzido na presença de soro humano e na ausência de detergente e encontraram o comprimento de onda de máxima absorbância em 540 nm. A adição de detergente Triton X-100<sup>18</sup> ou uma mistura de detergentes iônico e não iônico<sup>24</sup> muda as características do espectro tanto na reação com soro humano glicado/formazana como no DMF/formazana (padrão primário) tornando-os idênticos. Outros agentes calibradores como dihidroxicetona<sup>18</sup> e polilisina glicada<sup>23</sup> também formam produtos corados com espectro de absorção muito similar ao do soro humano-Formazana.

##### c) Reagente tampão e pH

Baker e Johnson<sup>10</sup> descreveram um reagente tampão contendo 75mmol/L de carbonato de sódio mais 25 mmol/L de bicarbonato de sódio produzindo um pH de 10, 35 a 25°C. Aconselha-se calibrar-se os pHmetros com calibradores comerciais (Hydrion pH 10 a 11 da Aldrich Chemical Co. Ltd. Gillingham UK).

##### d) Concentração do NBT

A concentração do NBT no ensaio precisa ser suficientemente alta para garantir uma linearidade acima de no mínimo três vezes o limite máximo dos valores normais.

##### e) Período de pré-incubação

O método original para determinação das frutosaminas séricas<sup>11</sup> envolvia uma fase de pré-incubação dos reagentes e soros por dez minutos, antes da primeira leitura. Trabalhos recentes<sup>16,19,21</sup> sugerem uma diminuição deste período de incubação.

##### f) Amostra/Proporção de reagentes

A diluição da amostra não deve exceder 1:10<sup>3</sup> embora a maioria dos trabalhos optem por diluições entre 1:10 e 1:17,5.

#### CALIBRAÇÃO DO ENSAIO

A) Usando um padrão não sérico: 1-deoxi-1-morfolino-D-frutose (DMF).

O DMF foi utilizado pela primeira vez como padrão no ensaio da frutosamina por Johnson e cols.<sup>12</sup> sendo um composto sintético, quimicamente bem definido como uma cetoamina de fácil preparação, devendo ser dissolvido numa solução de albumina para prevenir mudanças no espectro de absorção do composto colorido final, o azul de tetrazólio. O uso deste tipo de calibrador pode tornar-se um problema se a formulação dos reagentes não incluir detergentes<sup>1,19,25</sup>. Uma

forma encontrada por diversos autores para a minimização desta interferência foi o uso do DMF diluído em um "pool" de soro humano<sup>9,26</sup>.

Os precursores Baker e Johnson<sup>1,12</sup> recomendam padrões de proteínas glicadas como calibradores secundários para o ensaio, que podem diminuir mas não eliminar as alterações no ensaio<sup>8,14</sup>. O uso de detergente na mistura de reação<sup>18,24</sup> parece minimizar os problemas relatados e também reduzir a variação interlaboratorial.

Outros calibradores têm sido indicados e entre eles a dihidroxicetona<sup>18</sup> e espera-se só um maior número de publicações para que ele possa ser aceito. Lever e col.<sup>15</sup> publicaram alguns trabalhos preliminares com o uso de padrões de Elisina e valina. Farr e cols.<sup>4</sup> sugerem o uso de globulina purificadas como material de referência. A concentração ideal dos resíduos de aminoácidos glicados foi calculada pela medida fluorimétrica do formaldeído liberado da globulina glicada após oxidação com periodato<sup>6</sup>.

Schieler e Wieland<sup>22</sup> desenvolveram um método específico para proteínas glicadas usando cromatografia líquida de alta resolução (HPLG) para medir frusina (E-N(2- furilimetil)-L- lisina), um derivado da lisina glicada liberado das frutosaminas após a hidrólise ácida. Este método tem sua aplicação limitada sendo usado mais para pesquisas. Recentemente, os mesmos autores<sup>23</sup> estudaram o emprego de um polilisina glicada pela análise elemental do carbono<sup>14</sup>. Estes resultados confirmam aqueles obtidos com HPLG.

*Efeito da concentração protéica.* O resultado da medida das proteínas séricas glicadas tem sido expresso como % ou mmol da proteína total. A determinação das frutosaminas séricas foi primeiro descrita como uma medida simples da proteína sérica glicada sem referência à proteína total. Johnson e cols.<sup>11,12</sup> e mais tarde Staley<sup>27</sup> afirmam que dentro da faixa da concentração fisiológica da

albumina a relação de glicação protéica independe da concentração da albumina porque a conformação protéica das proteínas séricas é bem diferente da forma carbonil reativa da glicose. Contudo um número grande de estudos tem publicado correlações estatísticas significativas entre as concentrações da albumina e frutosamina séricas dentro das faixas de normalidade<sup>9,29</sup>, durante a gravidez<sup>30</sup> e durante o tratamento de pacientes diabéticos em ceto-acidose<sup>26</sup>.

Outras substâncias podem causar interferências no resultado final da concentração das frutosaminas e entre elas têm sido estudadas: heparina (80 000 UI/L), EDTA (5.5 g/L), bilirrubina (428  $\mu$ mol/L), triglicerídeos (7.45 mmol/L), uratos (0.93 mmol/L), ascorbato (0.57 mmol/L) e cisteína (0.5 mmol/L) que podem produzir uma interferência analítica de 0.1 a 0.3 mmol/L. Tanto a hiperuricemia severa (0.93 mmol/L) quanto a hipertrigliceridemia (7.45 mmol/L) são conseqüências metabólicas do descontrole do diabetes e uma incôgnita que o laboratório precisa levar em conta dependendo da população diabética.

Siedel e cols.<sup>18</sup> empregaram uma variante técnica acrescentando uricase (4U/L) que pode reduzir a interferência dos uratos e uma mistura de detergentes iônico e não-iônico (22g/L) que pode reduzir a interferência dos triglicerídeos.

## CONCLUSÃO

A especificidade do ensaio de frutosamina depende de vários fatores que vão desde a concentração do NBT até o tempo e temperatura de incubação do ensaio. Todas as recomendações desta revisão foram coletadas de trabalhos publicados nos últimos dez anos e procuram alertar os pesquisadores para os problemas técnicos que possam enfrentar nos laboratórios.

RIALA 6/736

Martins, H.P. *et al.* — *Fructosamine: a review for the last ten years.* *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2):101-104, 1992.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, J.R., METCALF, P.A., JOHNSON, R.N., NEWMAN, D. & RIETZ, P. — Use of protein based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin. Chem.* 31: 1550-1554, 1985.
2. BLAIR, S.C., SCHIER, G.M. & GAN, I.E.T. — More on serum fructosamine assay. *Clin. Chem.* 33: 446-7, 1987.
3. GHOROMY, V., BREINEK, P., SKELPLOVA, A. VALENDINOVA, M. — Fructosamine: matrix problems with standards based on protein matrices. *Clin. Chem.* 35: 191-2, 1989.
4. FARR, G., PEAGOGK, M.K. & RYALL, R.G. — Evaluation of purified glovin as a primary standard for plasma fructosamine assay. *Clin. Biochem Revs.* 8: 133, 1987.
5. FLUGKIGER, R & WINTERHALTER, K.H. — In vitro synthesis of haemoglobin A1c. *FEBS Lett* 71: 356-60, 1976.
6. GALLOP, P. M., FLUCKIGER, r., HANNEKEN, A., MININSHON, M.M. & GABBAY, K.H. —

- Chemical quantification of haemoglobin glycosylation: fluorometric detection of formaldehyde released upon periodate oxidation of glycoglobulin. *Anal. Biochem.* 117: 427, 1981.
7. GOULD, B.J. HALL, P.M. & COOK, J.G. — A sensitive method for the measurement of glycosylated plasma proteins using affinity chromatography. *Ann Clin. Biochem.* 21:16-21, 1984.
  8. HILL, R.P. The effect of calibration on the between laboratory variation of serum fructosamine. *Ann. Clin. Biochem.* 25: 435-9, 1987.
  9. HOWEY, J.E., BROWNING, M.C. & FRASER, C.G. — Assay of serum fructosamine that minimizes standardisation and matrix problems: use to assess components of biological variation. *Clin. Chem.* 33: 269-72, 1987.
  10. JOHNSON, R.N. & BAKER, J.A.R. — Fructosamine assay (Letter). *Ann. Clin. Biochem.* 22: 655-6, 1985.
  11. JOHNSON, R.N., METCALF, P.A. & BAKER, J.R. — Relationship between albumin and fructosamine concentration in diabetic and non-diabetic sera. *Clin. Chem. Acta.* 164: 151-62, 1987.
  12. JOHNSON, R.N., METCALF, P.A. & BAKER, J.R. — Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosyl protein. An Index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta.* 127: 87-95, 1983.
  13. JONES, A.F., WINKLER, J.W., THORMALLEY, P.J. LUNEC, J., JONNINGS, P.E. & BARNETT, A.H. — Inhibitory effect of superoxide dismutase on fructosamine activity. *Clin. Chem.* 33: 147-9, 1987.
  14. KOSKINEN, P., IRJALA, K., VIHKARI, J., PANULA-ONTTO, R. & MATIKAINEN, M.T. — Serum fructosamine in the assesment of glycaemic control in diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47: 285-92, 1987.
  15. LEVER, M., FOWLER, R.T., FREEAR, G. J. & DODDS-SCARF, P.M. — More on serum fructosamine assay. *Clin. Chem.* 33: 447-8, 1987.
  16. LIM, C.V., CHISNALL, W.N. & CROOKE, M.J. — Effect of shortened pre-incubation on results of fructosamine in normal diabetic and quality control sera. *Clin. Chem.* 34: 179, 1988.
  17. LLOYD, D. & MARPLES, J. — Simple colorimetry of glycosylated serum protein in a centrifugal analyser. *Clin. Chem.* 30: 1686-1688, 1984.
  18. PHILLIPOU, G. SEABORN, G.J. & PHILLIPS, P.J. — Re-evaluation of the fructosamine reaction. *Clin. Chem.* 34: 1561-4, 1988.
  19. PUUKKA, R. — Modification of the fructosamine test. *Ann. Clin. Biochem.* 24: 211, 1987.
  20. SAKURAI, T. & TSUCHIYA, S. — Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett* 236: 406-10, 1988.
  21. SAN GLI, F., SCHIER, G.M., MOSES, R.G. & GAN, I.E.T. — Improved estimation of fructosamine as a measure of glycosylated serum protein, with the Technicon RA-1000 analyser. *Clin. Chem.* 31: 2005-6, 1985.
  22. SCHELEICHER, R. & WIELAND, O.H. — Specific quantification by HPLC of protein (Lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19: 81-7, 1981.
  23. SCHLEICHER, E.D. & VOGT, B.W. — Standardization of fructosamine assays. *Clin. Chem.* 36: 136-9, 1990.
  24. SIEDEL, J., VOGT, B., KERSCHER, L. & ZEIGENHORN, J. — Serum fructosamine assay: two different color reagents compared with reference to a HPLC procedure. *Clin Chem.* 34: 1316, 1988.
  25. SENG, L.Y. & STALEY, M.J. — A 10 minute pre-incubation is required for measurement of fructosamine in plasma. *Clin. Chem.* 32: 403-4, 1986.
  26. SIMD, E., FERENCZ, A., FODOR, M. — Use of pooled human serum in the standardisation process of the serum fructosamine determination for the estimation of glycosylated serum proteins. *Clin. Chim. Acta.* 156: 215-20, 1986.
  27. STALEY, M.J. — Fructosamine and protein concentration in serum (Letter). *Clin. Chem.* 33: 2326-7, 1987.
  28. YATOSOFF, R.N., TEVAARWERK, G.J. & McDONALD, J.C. — Quantification of nonenzymatically glycosylated albumin and total serum protein by affinity chromatography. *Clin. Chem.* 30: 446-9, 1984.
  29. VAN DIEIJEN-VISSER, M.P., SEYNAEVE, C., BROMBACHER, P.J. — Influence of variations in albumin or total protein concentration on serum fructosamine concentration. *Clin. Chem.* 32: 1610, 1986.
  30. VAN DIEIJEN-VISSER, M.P., SALEMANS, T., VAN WERSCH J.W.J., SCHELLE KEUS, L.A., BROMBACHER, P.J. — Glycosylated serum proteins and glycosylated haemoglobin in normal pregnancy. *Ann. Clin. Biochem.* 23: 661-6, 1986.

Recebido para publicação em 22 de janeiro 1991.

## ANOMALIA EM GENITÁLIA DE UM EXEMPLAR DE FÊMEA DE *LUTZOMYIA INTERMEDIA* LUTZ & NEIVA, 1912 (DIPTERA, PSYCHODIDAE).

Helena Hilomi TANIGUCHI \*  
Míriam Almeida NOVELLI \*  
José Eduardo TOLEZANO \*

Riala 6/737

Taniguchi, H.H.; Novelli, M.A. & Tolezano, J.E. — Anomalia em genitália de um exemplar de fêmea de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). Nota Científica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2):105-106

DESCRITORES: *Lutzomyia intermedia*. Espermateca. Anomalia.

### INTRODUÇÃO

Os elementos estruturais da genitália, juntamente com os da cabeça, constituem importantes parâmetros para a descrição das espécies de flebotomíneos. A presença de anomalias nestas estruturas pode comprometer a identificação de exemplares coletados na natureza.

Alguns autores relatam o encontro de várias destas aberrações em flebotomos coletados em ambiente natural ou até mesmo em exemplares de colônias mantidas em laboratório. Tais anomalias são encontradas em estruturas da genitália masculina, asas, antenas, variação do número de espermatecas, além de casos de intersexualismo.

No presente relato é descrita uma alteração no número de espermatecas em um exemplar de *Lutzomyia intermedia* coletado no dia 16.10.91 no Parque Estadual do Morro do Diabo, município de Teodoro Sampaio no Estado de São Paulo (Latitude 22° 27' a 22° 40' Sul, Longitude 52° 10' a 52° 22' Greenwich).

### DESCRIÇÃO DA ANOMALIA

Entre os 1.325 flebotomíneos coletados na Barraca de Shannon armada à margem de mata do Parque Estadual do Morro do Diabo em 16.10.91, foram encontradas 870 fêmeas de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, das quais um exemplar apresentava três espermatecas.

O inseto ora mencionado foi diafanizado com lactofenol e disposto entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese.

A preparação ilustrada pela foto e figura, mostra as três espermatecas, enumeradas aleatoriamente de 1, 2 e 3, a partir da esquerda.

É possível visualizar parte dos dutos individuais; não se pode afirmar, contudo, que o duto da espermateca três seja de fato menor que os demais, porém, a ilustração permite mensurar o tamanho do corpo e da cabeça das espermatecas (Tabela) indicando que aquela de número três é a de menor tamanho.

Tabela  
Medidas, em  $\mu\text{m}$ , do tamanho das espermatecas

Espermateca	1	2	3
comprimento da cabeça	9,1250	7,7562	5,1328
largura da cabeça	8,3265	6,4445	4,4484
comprimento do corpo	29,4281	28,9148	25,6640
largura do corpo	13,7445	13,4594	12,5754

\* Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz.

Poucos são os relatos referentes a anomalias em genitálias de fêmeas destes insetos (Sherlock, 1958; Azevedo, 1946 e Moraes, 1988), sendo este inédito nesta espécie.

#### CONCLUSÕES

Os autores julgam importante o registro deste tipo de anomalia, ainda mais considerando-se a ocorrência em *Lu. intermedia*, espécie dotada de elevado potencial vetorial de *Leishmania* no Estado de São Paulo e região Sudeste do Brasil.

Além do inusitado encontro, os autores questionam a necessidade de estudos para avaliação da incidência e conseqüências da ocorrência desta anomalia em natureza. Qual seria a razão evolutiva ou fisiológica da provável função da 3ª espermateca e, eventuais alterações comportamentais, como por exemplo, necessidade de maior número de repastos sanguíneos e, conseqüentemente aumento do potencial de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana? Tratar-se-ia apenas de resultante de anomalia genética mutacional? Neste caso: seria ou não mutante recessivo?

#### AGRADECIMENTOS

Os autores manifestam o seu agradecimento aos colegas Rui Larosa, Carlos Roberto Elias e Antonio Silva Araújo que, com dedicação e profissionalismo, participaram das atividades de coleta de flebotomíneos; também à administração do Parque Estadual do Morro do Diabo que facilitou nossas atividades de trabalho.

Especial agradecimento à Dr<sup>a</sup> Eunice Aparecida Bianchi Galati pelas orientações a nós fornecidas.

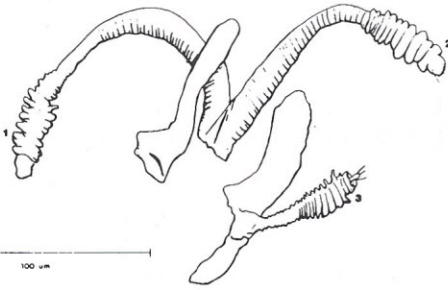


FIGURA 1  
Espermateca anômala de *Lutzomyia intermedia*

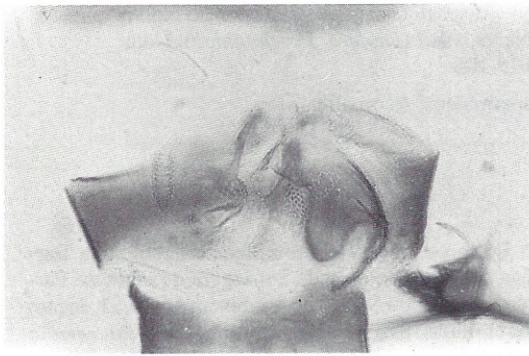


FIGURA 2  
Genitalia de *Lutzomyia intermedia* apresentando 3 espermatecas. Objetiva 40x Ocular 10x Axiophot Carl Zeiss

RIALA 6/737

Taniguchi, H.H.; Novelli, M.A. & Tolezano, J.E. — Genitalia anomaly found in a female specimen of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). — Scientific note. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 105-106, 1992.

DESCRIPTORS: *Lutzomyia intermedia*, spermathecae, anomaly.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRAGA DE AZEVEDO, J. — Uma anomalia rara verificada numa fêmea de *Phlebotomus perniciosus*. *An. Inst. Med. Trop. de Lisboa*, 3: 183-186, 1946.

2. MORAES, R.H.P. & VEIGA, R.M.O. — Sobre uma rara anomalia em genitália de *Lutzomyia migonei* França, 1920 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Butantan*, 50: 41-45, 1988.

3. SHERLOCK, I.A. — Anomalias de *Phlebotomus longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). *Rev. Bras. Biol.*, 18: 433-437, 1958.

4. SHERLOCK, I.A. — Variability of the genitalia of *Phlebotomus bahiensis* (Diptera, Psychodidae). *Rev. Bras. Biol.*, 23: 49-53, 1963.

Recebido para publicação em 02 de março de 1992.



## RABIES VIRUS IN McCOY CELL LINE: PART II - Titration

Yeda L. NOGUEIRA  
Claudia F. C. do AMARAL

RIALA 6/722

NOGUEIRA, Y. L. & AMARAL, C. F. C. - Rabies virus in McCoy cell line: Titration. Part II - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 17-21, 1992\*.

**ABSTRACT:** The McCoy cell line has showed high sensitivity to rabies virus. This cell line presents cytopathic effect (CPE), when infected with rabies virus. Three strains of rabies virus were tested: CVS, ERA, and PV1 and three street virus were isolated: one from a patient bitten by bat, other from a rabid dog and another from bovine. This cell line was used for virus titration purposes due to the presence of cytopathic effect, two techniques for observation of the CPE were used and were compared to the classical method of intracerebral inoculation in mice.

**DESCRIPTORS:** *McCoy cell line. Rabies Virus, (CVS, ERA, PV1 and street virus). Isolation, titration and cytopathic effect (CPE).*

### INTRODUCTION

Several authors studied a series of methods for antibody or virus titration using microtechniques for rabies virus detection. Blancou *et al*<sup>1</sup> compared four techniques to determine the levels of antibody against rabies virus (Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test; Plaque Reduction Test; Immunoenzymatic Test) and compared all of them with Mouse Neutralization Test Habel Test as reference<sup>2</sup>.

Perrin *et alii*<sup>6</sup> used rapid enzyme immunodiagnosis (RREID) as a simple and rapid diagnosis method for detection of rabies virus in the laboratory routine, despite the necessary of a specific conjugate with peroxidase.

Webster<sup>11</sup> used the infection of tissue culture technique (a suspension of murine neuroblastom cells) using a multi-plate of 96 wells and the infection was put in evidence with immunofluorescent technique. This technique proved to be equivalent to the mouse inoculation method.

Rudd *et al*<sup>18</sup> used the murine neuroblastom cell line (C-1300; clone NA) for isolation of small quantities of street virus. Thus it was assumed by Wiktor *et al*<sup>12</sup> the slow adaptation of rabies virus into tissue

culture. In 1978, Smith *et alii*<sup>10</sup> showed the easy adaptation of rabies virus to cell line CER (murine neuroblastom) and compared it to the infection with BHK-21, clone 13, sensitized with DEAE - dextran and both cell lines showed efficiency for isolation of rabies virus *in vitro*.

Other group of authors, Mannen *et alii*<sup>4</sup>, used the microtechnique based on an enzyme immunoassay similar to the fluorescent focus inhibition assay, but they used enzyme assay method (RAMIN), that is an automatized method which permits a rapid test of many samples and the results were similar to the rapid fluorescent inhibition test (REFIT).

However, Heberling *et alii*<sup>3</sup> developed a new assay based on Dot Immunobinding Assay (DIA) for the routine detection of antibody to various viruses including rabies virus.

Following the observation from rabies virus replication and notorious cytopathic effect (CPE) caused by this virus in the McCoy cell line<sup>5</sup>, this cell line was used for titration of rabies virus. This cellular lineage was used by Nogueira<sup>5</sup> for the isolation of rabies virus from material of a suspected patient bitten by bat as well as to show the easy adaptation of vaccines (ERA, PV1 and CVS) of rabies virus.

\* This work was supported by the grant 43.34.00.11 from FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) and by the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo - Brazil.

In this paper, the titration techniques were performed by observation of CPE *in loco* and using Karaya gum (*Sterculia tree*) as overlay for titration of rabies virus in McCoy cell line. Results obtained with both methods are shown and compared to the classical titration using intracerebral mice inoculation.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell Culture

A cellular suspension of McCoy Cell line ( $4 \times 10^{5.0}$  cell/ml) grew in Eagle's medium supplied with 5% of foetal calf serum (FCS). Before inoculation mc virus was suspended in Eagle's medium supplied with 2% of FCS.

### Virus

Rabies virus used was the ERA strain (vaccinal origin) adapted in McCoy cell line by successive passages. The 6<sup>th</sup> passage which titre was  $10^{6.2}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml was inoculated intracerebrally in baby mice and the end-point was calculated by the Reed-Muench method<sup>9</sup>.

### Observing CPE *in loco*

#### TITRATION

Ten-fold dilution of the virus was prepared for titration in Eagle's medium plus 2% of FCS, 0.5 ml of each dilution were inoculated in each well of multi-well plates Limbro Flow, with 24 wells.

The plates were incubated with 5% of CO<sub>2</sub> at 33°C, during 30 minutes for virus adsorption. Then each well was completed with 1.5 ml of maintenance medium (Eagle's plus 2% FCS), and again incubated at 33°C. CPE was observed daily, and highest dilution of virus causing CPE (++) in 50% of wells was considered the titration end-point.

### Observing CPE Using Karaya Gum as Overlay

#### CELL CULTURES

The same cellular suspension of  $4.0 \times 10^{5.0}$  cells/ml was used in each well, on the multi-well plates (24 wells) with Eagle's medium plus 5% of FCS for cellular growth.

#### VIRUS

It was used 0.2 ml of inocula of the same dilution of the 6th passage of ERA strain in McCoy cell line already referred to.

Overlay Karaya gum used was from Sigma Labs. It was prepared to 2% (p/v) in deionized water, at the moment of use equal volume of Earle's solution twice concentrated and also antibiotic/penicilin/streptomycin (500 U.I./mg) were added. The pH was adjusted to 7.4-7.6 with NaHO<sub>3</sub> 7.5%.

#### PROCEDURE

After the incubation period of 48 hours, the cells were fixed during 30 minutes with solution of formalin 20% in alcoholic solution 20%, the plates were washed in distilled water and stained with

alcoholic solution 20% and violet crystal 0.5%, again the plates were washed and dried.

A unique large plaque was evidenced with different kinds of stain, the cells showed CPE and there was a great difference in the morphology of the cells in different stains.

Forty-eight hours were necessary for the occurrence of CPE and the end-point considered was the highest dilution were 50% of the area was affected in 50% of the wells, figures not shown.

### Titration in Baby Mice

Five-to-nine-day-old Swiss-Webster baby-mice were used. The virus titration followed the same dilutions of the 6th passage of ERA strain already referred to. The animals were inoculated intracerebrally with 0.03 ml of each dilution ten-fold performed.

Control animals with the same age were inoculated intracerebrally with 0.03 ml of sterile saline solution, and observed during twenty-one days.

## RESULTS

Preliminary studies showed the CPE caused in McCoy cell line by rabies virus (Nogueira<sup>5</sup>), this cellular lineage is now use for titration purposes of rabies virus.

Figure 1 shows the observation of CPE directly on the bottle of tissue culture. The end point was obtained with 50% (++) of infectivity at dilution  $10^{-8}$  (in 50% of wells) at the 12<sup>th</sup> day. This figure shows the curve of the increase in infectivity during the days of observation.

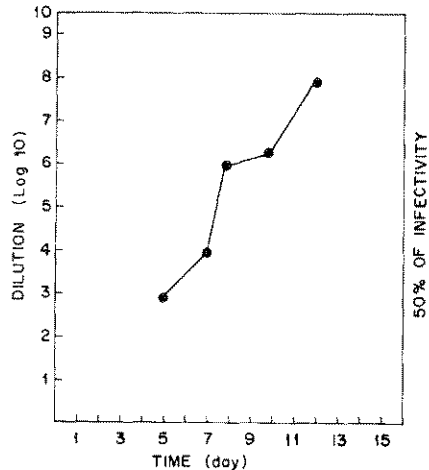


FIGURE 1  
Percentage of Infection Observed With The Presence of Cytopathic Effect During the Observation Days.

For each dilution only one point was plotted (50% of infection).

The percentage of infectivity was obtained from the percentage of CPE observed in the microscope field (+ = 25%, ++ = 50%, +++ = 75%, ++++ = 100%) in four wells for each dilution according to the Reed-Muench method<sup>9</sup>.

When Karaya gum was used as overlay the rapid action of virus in the cell monolayer was observed and 48 hours later the presence of CPE was also observed. Figure 2 shows the difference of cell mor-

phology caused by virus action. In this case the percentage of infectivity was evident, and the criteria used was the same.

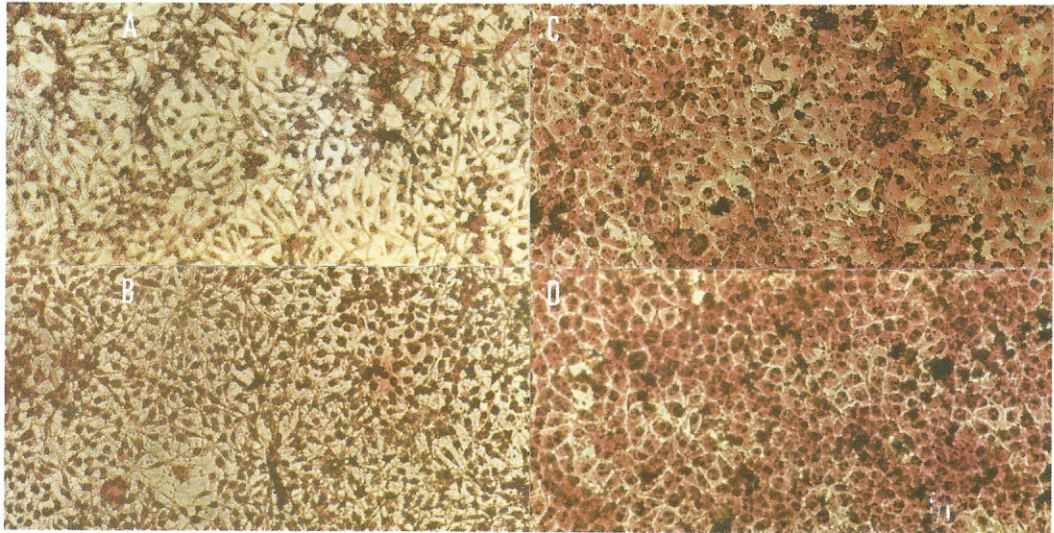


FIGURE 2

Differences of Morphology with Inoculation of Rabies Virus, (ERA strain), on McCoy Cell Line Using Karaya Gum (SIGMA LABS).

After 48 hours: A - Dilution  $10^{-4}$ ; B - Dilution  $10^{-5}$ ; C - Dilution  $10^{-6}$  and D - Control cells. This observation was performed with planar objective 16/0.35 with IM - Zeiss microscope.

Figure 3 shows the observation of CPE at a different magnitude in the microscope observed with planar objective 6.3/0.16 in IM-Zeiss microscope

where morphological alterations caused by rabies virus, as well as stains differences, can be seen.

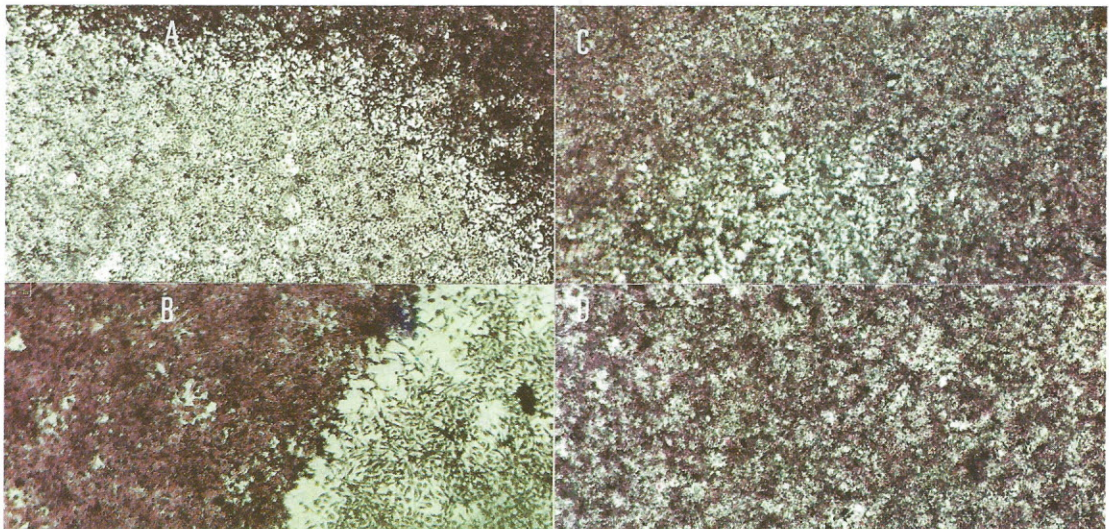


FIGURE 3

Differences of Morphology with Inoculation of Rabies Virus (ERA strain) Where the Action of the Virus on McCoy Cell Line is Observed.

The dilution observed is the same as figure 2, but observed with other magnitude. A - Dilution  $10^{-4}$ ; B - Dilution  $10^{-5}$ ; C - Dilution  $10^{-6}$  and D - Control cells. This observation was performed with planar objective 6.3/0.16 with IM - Zeiss microscope.

CPE Compared to Classic Mice Inoculation.

The titration of the three systems mentioned above, with different volumes of inocula used is

shown in figure 4. Their results were equivalent when the values were adjusted to the same volume, as it can be seen in table I.

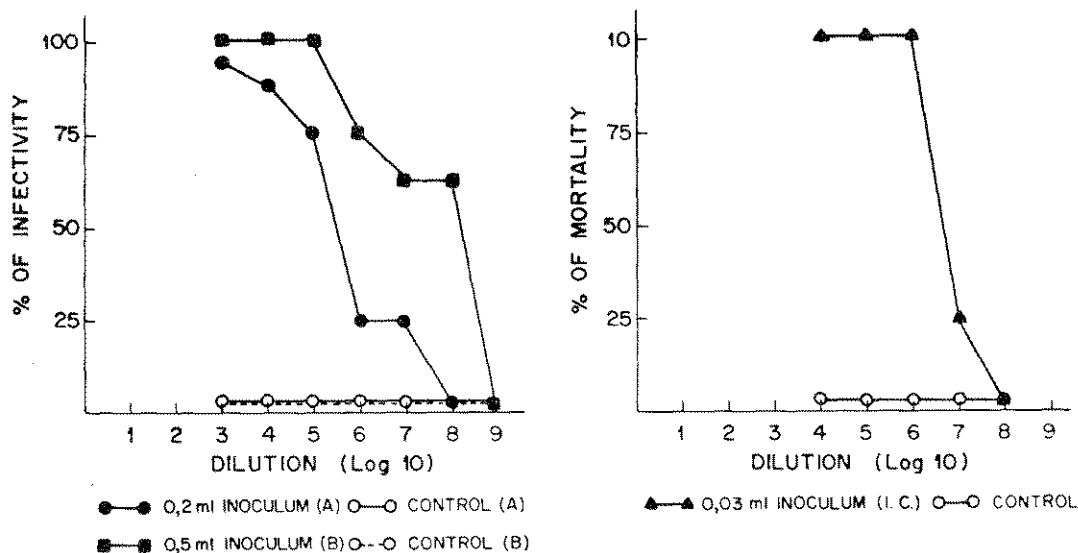


FIGURE 4

Titration of Rabies Virus (ERA strain) Observed with Two Techniques (A AND B) Compared to the Classic Intracerebral Inoculation in Baby Mice (C).

TABLE I  
Titres Observed with the 6<sup>th</sup> Passage of Rabies Virus (ERA strain), on the McCoy Cell Line.

TITRE VOL. INOCULATED	I.D <sub>50</sub> MICE	IDTC 50%	
		IN LOCO	WITH OVERLAY
0.03 ml/mice	10 <sup>6.2</sup>	-	-
0.2 ml/well	-	-	10 <sup>6.0</sup>
0.5 ml/well	-	10 <sup>8.0</sup>	-
1.0 ml*	10 <sup>8.18</sup>	10 <sup>8.3</sup>	10 <sup>8.23</sup>

\* The values of the titres were adjusted to the same inoculum volume, evidencing the similarity of data.

Three different methods of observation were used. The titers were obtained by the end point technique according to Reed-Muench's method.

DISCUSSION

Data obtained in these preliminary studies show the possibilities of the use of McCoy cell line for titration of rabies virus. The use of Karaya gum as overlay speeded the action of the virus, and the results using 0.2 ml of inoculum per 2 ml of total volume was comparable to the results obtained with intracerebral inoculation of baby mice (0.03 ml).

On the other hand, the direct observation of CPE is efficient to obtain an increase of the titre during viral replication. When the logarithm of each dilution is plotted against the days of CPE observation (with more than 50% of infectivity) a sigmoid curve

is obtained and its inflection is equivalent to the result obtained with mice inoculation on the eight day of CPE observation and with a dilution of about 10<sup>6.0</sup> (see Nogueira<sup>5</sup>). It was observed that the obtainment of CPE in McCoy cell line after inoculation with rabies virus can detect small amounts of antigen and is as sensitive and efficient as another techniques such as RIFT (Rapid Inhibition Focus Test) on murine neuroblastoma cells.<sup>10</sup> Besides, it has the advantage that the intermediary reaction of IFA or enzyme linked reaction or UV microscope are unnecessary. The costs decreased due to the absence of laboratory mice as well as another kinds of reagents.

In spite of the relatively small number of samples the isolation of street virus (patient bitten by bat; bovine and rabid dog) was efficient and confirmed by mice inoculation and by IFA technique.

RIALA6/722

NOGUEIRA, Y. L. - Virus da raiva em linhagem celular McCoy: Parte II Titulação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 17-21, 1992.

RESUMO: A linhagem celular McCoy tem demonstrado elevada sensibilidade ao vírus da raiva. Essa linhagem apresenta efeito citopático (ECP) quando infectada com o vírus rábico. Foram testadas três cepas de vírus da raiva: CVS, ERA e PVI e foram isolados três vírus de rua: um proveniente de paciente mordido por morcego, outro de origem canina e outro de origem bovina. Utilizamos essa linhagem celular também para fins de titulação de vírus. Dada a presença do efeito citopático, foram empregadas duas técnicas de observação do ECP e ambas foram comparadas ao método clássico de inoculação em cérebros de camundongos.

DESCRITORES: Linhagem celular McCoy. Vírus da raiva (CVS, ERA, PVI e vírus de rua). Isolamento, titulação, e efeito citopático (ECP).

#### REFERENCES

1. BLANCOU, J.; AUBERT, M.F.A. & CAIN, E. - Comparaison de Quatre Techniques de Titrages des Anticorps Contre le Virus de la Rage Chez le Chien. *J. Biol. Standart.* 11: 271 - 277, 1983.
2. HABEL, K. - Habel test for potency. In: KAPLAN, M. & KOPROWSKI, H., ed. *Laboratory techniques in rabies*, 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, WHO, 1973. P. 290. (Monograph Series)
3. HEBERLING, R. L.; KALTER, S. S.; SMITH, J. S. & HILDEBRAND, D. G. - Serodiagnosis of rabies by dot immunobinding assay. *J. clin. Microbiol.* July 1262 - 1264, 1987.
4. MANNEN, K.; MIFUNE, K.; SNADEN, R.; SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; SUMNER, J. W.; FISHBEIN, D. B.; TONG, T. C. & BAER, G. M. - Microneutralization test for rabies virus vased on an enzyme immunoassay. *J. clin. Microbiol.* Dec. 2440 - 2443, 1987.
5. NOGUEIRA, Y. L. - Cytopathic effect on tissue culture caused by rabies virus. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON IMPACT OF VIRAL DISEASES ON DEVELOPMENT OF LATIN AMERICAN COUNTRIES AND CARIBBEAN REGION, 1st, Rio de Janeiro, Brazil, 1982. *Abstracts*. Rio de Janeiro, Oswaldo Cruz Foundation, 1982, p. 113.
6. NOGUEIRA, Y. L. - Rabies virus in McCoy cell line. Part I: Cytopathic effect and replication. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1992. (In press)
7. PERRIN, P.; ROLLIN, P. E. & SUREAU, P. - A Rapid enzyme immunodiagnosis (RREID): A usefulk and simple technique for the routine diagnosis of rabies. *J. Biol. Standart.* 14: : 217-222, 1986.
8. RUDD, R. J. & TRIMARCHI, C. V. - Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells line in the isolation of a street strain rabies virus. *J. clin. Microbiol.* Aug. 1456 - 1458, 1987.
9. REED-MUENCH - methods for calculation of end point. In KAPLAN, M. & KOPROWSKI, H. - *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd ed., Geneve, WHO, 1973, p. 348 - 3544 (Monograph Series).
10. SMITH, A. L.; TIGNOR, G. H.; EMMONS, R. W. & WOODIE, J. D. - Isolation of field rabies virus strain in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology* 9: 359-361, 1978.
11. WEBSTER, W. A. - A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can. J. Vet. Rev.* 51: 367 - 369, 1987.
12. WIKTOR, T. J. & CLARK, H. F. - Chronic rabies infection of cell cultures. *Infect. Immun.* Dec.: 988 - 995, 1972.

Recebido para publicação em 12 de agosto de 1991.

## ANÁLISE HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE *Momordica charantia* L. (melão-de-são-caetano)\*

Luzia Ilza Ferreira JORGE \*\*  
Alice M. SAKUMA \*\*  
Emiko Ikejiri INOMATA \*\*

RIALA 6/723

Jorge, L. I. F.; SAKUMA, A. & INOMATA, E. I. - Análise histológica e bioquímica de *Momordica charantia* L. (melão-de-são-caetano). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2):23-26, 1992.

**RESUMO:** O presente trabalho visa identificar a espécie *Momordica charantia* L. através dos elementos histológicos característicos de seus frutos e suas folhas, bem como avaliar seus teores vitamínicos e proteicos. O vegetal foi coletado no estado nativo, no município de São João da Boa Vista, interior de São Paulo. Foi empregada a seguinte aparelhagem: microscópio óptico e espectrofotômetro UV/Visível. Folhas e frutos revelaram teores de vitamina C, vitamina E e beta-caroteno em vitamina A que viabilizam seu emprego como alternativa alimentar. As folhas têm um tricoma tector pluricelular com cutícula rugosa e um tricoma glandular constituído de três células pedicelares e quatro células apicais. A cutícula que reveste o epicarpo é estriada. O mesocarpo é rico em idioblastos amilíferos.

**DESCRIPTORIOS:** *Momordica charantia* L., melão-de-são-caetano, melãozinho.

### INTRODUÇÃO

As cucurbitáceas compreendem grande número de espécies, muitas delas edulas, outras medicinais e outras tóxicas<sup>12</sup>.

A espécie *Momordica charantia* L., popularmente chamada de melão-de-são-caetano ou de melãozinho<sup>17</sup>, é originária da Ásia, tendo se alastrado pelo mundo e sendo atualmente planta invasora em todos os países de clima tropical e/ou subtropical. Apresenta propriedades purgativa, emenagoga, hipoglicemiante e anti-helmíntica<sup>1,11</sup>.

A presença de substâncias amargas é uma característica química da família, relacionada com a riqueza em alcalóides, esteróides e saponinas que apresenta<sup>12,16</sup>.

Os frutos são comestíveis, sendo cultivados para esse fim na China e no sul da África<sup>14</sup>. As sementes constituem um dos componentes do "curry", podendo tam-

bém ser consumidas cruas, em saladas<sup>17</sup>. Os brotos novos substituem o espinafre, após fervidos<sup>17</sup>.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Material

Plantas de *Momordica charantia* L. foram coletadas no município de São João da Boa Vista, interior de São Paulo.

O estudo anatômico foi efetuado no terço médio inferior de folhas frescas e no pericarpo dos frutos da espécie.

Folhas e frutos "in natura" e separadamente, foram homogeneizados através de trituração em liquidificador, sendo então empregados na determinação orgânica.

#### Métodos

O estudo anatômico foi procedido através de cortes à mão livre, empregando-se medula de sabugueiro como suporte. As estruturas foram inter-

\* Realizado na Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, São Paulo - SP, 1992.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

pretadas sob os aumentos do microscópio óptico e reproduzidas com auxílio de câmara clara e régua micrométrica

Foram utilizadas as técnicas descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>14</sup> para as dosagens das vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, PP e E. A análise de aminoácidos foi conduzida segundo GIRI & RAO<sup>4</sup>.

Foi utilizado o método de RODRIGUEZ *et al.*<sup>13</sup>, para dosagem de beta-caroteno.

## RESULTADOS

### Descrição macroscópica

*Momordica charantia* L. é planta trepadeira, herbácea, muito ramificada, com folhas membranáceas, sub-orbiculares, 5-7 lobadas, gavinhas simples, deli-cadas, longas, pubescentes<sup>11,12</sup>. Observadas ao estereomicroscópio, as folhas apresentaram nervuras salientes. O pecíolo é cilíndrico, com protuberâncias discretas, observáveis sob os aumentos do estereomicroscópio, mas não à vista desarmada (Fig. 1-G).

### Descrição anatômica

Folhas, pecíolo e frutos apresentam os seguintes anexos epidérmicos: tricomas tectores pluricelulares com 400µm a 800µm de comprimento e tricomas glandulares, relativamente menores, com cabeça constituída de quatro células e pedicelo com três ou quatro células (Fig. 1-C e 1-D). A figura 1-H mostra detalhe da inserção do tricoma tector. É lisa a cutícula do tricoma glandular. A cutícula do tricoma tector é ligeiramente rugosa (Fig. 1-C). Os tricomas

tectores podem apresentar ligeiro estrangulamento em alguma célula mediana.

Há abundância de vasos espiralados, estreitos largos em todas as partes do vegetal (Fig. 1-F). Não são observados vasos pontoados. Drusas mal formadas, relacionadas aos feixes vasculares, podem ser observadas em idioblastos do parênquima da folha e do pecíolo (Fig. 1-F).

As células epidérmicas, em vista frontal, apresentam paredes finas e sinuosas (Fig. 1-A e Fig. 1-B). A epiderme inferior apresenta estômatos pequenos, de paredes delgadas, do tipo anomocítico (Fig. 1-B).

São observados pontos esbranquiçados ao estereomicroscópio na região limbo foliar, aos pares, na face dorsal. Esses pontos correspondem aos cristólitos. Observados ao microscópio, os cristólitos aparecem como dois semicírculos, de conteúdo granuloso, em vista facial (Fig. 1-E).

O mesófilo é do tipo homogêneo lacunoso, com tendência a dorsiventral. Os feixes vasculares são colaterais nas nervuras de menor porte e bicolaterais na região da nervura central. A nervura central é bem proeminente na face dorsal, apresentando três feixes vasculares do tipo bicolateral (Fig. 1-I = desenho esquemático da nervura central em corte transversal).

O pecíolo é aproximadamente cilíndrico, com feixes vasculares bicolaterais. Seu revestimento é constituído de tecidos de desenvolvimento primário: epiderme e colênquima (Fig. 1-J = desenho esquemático do pecíolo em corte transversal).

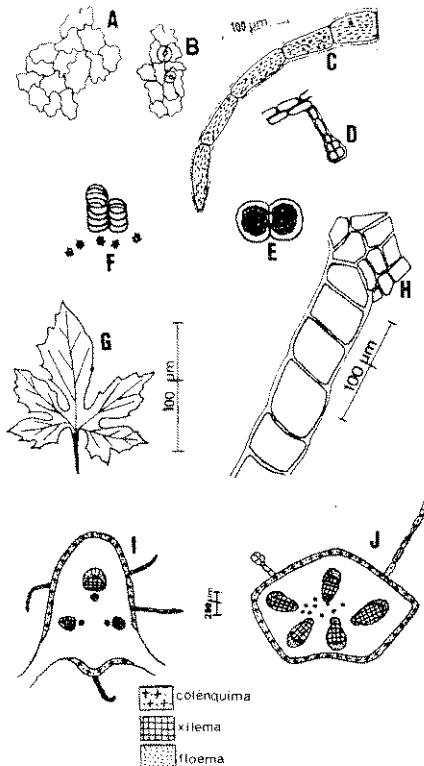


FIGURA 1  
*Momordica charantia* L.: Folhas e pecíolo

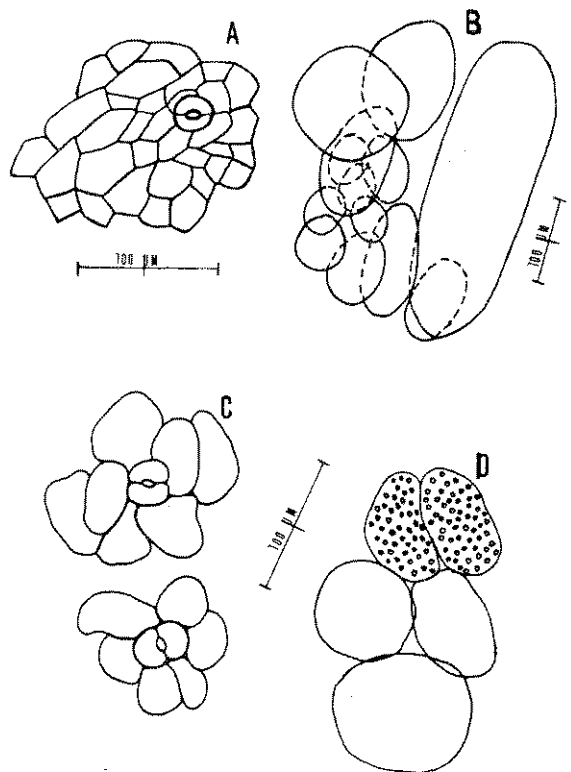


FIGURA 2  
*Momordica charantia* L.:  
Fruto e envoltórios da semente

Os frutos são ovóides, alaranjados, com projeções do epicarpo. Eles atingem 10 cm de comprimento e não têm amido quando maduros. Em seu interior encontram-se diversas sementes de formato lenticular, recobertas por uma película vermelha, muito tênue, guarnecida de estômatos anomocíticos e células amilíferas (Fig. 2-C e Fig. 2-D). Os frutos apresentam tricomas tectores e glandulares idêntico aos encontrados nas folhas, bem como vasos espiralados grandes. As células do epicarpo têm contorno poligonal, sendo bem justapostas, de dimensões relativamente pequenas e fortemente pig-

mentadas de alaranjado (Fig. 2-A). Essas células são recobertas por cutícula fortemente estriada, cuja expressão macroscópica são as projeções papilosas do epicarpo do fruto. Os estômatos do epicarpo são anomocíticos, como os estômatos foliares. As células do mesocarpo são grandes, de paredes delgadas e esparsamente arranjadas (Fig. 2-B).

#### Determinações químicas

Os níveis dos teores de vitaminas e aminoácidos considerados em grupos, médias de triplicatas, encontram-se listados nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1  
Aminograma: porcentagens do total de aminoácidos, considerados em grupos, após hidrólise ácida<sup>13</sup>, em *Momordica charantia* L. "in natura"

Rf	Aminoácidos	Frutos (%)	Partes vegetativas (%)
0,1 - 0,2	Cistina	1,8	0,9
0,2 - 0,3	Lisina, taurina, histidina, arginina, asparina	16,5	14,7
0,3 - 0,4	Glicina, ácido aspártico, serina	22,4	21,2
0,4 - 0,5	Ácido glutâmico, treonina	25,0	28,7
0,5 - 0,6	Alanina, prolina	8,5	5,2
0,6 - 0,7	Tirosina, triptofano	9,2	12,8
0,7 - 0,8	Fenilalanina, metionina	14,1	15,6
0,8 - 0,9	Leucina, isoleucina	2,5	0,9

TABELA 2  
Teores de vitaminas encontrados em *Momordica charantia* L.

Vitaminas	Frutos (mg/100g)	Partes vegetativas (mg/100g)
Vitamina B <sub>1</sub>	0,18	0,13
Vitamina B <sub>2</sub>	0,20	0,48
Vitamina C	13,0	20,0
Vitamina PP	3,72	4,5
Vitamina E	18,7	28,3
Beta-caroteno	0,56	2,67

#### DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

*Momordica charantia* L. apresenta o padrão anatômico do gênero *Momordica* descrito por METAALFE & CHALK<sup>9, 10</sup>: tipos de tricomas, estômatos ranunculáceos, cristólitos, drusas, tipo de mesofilo e ausência de estrutura secundária, esta última também prevista por ESAÚ<sup>2</sup>.

"Os frutos de *Momordica charantia* L., quando maduros, são ricos em vitamina C", afirmam MATSUMURA & TANAKA<sup>8</sup>. Embora preliminares, nossos resultados parecem indicar que as folhas da espécie são ainda mais ricas nessa vitamina do que os seus frutos.

HALL *et al.*<sup>5</sup>, encontraram 33% de proteína em base seca nas folhas de *Momordica charantia* L.,

percentagem comparável à que se observa em folhas *Ricinus communis*, *Vigna sinensis* e *Manihot esculenta*. O aminograma apresentado nesse trabalho mostra que as partes vegetativas da espécie são tão protéicas quanto seus frutos. São também de valor biológico os teores de vitamina E e de beta-caroteno encontrados nas folhas e nos frutos.

RODRIGUEZ e col.<sup>13</sup> identificaram os carotenóides em diversas fases de maturação do fruto de *Momordica charantia* L. Nós trabalhamos com frutos completamente maduros, e, nesse estágio nossos resultados são concordantes com os deles. RODRIGUEZ *et al.*<sup>13</sup>, apresentam teor de 5,3µg de beta-caroteno no fruto completamente maduro, e o valor por nós encontrado foi de 0,56 mg/100g, ou seja, 5,6 µg.



A concentração de beta-caroteno presente nas partes vegetativas da planta é bem superior à concentração observada nos frutos. O teor de 2,87 mg/100g de beta-caroteno que encontramos, corresponde a 4272,0 UI/100g de vitamina A, sendo superior ao da cenoura (3666,0 UI/100g) que é considerada uma das maiores fontes conhecidas de beta-caroteno<sup>3</sup>. Contudo, afirmações conclusivas neste sentido somente poderão ser feitas após doseamentos repetidos, empregando-se amostras de diversas procedências e dando-lhes um tratamento estatístico.

As principais características anatômicas desse vegetal são: tricoma tector pluricelular de dimensões

relativamente grandes e com cutícula rugosa, tricoma glandular pequeno e com três células pedunculares e quatro células apicais, estômatos ranunculáceos nas folhas (epiderme inferior), e nos frutos, vasos espiralados, drusas pequenas e malformadas, cristólitos.

#### Agradecimento

À Dra. Lúcia Rossi, Pesquisador-científico do Instituto de Botânica, Capital, SP, pela identificação da espécie *Momordica charantia* L.

RIALA 6/713

JORGE, L. I. F. *et al.* - Histological and biochemical analysis of *Momordica charantia* L. (melão-de-são-caetano). Rev. Inst. Adolfo Lutz. 52 (1/2): 23,26.

**ABSTRACT:** The work wishes to identify the species *Momordica charantia* L. through more characteristics histological elements of its fruits and leaves, as well as evaluate their vitamin and protein levels. The vegetable was collected in native form, at São João da Boa Vista, in São Paulo, Brazil. It was employed the following equipments: optical microscope and stereomicroscope and spectrophotometer UV/Visible. Leaves and fruits showed levels of vitamin C, vitamin E and beta-caroten in vitamin A that allow their application as alternative alimentary. The leaves have a tector pluricellular hair with wrinkle cuticle and a glandular hair with three basis cells and four head ones. The cuticle of the epicarp is striated. The mesocarp is rich in starch cells.

**DESCRIPTORS:** *Memordica charantia* L., melão-de-são-caetano, melãozinho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONCEIÇÃO, M. - *As plantas medicinais do ano 2000*. 2.<sup>a</sup> ed. São Paulo, TAO Ltda, 1982. pp. 97,98.
2. ESAÚ, K. - *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda. 1974, pp.196.
3. FRANCO, G. - *Tabela de composição química dos alimentos*. 8.<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Atheneu, 1987, pp. 69 - 170.
4. GIRI, K. V. & RAO, N. A. N. - Circular paper chromatography. *J. Indian Inst. Sci.*, 34: 95 - 105, 1952.
5. HALL, N. T.; NAGY, S. & BERRY, R. E. - Leaves for food: protein and aminoacid contents of leaves from 23 tropical and sub-tropical plants. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 88: 486 - 90, 1976.
6. LAL, J.; CHANDRA, S.; RAPIPRAKASH, V. & SABIN, M. - In vitro anthelmintic action of some indigenous medicinal plants on *Ascaridia galli* worms. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 20: 64 - 8, 1978.
7. LOTLIKAR, M. M. & RAO, M. R. R. - Pharmacology of a hypoglycemic principle isolated from the fruits of *Momordica charantia*. *Indian J. Pharm.*, 28: 129 - 33, 1966.
8. MATSUMURA, H. & TANAKA, K. - Response of vitamin C contents during maturing processes of vegetables. *Ann. Rept. Natl. Inst. Nutrition* 54: 27 - 8, 1954.
9. METCALFE, C. R. & CHALK, L. - *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, 1950, v.1 p. 684 - 91.
10. METCALFE, C. R. & CHALK, L. - *Anatomy of the Dicotyledons*. 2.<sup>a</sup> ed. Oxford, Clarendon Press, 1983. v.2. p.54, 94 - 7, 1979.
11. MORTON, J. F. - The balsam pear (*Momordica charantia* L.): An edible, medicinal and toxic plant. *Econ. Bot.*, 21: 57 - 68, 1967.
12. PIO CORREA, M. - *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1978. v.5. p. 186 - 7.
13. RODRIGUEZ, D. B.; LEE, T. & CHICHESTER, C. O. - Comparative study of the carotenoid composition of the seeds of ripening *Momordica charantia* and tomatoes. *Plant Physiol.*, 56: 616 - 624, 1976.
14. SÃO PAULO - INSTITUTO ADOLFO LUTZ - *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3.<sup>a</sup> ed. São Paulo, 1985. p. 378 - 404.
15. SHAFIQ, A. K.; QURESHI, M. & BHATTY, M. K. - The composition of *Momordica charantia* seed oil. *Pak. J. Sci. Res.*, 13: 111 - 12, 1961.
16. SUCROW, W. - Inhaltsstoffe von *Momordica charantia* L., II. zwei neue  $\Delta$  - sterine aus *Momordica charantia*, II. Two new  $\Delta$  - sterols from *Momordica charantia*. *Chem. Ber.*, 99: 3559 - 67, 1966.
17. ZURLO, C. & MITZI, B. - *Ervas daninhas do Brasil*. Rio de Janeiro, Editora Globo, 1989, pp. 94 - 96.

Recebido para publicação em 1<sup>o</sup> de julho de 1992.

## PRESUMPTIVE RAPID DIAGNOSIS OF PARVOVIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH *ERYTHEMA INFECTIOSUM*-LIKE ILLNESS

Sueko TAKIMOTO  
Hatune TANAKA  
Eliseu A. WALDMAN  
Marli UEDA  
Maria A. ISHIDA  
Adelia H. NAGAMORI  
Terezinha M. de PAIVA  
Tuneo ISHIMARU  
Ana M. LACERDA  
Maria C. O. de SOUZA

RIALA 6/724

TAKIMOTO, S.; TANAKA, H.; WALDMAN, E. A.; UEDA, M.; ISHIDA, M. A.; NAGAMORI, A. H.; PAIVA, T. M.; ISHIMARU, T. LACERDA, A. M. & SOUZA, M. C. O. - Presumptive rapid diagnosis of parvovirus infection in patients with erythema infectiosum-like illness. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 27-30, \*1992.

**ABSTRACT:** In September 1987 an outbreak of exanthematous illness resembling erythema infectiosum occurred at an elementary school of São Paulo city. Attempts to isolate virus from the nasofaryngeal secretion and urine and serum samples collected from the ill children in acute phase of illness resulted negative. Nevertheless, parvovirus-like particles of about 24 nm in diameter were observed by negative staining electron microscopy in concentrated urine of seven out of eight ill patients and in nasopharyngeal secretion of one out of four patients. No similar viral particle was observed in concentrated urine samples collected on the same occasion from their classmates without evident signs of illness. This is a proposal of an alternative test for a rapid and sensitive presumptive diagnosis of human parvovirus infection.

**DESCRIPTORS:** *Erythema infectiosum*. Parvovirus infection. Presumptive diagnosis.

### INTRODUCTION

It is generally accepted that human parvovirus B 19, discovered by Cosart *et al.* in 1975<sup>10</sup>, is the cause of erythema infectiosum<sup>4, 16, 19</sup>. It also became apparent that the infection by this virus may be associated with arthralgia, aplastic crisis, spontaneous abortion and intra-uterine fetal death<sup>3, 5, 6, 7, 20, 22</sup>. Asymptomatic infection has been reported in household members<sup>10, 19</sup>. Antibody to human parvovirus is most often acquired within the age of 5 and 10 years and about 60% of blood donor population are seropositive<sup>2, 7</sup>.

Parvovirus B 19 seems to be widespread throughout the world. Seroprevalence studies indicated that 25-40% of adults in Europe and in the United States, as well as in Australia, Africa and Brazil had antibodies to this virus<sup>9, 11, 15</sup>. Fifth disease outbreak have been reported from England, Japan, Finland and Canada and most of the cases occurred in late winter and early spring<sup>4, 12, 15, 19</sup>. In Brazil, the evidence of B 19 virus infection in cases of erythema infectiosum was firstly obtained in Belem by the IgM antibody assay<sup>13</sup>.

The inability to grow parvovirus B19 in sufficient quantity to produce antigen for diagnostic

\* Serviço de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil. Correspondence to: Sueko Takimoto PhD, Seção de Vírus Respiratórios e Entéricos, Serviço de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo, SP, Brasil.

assays has precluded the widespread availability of tests for this virus, and sera from humans remain the sole source of this antigen. The specific immunoglobulin M (IgM) antibody assay is the most utilized way to detect B19 infection. The IgM is usually present 7 days after the onset of illness and persists for 2-3 months<sup>1,9,10,16</sup>. The virus replicates in bone marrow explant culture rich in cells of the erythroid series which is not applicable to the routine detection of B19 virus in clinical samples<sup>17,24</sup>. Virus antigen has been detected by counterimmunoelectrophoresis, radioimmunoassay or enzyme immunoassay<sup>10</sup>. Viral DNA has been detected by dot-blot hybridisation and more recently by the use of polymerase chain reaction assay (PCR)<sup>8,14,23</sup>. The presence of parvovirus particles may be detected in sera and respiratory secretion by electron microscopy and viral DNA was also found in the urine of these patients.<sup>3,7</sup>

In September 1987, an outbreak of exanthematous febrile illness clinically and epidemiologically suggestive of erythema infectiosum occurred at an elementary school of Municipal Area of São Paulo City in the Sanitary District of Butantã. About 50 children of both sex attending the school within the age of 7 to 9 years were affected by the illness. The clinical symptoms were maculo-papular exanthem in the face and lacy reticular aspect in the thorax and superior members. The fever was low around 37.5°C or absent in some children. Among the children, four had only slapped cheek and four had erythema in both face and limbs.

With aim to investigate the etiologic agent if ill patients were inoculated into tubes of Hep2, BHK-21, MCR-5, Vero and MDCK cell cultures. The virus isolation attempts in these cell cultures resulted negative.

Based on previous studies that the human parvovirus B19 is the etiologic agent of erythema infectiosum, the clinical specimens were tested for the presence of parvovirus particles. Urine of eight children and nasopharyngeal secretion (NPS) and sera of four children of a total of 12 students with erythema infectiosum, and urine of 15 asymptomatic children were examined for the presence of parvovirus-like particle by negative staining electron microscopy. The urine samples were previously concentrated 100 to 400 times by Minicon B15 (Amicon Co). Viral particle measuring about 24 nm were detected in the urine of seven ill patients. Four urine samples were positive after concentrating 100X, but three specimens needed 400X concentration before the viral particles being detected, and one was negative. Viral particles of similar size and morphology were seen in the NPS of one out of four children studied, but none was found in the sera of these children. Otherwise the attempts to find similar viral particles in sera and urines 15 asymptomatic classmates collected on the same occasion resulted negative.

## DISCUSSION

Other viruses are also associated with exanthems as enteroviruses, Herpesvirus Group, adenoviruses, measles virus, rubella virus, although differing of B19 infection in both clinical and epidemiological aspects. The possibility of the illness in the present investigation being caused by rubella virus, measles virus or Herpesvirus Group was discarded because they have envelope in the outer membranes and are larger than the virus found in the present investigation (rubella measures virus, 58 nm, measles virus, 150-400 nm and Herpesvirus Group 160-200 nm). Enteroviruses and adenoviruses are cultivable in the virus isolation system utilized in this study.

It seems that erythema infectiosum is a relatively late event in parvovirus B19 infection. This may explain the fact that no viral B19-like particle was found in sera of these patients and this is in accordance with previous studies<sup>4,9</sup>.

Examination of urine for the presence of microorganism helps in the diagnosis of certain infectious diseases. The success of detection viruses depends upon the amount of virus being excreted in the urine. It is possible that if the virus is excreted in urine in low number, the commonly used procedures may not be sensitive enough to detect it. However, if the urine sample is concentrated prior to being tested, the probability of virus detection may increase considerably<sup>21</sup>. Minicon B-15 (Amicon Co.) has been used for concentration of urine, cerebrospinal fluid or other physiological fluid<sup>18</sup>. It contains membranes with a cut-off of 15,000 molecular weight, being able to retain the smallest viral particles and even proteins.

Due to the unavailability of the specific immune serum to B19 virus a more specific and sensitive technique as immune electron microscopy could not be employed in the present investigation. On the other hand, factors like clinical symptoms, epidemiologic basis, size of the particles found and age of the ill patients suggest that the exanthematous illness which affected these students was caused by parvovirus B19.

Although being an expensive equipment, nowadays most of Institutions of Health engaged in the virological studies in Brazil has at least one electron microscope as a tool for diagnostic purposes. The results obtained demonstrate that the technique used in the present investigation may be applied for the routine presumptive diagnosis of human parvovirus infection. The advantage of this method of diagnosis for B 19 virus infection is the simplicity and rapidity.

RIALA6/724

TAKIMOTO, S., *et al.* - Diagnóstico presuntivo rápido de infecção por parvovírus em pacientes com eritema infeccioso. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2): 27-30, 1992.

RESUMO: Em setembro de 1987 ocorreu em uma escola primária municipal da cidade de São Paulo, um surto de doença exantemática clinicamente compatível com eritema infeccioso. As tentativas de isolamento de vírus de amostras da nasofaringe, urina e soro de doentes colhidos na fase aguda da doença resultaram negativas. No entanto, partículas virais de cerca de 24 nm de diâmetro semelhantes ao parvovírus foram observadas ao microscópio eletrônico pela coloração negativa em sete das oito amostras e na secreção da nasofaringe de uma das quatro amostras colhidas de doentes. Por outro lado não foi visualizada nenhuma partícula viral semelhante em amostras de urina igualmente concentradas, colhidas na mesma ocasião de 15 colegas de classe que não apresentavam sinais evidentes da doença. A presente investigação apresenta uma alternativa para diagnóstico presuntivo rápido de infecção por parvovírus humano.

DESCRITORES: Eritema infeccioso. Infecção por parvovírus. Diagnóstico presuntivo.

#### REFERENCES

1. ANDERSON, L. J.; TSON, C. PARKER, R. A.; CHORBA, T. L.; WULFF, H.; TATTERSALL, P.; & MORTIMER, P. P.; Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme - linked immunosorbent assay. *J. clin. Microbiol.*, 24 : 522 - 526, 1986.
2. ANDERSON, M. J. & COHEN, B. J. - Human parvovirus B19 infections in the United Kingdom 1984 - 86. *Lancet*, 1 : 78 - 79, 1987.
3. ANDERSON, M. J.; HIGGINS, P. G.; DAVIS, L. R.; WILMAN, J. S.; JONES, S. E.; KIDD, I. M.; PATTISON, J. R. & TYRRELL, D. A. J. - Experimental parvovirus infection in humans. *J. infect. Dis.*, 152 : 257 - 265, 1985.
4. ANDERSON, M. J.; LEWIS, E.; KIDD, J. M.; HALL, S. M. & COHEN, B. J. - An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J. Hyg. (Lond.)*, 93 : 85 - 93, 1984.
5. BROWN, J.; ANAND, A.; RITCHIE, L. D.; CLEWLEY, J. P. & REID, T. M. S. - Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet*, 2 : 1033 - 1034, 1984.
6. CAUL, E. O.; USHER, M. J. & BURTON, P. A. - Intrauterine infection with human parvovirus "B19". A light and electron microscopy study. *J. med. Virol.*, 24 : 55 - 66, 1988.
7. CHORBA, T.; COCCIA, P.; HOAMAN, R. C.; TATTERSALL, P.; ANDERSON, L. J.; SUDMAN, J.; YOUNG, N. S.; KURCZYNSKI, E.; SARINEN, U. M.; MOIR, R.; LAURENCE, D. N.; JASON, J. M. & EVATT, B. - The role of parvovirus B 19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J. infect. Dis.*, 154 : 383 - 393, 1986.
8. CLEWLEY, J. P. - Polymerase chain reaction assay of parvovirus B 19 DNA in clinical specimens. *J. cli. Microbiology*, 27 : 2647 - 2651, 1989.
9. COHEN, B. J.; MORTIMER, P. P. & PEREIRA, M. S. - Diagnostic assays with monoclonal antibodies for the human serum parvovirus-like virus (SPLV). - *J. Hyg. (Lond.)*, 91 : 113 - 130, 1983.
10. COSSART, Y. E.; FIELD, A. M.; CAUT, B. & WIDDOWS, D. - Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*, 1 : 72 - 73, 1975.
11. COUROUCE, A. M.; FORCHAL, F.; MORINET, A.; DROUET, J.; SOULIER, J. P. & PEROL, Y. - Human parvovirus infections in France. *Lancet*, 1 : 160, 1982.
12. LAUER, B. A.; MAC CORMAK, J. N. & WILFERT, C. - Erythema infectiosum. An elementary school outbreak. *Amer. J. Dis. Child.*, 130 : 252 - 254, 1976.
13. MIRANDA, M. F. R.; LINHARES, A. C. & SHIRLEY, J. A. - Fifth disease in children living in Belem, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 31 : 359 - 362, 1989.
14. MORI, J.; FIELD, A. M.; CLEWLEY, J. P. & COHEN, B. J. - Dot blot hybridization assay of B19 virus DNA in clinical specimens. *J. clin. Microbiol.*, 27 : 459 - 464, 1989.
15. NASCIMENTO, J. P.; BUCKLEY, M. M.; BROWN, K. E. & COHEN, B. J. - The prevalence of antibody to human parvovirus B 19 in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop S. Paulo*, 32:41 - 45, 1990.
16. OKABE, N.; KOBHASHI, S.; TATSUZAMA, O. & MORTIMER, P. P. - Detection of antibodies to human parvovirus in erythema infectiosum (fifth disease). *Arch. Dis. Childh.*, 59 : 1016 - 1019, 1984.
17. OZAWA, K.; KURTZMAN, G. & YOUNG, N. - Replication of the B 19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science*, 233 : 883 - 886, 1986.
18. PESCE, A. J.; HSU, A.; KORNHAUSER, C.; SETH, K.; DOI, B. S. & POLLAK, V. E. - Method for measuring the concentration of urinary proteins according to their molecular size category. *Clin. Chem.*, 22 : 667 - 672, 1976.
19. PLUMMER, F. A.; HAMMOYND, G. W.; FORWARD, K.; SEKLA, L.; THOMPSON, L. M.;

- JONES, S. E.; KIDD, I. M. & ANDERSON, M. J. - An erythema infectiosum - like illness caused by human parvovirus infection. *New Engl. J. Med.*, 313 : 74 - 79, 1985.
20. REID, D. M.; REID, T. M. S.; BROWN, T.; RENNIE, J. A. N. & EASTMOND, C. J. - Human parvovirus - associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet*, 1 : 422 - 425, 1985.
21. ROEPKE, D. C.; GOYAL, S. M.; KELLEBER, C. D.; HALVORSON, D. A.; ABRAHAN, A. J.; FREITAS, R. F. & CUSSLER, E. L. - Use of temperature-sensitive gel for concentration of influenza virus from infected allantoic fluid. *J. virol. Meth.*, 15 : 25 - 31, 1987.
22. SAARINEN, U. M.; CHORBA, T. L.; TATTERSALL, P.; YOUNG, N. S.; ANDERSON, L. J.; PALMER, E. & COCCIA, P. F. - Human parvovirus B19 - induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*, 67 : 1411 - 1417, 1986.
23. SALIMANS, M. M. M.; HOLSAPPEL, S.; VAN DER RIJKE, F. M.; JIWAS, N. M.; RAAP, A. K. & WEILAND, H. T. - Rapid detection of human parvovirus B 19 DNA by dot-hybridization and polymerase chain reaction. *J. virol. Meth.*, 23 : 19 - 28, 1989.
24. YOUNG, N.; HARRISON, M.; MORE, J.; MORTIMER, P. & HUMPHRIES, R. K. - Direct demonstration of the human parvovirus in erythroid progenitor cells infected in vitro. *J. clin. Invest.*, 74 : 2024 - 2032, 1984.

*Recebido para publicação em 10 de agosto de 1991.*

## DETERMINAÇÃO DE BIXINA EM SEMENTES DE URUCUM: ESTUDO COLABORATIVO\*

Helena Yuco YABIKU \*\*  
Mickiko Yamazaki TAKAHASHI \*\*

RIALA 6/725

YABIKU, H. Y. & TAKAHASHI, M. Y. - Determinação de bixina em sementes de urucum: estudo colaborativo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 31-36, 1992.

**RESUMO:** Com a finalidade de estabelecer uma metodologia para a determinação de bixina em sementes de urucum, foi formado um Grupo de Estudo para a padronização de um método. Dois tipos de análise foram selecionados: uma utilizando o clorofórmio e sementes moídas que dosa bixina e outra utilizando o solução de hidróxido de potássio e sementes inteiras que dosa a norbixina. O melhor método foi o que utilizou o clorofórmio. Para equiparar o teor de norbixina encontrado pela extração com hidróxido de potássio ao teor de bixina obtido pelo outro tipo de análise utilizado, foi usado o fator de correção de 1,1601.

**DESCRITORES:** Sementes de urucum. Urucum. Bixina. Norbixina, determinação. *Bixa orellana* L.

### INTRODUÇÃO

Os corantes naturais pertencem a um das classes de aditivos para alimentos permitidos pela legislação brasileira<sup>1</sup>.

Atualmente, há grande interesse em substituir os corantes artificiais pelos naturais. Destes corantes, o mais utilizado em alimentos e que se encontra no mercado é o urucum.

O urucueiro é uma planta de clima tropical que atinge de dois a seis metros de altura. É formada de folhas, flores e as cápsulas que envolvem as sementes. Estas sementes possuem conformações arredondadas revestidas por uma polpa de coloração avermelhada que contém o pigmento<sup>2</sup>.

A partir da remoção da camada externa das sementes da árvore de urucum (*Bixa orellana* L.) por vários processos são obtidos os extratos lipossolúveis e hidrossolúveis<sup>4</sup>.

O extrato lipossolúvel contém diversos componentes coloridos, sendo o principal a bixina e o extrato hidrossolúvel contém como principal componente colorido, a norbixina, produto de hidrólise da bixina.

Para os dois extratos já existem metodologias para determinação dos seus corantes<sup>4</sup>, o que não acontece com as sementes.

A necessidade de se conhecer o teor de corantes em sementes foi abordada durante o Seminário de Corantes Naturais realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos, em setembro de 1988<sup>3</sup>, onde um grande número de interessados, entre os quais produtores, comerciantes e pesquisadores se fez presente.

Surgiu, então, a idéia de se formar um Grupo de Estudo para estabelecer uma metodologia única, para determinação de bixina em sementes de urucum. Essa padronização foi estabelecida após um estudo colaborativo conduzido neste trabalho.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Material

As sementes utilizadas durante todo o estudo foram gentilmente fornecidas pela firma Baculerê Agro-Industrial Ltda.

Treze laboratórios participaram do estudo colaborativo e os mesmos encontram-se codificados por letras do alfabeto.

\* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

O Grupo de Estudo de Urucum estabeleceu dois tipos de determinação. Estes foram conduzidos após inúmeros procedimentos, nos quais foram verificadas as melhores condições tais como tomada de amostra, trituração, modo de extração e solventes utilizados.

*Métodos*

1. Determinação de bixina

- Aparelhagem
- Moinho de facas ou equivalente
- Espectrofotômetro

*Reagentes*

Clorofórmio p.a.

*Procedimento:*

Amostrar 100 g de sementes e moer em um moinho de facas ou equivalente.

Pesar com precisão de mg, cerca de 2 g da semente moída e transferir para um erlenmeyer de 300 ml. Adicionar 100 ml de clorofórmio e agitar vigorosamente durante três minutos. Filtrar através de lã de vidro, recebendo o filtrado em balão volumétrico de 250 ml. Retornar o resíduo e a lã e reextrair com 50 ml de clorofórmio. Filtrar através de lã de vidro, recebendo o filtrado no mesmo balão volumétrico. Repetir o procedimento de extração com alíquota de 50 e 30 ml de clorofórmio ou até a completa extração dos pigmentos. Completar o volume com clorofórmio. Repetir uma alíquota de 10 ml e transferir para um balão volumétrico de 100 ml. Completar o volume com clorofórmio. Pipetar uma alíquota de 10 ml e diluir com clorofórmio de 10 ml e diluir com clorofórmio em balão volumétrico de 100 ml. Fazer a leitura a 470 nm, usando clorofórmio como branco.

A concentração de bixina é encontrada usando:  
 $E_{1cm}^{1\%} = 2826$ .

2. Determinação de norbixina

*Aparelhagem*

Espectrofotômetro

*Reagentes*

Hidróxido de potássio a 5% e a 0,5%

*Procedimento*

Pesar com precisão de mg, cerca de 25 g de sementes em um erlenmeyer de 500 ml. Adicionar 150 ml de solução de KOH a 5%, fervente. Aquecer a ebulição mantendo-a por um minuto. Esfriar em água corrente. Filtrar através de lã de vidro para um balão volumétrico de 1000 ml e lavar o resíduo com 100 ml de água destilada. Repetir o processo de lavagem mais sete vezes. Completar o volume com água destilada. Retirar uma alíquota de 2 ml desta solução e transferir para um balão volumétrico de 1000 ml, completando-o com solução de KOH a 0,5%. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 423 nm, em cela de 1 cm de percurso óptico, usando como branco a solução de KOH a 0,5%.

A concentração de norbixina é encontrada usando  
 $E_{1cm}^{1\%} = 3473$ .

A % de norbixina encontrada multiplicada pelo fator 1,037 dá a % de bixina.

*Análise estatística*

Os cálculos estatísticos utilizados para verificar a variação entre os dois métodos estudados foram a média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV).

O fator de correção final de um método para outro foi estabelecido calculando-se a nova média após a eliminação dos valores fora do intervalo ( $\bar{x} \pm S$ ).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de análises realizadas pelos laboratórios participantes, em sementes de urucum pelos dois procedimentos em questão são mostrados na tabela 1.

TABELA 1  
 Resultados de bixina, em sementes de urucum obtidos no estudo colaborativo\*

LABORATÓRIO	Bixina (%)	
	Extração com clorofórmio	Extração com solução de KOH
A	2,40	2,32
B	2,31	-
C	2,24	2,10
D	2,20	2,27
E	-	-
F	2,22	-
G	2,35	-
H	2,44	2,11
I	-	-
J	2,45	1,94
K	2,46	2,19
L	2,48	2,43
M	-	2,17
Média $\pm$ Desvio padrão ( $\bar{X} \pm S$ )	2,36 $\pm$ 0,11	2,19 $\pm$ 0,15
Coefficiente de variação (CV) (%)	4,66	6,85

(\*) Valores que representam média da análise em duplicata

(-) Dado não recebido

Quando se determina o teor do corante de urucum pelo método do clorofórmio, o que estamos dosando é a bixina, enquanto que no caso do método de KOH, é a norbixina que é o produto de hidrólise da bixina.

Portanto, o teor de norbixina encontrado deve ser multiplicado pelo fator 1,037 para expressar o teor de bixina na amostra.

Foi observado que a determinação utilizando solução de KOH apresentou resultados inferiores em relação ao do clorofórmio. Também foi observado que a variação entre os dois procedimentos era constante, sendo, portanto, possível expressar o teor de bixina, independente do procedimento utilizado, pela introdução de um fator de correção.

Esse fator de correção foi estabelecido também através de análises realizadas pelos laboratórios participantes, em cinco ensaios, utilizando-se os dois procedimentos anteriormente citados.

As tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 mostram os valores encontrados pelos dois procedimentos e o fator de correção obtido.

Na tabela 7 observam-se os fatores de correção obtidos nos cinco ensaios, e o fator de correção final foi de 1,1601.

Dessa maneira multiplicando o teor de norbixina encontrado por 1,1601, este pode ser equiparado ao teor de bixina obtido pela extração com clorofórmio.

TABELA 2  
 Resultados de bixina obtidos no primeiro ensaio do estudo colaborativo\*

LABORATÓRIO	Bixina (%)		Fator de correção Norbixina/Bixina
	Extração com clorofórmio	Extração com solução de KOH	
A	1,943	1,657	1,1726
B	1,810 (1)	1,680 (1)	1,0774
C	2,000 (1)	1,690 (1)	1,1834
D	1,843	1,653	1,1149
E	1,913	1,703	1,1233
F	1,840 (2)	1,650 (2)	1,1152
G	1,830	1,435	1,2753
H	1,780 (2)	1,540 (2)	1,1558
I	2,060 (1)	1,730 (1)	1,1734
Média ± Desvio padrão ( $\bar{X} \pm S$ )			1,1484 ± 0,0299
Coeficiente de variação (CV) (%)			2,60

\* Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

TABELA 3  
 Resultados de bixina obtidos no segundo ensaio do estudo colaborativo\*

LABORATÓRIO	Bixina (%)		Fator de correção Norbixina/Bixina
	Extração com clorofórmio	Extração com solução de KOH	
A	2,153	1,827	1,1784
B	1,896	1,503	1,1184
C	-	-	-
D	-	-	-
E	1,946 (1)	1,740 (1)	1,1184
F	2,030 (2)	1,730 (2)	1,1734
G	-	-	-
H	-	-	-
I	-	-	-
J	1,930	1,657	1,1648
Média ± Desvio padrão ( $\bar{X} \pm S$ )			1,1722 ± 0,0688
Coeficiente de variação (CV) (%)			0,59

\*Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido



TABELA 4  
 Resultados de bixina obtidos no terceiro ensaio do estudo colaborativo\*

LABORATÓRIO	Bixina (%)		Fator de correção Norbixina/Bixina
	Extração com clorofórmio	Extração com solução de KOH	
A	2,603	2,240	1,1620
B	2,300	1,793	1,2827
C	-	-	-
D	-	-	-
E	2,604 (1)	2,099 (1)	1,2405
F	2,350 (2)	2,140 (2)	1,0980
G	-	-	-
H	-	-	-
I	-	-	-
J	2,270	1,990	1,1407
Média ± Desvio padrão ( $\bar{X} \pm S$ )			1,1797 ± 0,0504
Coeficiente de variação (CV) (%)			4,26

\* Valores que representam média de três determinações,

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido

TABELA 5  
 Resultados de bixina obtidos no quarto ensaio do estudo colaborativo\*

LABORATÓRIO	Bixina (%)		Fator de correção Norbixina/Bixina
	Extração com clorofórmio	Extração com solução de KOH	
A	1,970	1,845	1,0677
B	1,923	1,577	1,2194
C	-	-	-
D	1,477	1,630	0,9061
E	2,024 (1)	1,701 (1)	1,1899
F	1,870 (2)	1,711 (2)	1,0929
G	-	-	-
H	-	-	-
I	-	-	-
J	1,830	1,577	1,1604
Média ± Desvio padrão ( $\bar{X} \pm S$ )			1,1461 ± 0,0642
Coeficiente de variação (CV) (%)			5,60

\* Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido

TABELA 6  
 Resultados de bixina obtidos no quinto ensaio do estudo colaborativo\*  
 Bixina (%)

LABORATÓRIO	Extração com clorofórmio	Extração com solução de KOH	Fator de correção Norbixina/Bixina
A	2,419	2,213	1,0931
B	2,250 (2)	1,890 (2)	1,1905
C	-	-	-
D	2,080	1,930	1,0777
E	2,415 (1)	2,075 (1)	1,1639
F	2,370 (2)	2,084 (2)	1,1372
G	-	-	-
H	-	-	-
I	-	-	-
J	2,190 (1)	1,886 (1)	1,1612
Média ± Desvio padrão ( $\bar{X} \pm S$ )			1,1541 ± 0,0147
Coeficiente de variação (CV) (%)			1,27

\* Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido

TABELA 7  
 Fatores de correção obtidos nos cinco ensaios

Tomada	Fator de correção
1	1,1484
2	1,1797
3	1,1722
4	1,1461
5	1,1541
Média ± desvio padrão ( $\bar{X} \pm S$ )	
1,1601 ± 0,0150	
Coeficiente de variação (CV) (%)	
1,29	

### CONCLUSÕES

Com base no estudo realizado, concluiu-se que:

1. A melhor metodologia para a determinação de bixina em sementes de urucum utiliza clorofórmio para extração e leitura espectrofotométrica a 470 nm.

2. O fator de correção para equiparar o teor de norbixina encontrado por extração com KOH, ao teor de bixina obtido pela extração com clorofórmio é de 1,1601.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos seguintes colaboradores de empresas e instituições que participaram do Grupo de Estudo de Urucum que se reuniram mensalmente de 20/09/88 a 08/03/90.

Adicon Ind. Com. de Aditivos Ltda.

Sara M. Menendez Ruiz

Baculerê Agroindustrial Ltda.

Victor P. de Oliveira

Biocon do Brasi Indl. Ltda.

Mônica S. de Lacerda

Cisatec Representações Ltda.

Rosa Cisneros

Walter Lorena

Coca Cola Ind. Ltda.

Hiroko N. Machado

Cooperativa Agrícola de Cotia.

Luiz M. Requeijo

Coveg Ind. Com. Imp. Exp. Ltda.

Sérgio R. Reggiani

Ha-La do Brasil

José Eduardo Ghiraldini

Importadora Brastóquio Ltda.

Takatoshi Uesaka

Instituto Adolfo Lutz

Helena Y. Yabiku

Michiko Y. Takahashi

Instituto Agrônômico de Campinas

Fenando R. Duarte

Instituto de Pesquisas Tecnológicas  
Cleide B. Barros

Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Paulo R. N. Carvalho

Kienast & Kratschmer Ltda.  
Karola Zimmer

Kitano S/A Ind. Com. Ltda.  
Dayse M. de Araújo

Secretaria Nacional de Abastecimento  
Ivonete T. Rasêra

Nestlé Ind. Com. Ltda.  
André F. A. Oliveira  
José Nerval G. de Toledo

Rio Preto Produtos Naturais Ltda.  
Marcos L. J. de Melo

Sanrisil Imp. Exp. S/A  
Hélio Cosentino

Sociedade Brasileira de Urucum  
Álvaro A. de Mello

Universidade de Campinas  
Délia R. Amaya  
Helena T. Godoy

Universidade de Ribeirão Preto  
Ana Maria Soares

Universidade de São Paulo  
Ramón Guitián

RIALA6/725

YABIKU, H. Y. & TAKAHASHI, M. Y. - Determination of bixin in annatto seeds: Collaborative Study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 31-36, 1992.

ABSTRACT: In order to establish the methodology for determination of bixin in annatto seeds, a Group of Study was formed. Two kind of analysis were selected: one using chloroform, which gives bixin, and other using KOH, which gives norbixin. The best method were chloroform to extract the pigment. In order to compare the level of the bixin found by extraction with KOH to the level obtained by the other method, it is necessary to use correction factor of 1,1601.

DESCRIPTORS: Annatto seeds. Bixin, norbixin, determination. *Bixa orellana* L.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, leis, decretos, etc. - *Resolução normativa n<sup>o</sup> 04 do Conselho Nacional da Saúde*. Diário Oficial, Brasília, 19 dez. 1988. Seção I, p. 24718.
2. MELLO, A. A. & LIMA, L. C. F. - *Urucu: situação atual e perspectivas*. Região Norte e Nordeste. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. *Resumos*, Campinas, ITAL, 1989, p. 59 - 66.
3. SEMINÁRIO DE CORANTES PARA ALIMENTOS, Campinas, 1988. *Resumos*. [Coord. Eidiomar Angelucci], Campinas, ITAL, 1988.
4. TAKAHASHI, M. Y. - *Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade*. 2.<sup>a</sup>ed. São Paulo, 1987.

Recebido para publicação em 18 de outubro de 1991.

## PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* NO ESTADO DE SÃO PAULO, 1986 A 1990.\*

Eny Aparecida Matheus da SILVA \*\*  
Daisy Nakamura SATO \*\*  
Maria Alice da Silva TELLES \*\*  
Maria da Conceição MARTINS \*\*  
Moisés PALACI \*\*  
Suely Yoko Mizuka UEKI \*\*

RIALA 6/726

SILVA, E. A. M. S. e col. - Perfil de Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990.

**RESUMO:** Com o objetivo de determinar o perfil da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas empregadas no tratamento da tuberculose no Estado de São Paulo, foram estudadas 1.668 cepas obtidas de amostra de escarro, sendo 254 doentes sem tratamento prévio e 1.414 na vigência de tratamento. A taxa de resistência inicial foi de 16,54% e a adquirida de 47,45%. A isoniazida apresentou resistência global de 10,62% e a rifampicina de 6,69% mostrando que as drogas mais importantes empregadas no tratamento da tuberculose estão apresentando altas taxas de resistência. Este fato causa preocupação pois pode implicar na falência do tratamento, acarretando sérias conseqüências para o controle da doença.

**DESCRITORES:** Drogas antituberculose, *Mycobacterium tuberculosis* - resistência às drogas, tuberculose.

### INTRODUÇÃO

A tuberculose continua apresentando altos índices de prevalência a nível nacional<sup>1</sup>.

Com o advento de drogas antituberculose considerou-se que grande parte dos problemas causados por esta doença estariam resolvidos. No entanto, não foi este o resultado observado, devido ao fenômeno biológico da resistência às drogas presentes em todas as micobactérias. O *Mycobacterium tuberculosis* adquire resistência às drogas por mutação<sup>7</sup>.

Fatores relacionados com a administração de uma droga isolada, doses terapêuticas, irregularidade do tratamento, assim como intolerância do paciente a um ou mais medicamentos, podem levar a uma seleção de mutantes resistentes. A ocorrência deste processo implicará em sérios problemas a nível individual, epidemiológico e conseqüentemente no Programa de Controle da Tuberculose<sup>10, 11, 12, 13</sup>.

Fundamentados nestas considerações propusemos o estudo do perfil de resistência inicial e adquirida do *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas 1.668 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas a partir de amostras de escarro, obtidas de pacientes com tuberculose pulmonar. As amostras foram divididas em dois grupos:

1) Duzentas e cinqüenta e quatro amostras de pacientes sem história de tratamento prévio, segundo informação referida na requisição de exame, utilizadas para a determinação da resistência inicial<sup>2, 13</sup>.

2) 1.414 amostras de pacientes em tratamento e com resposta medicamentosa desfavorável, utilizadas para a determinação da resistência adquirida.

Os dois grupos de pacientes eram provenientes de ambulatórios e hospitais da rede pública das regiões

\* Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central e Laboratório I de Sorocaba.

\*\* Pesquisadores Científicos do Instituto Adolfo Lutz.

de Sorocaba, Baixada Santista, Capital e Grande São Paulo, abrangendo em termos de população, 60% do Estado de São Paulo.

Para isolamento das cepas, as amostras de escarro foram descontaminadas pelo método Petroff, semeadas no meio de Lowenstein-Jensen e incubadas a 37°C. As micobactérias isoladas foram identificadas como *Mycobacterium tuberculosis* através de suas propriedades culturais e bioquímicas. As micobactérias de crescimento lento não cromogênicas, niacina e nitrato redutase positivo e a presença de catalase termolábil caracterizaram o *Mycobacterium tuberculosis*<sup>8</sup>.

A sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas foi determinada através do método das proporções<sup>4, 5</sup>. As drogas examinadas e as concentrações críticas utilizadas foram: isoniazida (INH) 0,2 mcg/ml, estreptomicina (SM) 4,0 mcg/ml, etambutol (EMB) 2,0 mcg/ml, rifampicina (RFP) 40,0 mcg/ml e pirazinamida (PZA) 200,0 mcg/ml, sendo

que as soluções estoques de cada droga foram preparadas na concentração de 10.000 mcg/ml e conservadas a -20°C.

## RESULTADOS

As 1.668 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* submetidas aos testes de sensibilidade apresentaram os seguintes resultados:

**RESISTÊNCIA INICIAL:** a taxa de resistência inicial encontrada foi de 16,54% (tabela 1). Entre as drogas analisadas constatou-se que a maior taxa de resistência, por droga isolada, foi para estreptomicina (4,34%) seguida da isoniazida (2,76%), rifampicina (0,79%) e pirazinamida (0,39%). Não se verificou resistência inicial ao etambutol. A taxa de resistência à isoniazida em associação com a rifampicina foi de 2,76%. Para outras associações das drogas utilizadas as cepas revelaram baixas taxas de resistência (tabela 2).

TABELA 1  
Perfil de resistência das cepas de *M. tuberculosis*, Estado de São Paulo, janeiro de 1986 a julho de 1990.

Grupos Perfil de Resistência (1)	1 (*)		2 (**)	
	nº	%	nº	%
Sensíveis	212	83,46	743	52,55
Resistentes	42	16,54	671	47,45
Total	254	100,00	1414	100,00

(\*) Pacientes sem tratamento prévio

(\*\*) Pacientes em tratamento

(1) drogas utilizadas: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina.

TABELA 2  
Resistência inicial e adquirida, Estado de São Paulo, janeiro de 1986 a julho de 1990.

Drogas	Resistência	Inicial		Adquirida	
		nº	%	nº	%
INH		7	2,76	98	6,93
RFP		2	0,79	21	1,49
PZA		1	0,39	22	1,56
EMB		0	0,00	5	0,35
SM		11	4,34	49	3,47
INH + RFP		7	2,76	119	8,42
INH + SM		5	1,97	104	7,36
INH + PZA		1	0,39	31	2,19
INH + EMB		0	0,00	5	0,35
PZA + SM		1	0,39	12	0,85
PZA + EMB		0	0,00	2	0,14
SM + EMB		0	0,00	1	0,07
RFP + SM + PZA		1	0,39	13	0,91
INH + RFP + SM		4	1,58	107	7,57
INH + RFP + EMB		1	0,39	14	0,99
INH + RFP + PZA		1	0,39	32	2,26
INH + RFP + SM + PZA		0	0,00	14	0,99
INH + RFP + SM + EMB		0	0,00	13	0,92
INH + RFP + SM + EMB + PZA		0	0,00	9	0,63
<b>TOTAL DE CEPAS RESISTENTES</b>		<b>42</b>	<b>16,54</b>	<b>671</b>	<b>47,45</b>

Obs: número de cepas estudadas: 254 para resistência inicial e 1414 para resistência adquirida.

INH = isoniazida; RFP = rifampicina; SM = estreptomicina; EMB = etambutol e PZA = pirazinamida

**RESISTÊNCIA ADQUIRIDA:** a taxa de resistência adquirida nas amostras examinadas foi de 47,45% (tabela 1). Verificou-se que a maior taxa de resistência apresentada foi a isoniazida (6,93%) seguida pela estreptomomicina (3,47%), pirazinamida (1,56%) e rifampicina (1,49%). A taxa de resistência ao etambutol foi baixa (0,35%). O índice de resistência à associação isoniazida e rifampicina foi de 8,42%, mantendo-se altas as taxas de resistência às associações de drogas nas quais a rifampicina, isoniazida e estreptomomicina estão presentes.

## DISCUSSÃO

Segundo Toman<sup>13</sup>, a taxa de resistência inicial esperada para países em desenvolvimento é de 15,03%; a encontrada no presente estudo foi de 16,54%, próxima da encontrada na Região Sudeste (15,45%)<sup>2</sup> e em Santa Catarina (18,32%)<sup>3</sup>, acima porém, da taxa nacional (11,81%) e mais baixa que a do Estado do Amazonas (25,30%)<sup>12</sup>.

As resistências globais da isoniazida e rifampicina foram de 10,24% e 6,29% respectivamente, (tabela 3),

TABELA 3  
Resistência global inicial e adquirida às drogas.

Drogas	Resistência Inicial		Resistência Adquirida	
	nº	%	nº	%
Isoniazida	26	10,24	546	38,61
Estreptomomicina	22	8,66	322	22,77
Rifampicina	16	6,29	235	16,61
Pirazinamida	5	1,97	135	9,54
Etambutol	0	0,00	44	3,11
<b>TOTAL DE CEPAS ESTUDADAS</b>	<b>254</b>	<b>100,00</b>	<b>1414</b>	<b>100,00</b>

entendendo-se por resistência global a taxa encontrada para a droga isolada mais as taxas de resistência para a mesma droga nas associações medicamentosas. Sabe-se que os esquemas esterilizantes no tratamento da tuberculose apóiam-se na ação bactericida da isoniazida e rifampicina, associada ao poder de penetração da primeira droga. Taxas tão expressivas de resistência desestruturam o esquema terapêutico utilizado entre nós no combate à doença, trazendo inconvenientes já conhecidos no tratamento da tuberculose, tais como longa duração, efeitos colaterais das drogas alternativas, persistência da

baciloscopia positiva e a presença de bacilos resistentes viáveis que ao transmitirem poderão causar infecção tuberculosa por bacilos resistentes.

A determinação da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* deve ser uma atividade contínua nos laboratórios de Saúde Pública e a análise periódica dos resultados obtidos com esta investigação fornece subsídios que garantem a eficácia do tratamento da tuberculose.

SILVA, E. A. M. *et al.* - Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* from São Paulo State, Brazil, 1986 to 1990. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 37 - 40, 1992.

**ABSTRACT:** In order to determinate the situation of antituberculosis drug resistance in the State of São Paulo, 1668 strains of *Mycobacterium tuberculosis* have been studied; 254 of them were obtained from sputum of patients without previous medical treatment and 1414 of patients during the treatment. The initial resistance rated 16.54% and the acquired resistance rated 47.45%. The *Mycobacterium tuberculosis* showed a isoniazid global resistance of 10.62% and rifampicin global resistance of 6.69% showing that the most important drugs used in the tuberculosis treatment are presenting high resistance rate. This fact is worrisome, since it can cause the treatment failure and consequently, cause difficulties to the disease control.

**DESCRIPTORS:** Antituberculosis drugs, *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance. Tuberculosis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVALIAÇÃO das Atividades de Controle da Tuberculose Realizadas no Brasil em 1987 - Relatório preparado pela Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária e Campanha Nacional

Contra a Tuberculose do Ministério da Saúde. *Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.*, 2: 58 - 102, 1988.

2. BARRETO, A. M. W. & MARTINS, F. M. - Estudo da resistência primária no Brasil no período de

- 1986 a 1988. *Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.*, 2: 21 - 25, 1988.
3. BEZEM, L. S.; VIEIRA, L. M. T.; ABRAHÃO, J. S.; GOMES, C. & ANDRADE, A. J. S. - Resistência primária aos tuberculostáticos no Estado de Santa Catarina. *Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.*, 2: 34 - 44, 1988.
  4. CANETTI, G.; RIST, N. & GROSSET, J. - Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions: méthodologie, critères de résistance, résultats, interpretations. *Rev. Tuberc. (Paris)* 27: 217 - 272, 1963.
  5. CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, S.; MAHLER, H. T.; MENON, N. K.; MITCHISON, D. A.; RIST, N. & SMELEV, N. A. - Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity test in tuberculosis programmes. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 41: 21 - 43, 1969.
  6. EIDUS, L. - A national study to determinate the prevalence of drug resistance in newly discovered previously patients as well as in retreatment. *Canad. J. pub. Hlt.*, 69: 146 - 153, 1978.
  7. DAVID, H. L. - Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Microbiol.*, 20: 810 - 814, 1970.
  8. KANTOR, I. N. - Bacetriologia de la tuberculosis humana y animal. Martinez, Centro Panamericano de Zoonosis, 1988. (Serie de Monografias Científicas y técnicas. 11/Rev.I).
  9. KANTOR, I. N. - Information sobre resultados de la encuesta regional (OPS - OMS) sobre resistencia a drogas antituberculosas. *Bol. Inform. Colabat.*, 5: 8 - 9, 1989.
  10. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Brasil. Rio de Janeiro, 1992.
  11. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Manual de normas para o controle da tuberculose. Brasília, 1988.
  12. SALEM, J. I.; GOH, K. S.; LITAIFF, L. R. L.; CARCLOSO, M. S. L. & BRIGLIA, M. F. S. - An investigation of primary and acquired drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). *J. Pneumol.* 16: 6 - 8, 1990.
  13. TOMAN, K. - Tuberculosis, detection de casos y quimioterapia. Preguntas y respuestas. Washington D. C. Organizacion Panamericana de la Salud. 1980. (Publi. Cient. 392).
  14. VALENZUELA, P. & VALENZUELA, M. T. - Utilidad clinica y epidemiológica de los estudios de sensibilidad a drogas antituberculosas. *Acta. méd. FAB*, 54 - 64, 1985.

Recebido para publicação em 3 de julho de 1992.

## ESTABILIDADE DO TEOR DE IODO NO SAL, APÓS TEMPO DE PRATELEIRA E COCÇÃO\*

Neusa Vitória V. SILVEIRA \*\*  
Maria Auxiliadora de B. RODAS \*\*  
Jacira Hiroco SARUWTARI\*\*  
Arlete de SOUZA \*\*

RIALA 6/727

SILVEIRA, N. V. V. e col. — Estabilidade do teor de iodo no sal, após tempo de prateleira e cocção. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 41-45, 1992.

RESUMO: Foi verificada a estabilidade do teor de iodo no sal refinado e moído, durante o tempo de prateleira, no período de dois anos, armazenado em condições ambientais. Dezenove amostras recém-iodadas foram coletadas em usinas beneficiadoras de sal e analisadas a cada três meses. Constatou-se que o teor de iodo permaneceu inalterado. As amostras também foram analisadas após cocção com água, por uma e duas horas, no início e final do presente trabalho. Na dosagem do teor de iodo no sal foi utilizada a técnica indicada nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. A determinação da estabilidade do iodo no sal é imprescindível para fixar o prazo de validade desse produto, uma vez que o sal iodado é o mais eficiente meio de profilaxia existente na ocorrência do bócio. E, por este trabalho, ficou constatada a estabilidade do teor de iodo no sal no período de dois anos nas condições estabelecidas.

DESCRITORES: *Sal, iodo determinação. Iodato, estabilidade no sal.*

### INTRODUÇÃO

A iodação do sal de cozinha, dada sua importância no combate ao bócio, tem sido uma preocupação de interesse do governo brasileiro, trazendo informações para o aprimoramento do Programa de Combate ao Bócio Endêmico. Ainda hoje, em diversos países, existem endemias alimentares, abrangendo grupos populacionais com sérios problemas de saúde pública<sup>9, 15</sup>.

A deficiência de iodo constitui um fator importante na etiologia do bócio. Esta deficiência é uma das causas do cretinismo endêmico em áreas bocígenas, e as pessoas afetadas podem sofrer conseqüências com danos irreversíveis no sistema nervoso central<sup>5, 12, 14</sup>.

A prevenção do bócio endêmico é feita, principalmente, com o aumento de ingestão de iodo no sal, nas prováveis zonas bocígenas. A recomendação de

ingestão diária é de 70 a 100µg para crianças e 100 a 150µg para adultos<sup>5, 7, 8, 13</sup>.

A maneira mais viável e confiável de se conseguir a ingestão de quantidades controladas de iodo, pela totalidade da população, é através da iodação do sal. É a forma ideal de distribuição de iodo, pois tanto abrange a alimentação humana, como a animal<sup>13</sup>.

No Brasil, nas últimas décadas, o governo tem tomado providências, através da implantação de Programa de Combate ao Bócio Endêmico, distribuindo equipamentos e o iodato de potássio às indústrias salineiras, facilitando assim o cumprimento da legislação existente<sup>1, 4, 6, 11, 14</sup>.

Pela legislação brasileira, o sal, refinado ou moído, é considerado impróprio para consumo humano, se tiver teor inferior a 10 mg ou superior a 30 mg de iodo metálico por quilograma do produto<sup>2, 3</sup>. A Organização Mundial da Saúde - OMS, pre-

\* Realizado na Seção de Laticínios do Instituto Adolfo Lutz, SP. Apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, S. Paulo, 1992.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.



screve como ótimo, para programas de iodação, uma média de 40 +/- 10 mg/kg de iodo no sal<sup>1</sup>.

Ainda que o iodato de potássio seja estável quando puro, a sua permanência no sal de cozinha vai depender das condições em que este se encontra, como o teor de umidade, o sistema de acondicionamento e o tempo de armazenamento<sup>17</sup>. Foi determinado o prazo de dois anos para a realização desta pesquisa, depois de serem consultados os técnicos da Fundação Nacional de Saúde - FNS, que constatarem ser este o prazo máximo de armazenamento do sal nos pontos de venda, uma vez que se trata de um produto de alta rotatividade e de pouco interesse na formação de estoques especulativos, devido ao seu baixo preço de comercialização.

#### MATERIAL E MÉTODO

Foram escolhidas 19 amostras de sal recém-iodadas, sendo dez de sais refinados e nove de sais moídos, em diferentes usinas beneficiadoras e enviadas ao laboratório do Instituto Adolfo Lutz para análise. As amostras foram numeradas de 01 a 19, homogeneizadas, divididas, cada uma, em oito lotes, os quais foram codificados de "A" a "H", acondicionadas em sacos de plásticos, seladas em seladora apropriada e armazenadas em prateleira em condições ambientais.

Depois deste preparo, o teor de iodo foi dosado em triplicata, nas 19 amostras do primeiro lote, codificada como "A". Na mesma ocasião foi também dosado o iodo em amostras deste lote, submetidas à cocção com água por uma e duas horas.

O trabalho foi iniciado em março de 1990. A cada três meses, a dosagem de iodo nos sais armazenados foi repetida, durante dois anos, nas 19 amostras dos lotes codificados de "B" a "H". No mês de março de 1992, repetiu-se a dosagem de iodo no último lote codificado como "H", submetido à cocção por uma e duas horas.

Pela variação de umidade que ocorre nos sais de cozinha, foram determinados os teores de substâncias voláteis das amostras, para subsequente cálculo do teor de iodo na base seca.

A quantidade de iodo no sal foi dosada na forma de iodato, utilizando solução padronizada de tiosulfato de sódio, e a determinação das substâncias voláteis, pela dessecação em estufa a 150°C, conforme metodologia das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup>.

Na análise estatística dos dados obtidos das amostras, foi empregado o teste de "t" de Student, segundo a descrição de Spiegel<sup>16</sup>.

#### RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão representados nas tabelas I, II e III.

TABELA I

Tempo	zero	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	15 meses	18 meses	24 meses
Nº da Amostra	A	B	C	D	E	F	G	H
01	2.08	2.08	2.08	2.18	2.07	2.15	2.18	2.13
02	1.52	1.52	1.47	1.52	1.46	1.39	1.39	1.38
03	1.20	1.20	1.17	1.17	1.12	1.17	1.17	1.14
04	1.31	1.30	1.30	1.30	1.13	1.20	1.29	1.30
05	1.71	1.73	1.73	1.74	1.61	1.56	1.72	1.70
06	2.04	2.09	2.04	2.03	1.87	1.86	1.86	2.02
07	1.73	1.73	1.62	1.62	1.50	1.55	1.61	1.70
08	2.19	2.19	2.19	2.19	2.14	2.15	2.12	2.18
09	1.65	1.71	1.71	1.71	1.70	1.70	1.70	1.70
10	2.24	2.29	2.20	2.13	2.07	2.07	2.18	2.23
11	1.19	1.18	1.19	1.13	1.12	1.12	1.12	1.14
12	1.28	1.23	1.23	1.23	1.17	1.17	1.17	1.22
13	1.76	1.75	1.71	1.71	1.59	1.70	1.75	1.75
14	1.93	1.87	1.93	1.92	1.92	1.92	1.91	1.92
15	2.35	2.35	2.24	2.29	2.23	2.23	2.23	2.31
16	2.78	2.77	2.78	2.67	2.69	2.68	2.92	2.82
17	2.46	2.45	2.45	2.40	2.34	2.34	2.23	2.34
18	1.99	2.00	1.94	1.94	1.87	1.87	1.92	1.97
19	3.30	3.11	3.30	3.30	3.31	3.29	3.18	3.29

Teor de Iodo no Sal, mg por 100 g, Calculados na Base Seca

TABELA II

Teores de Iodo nas amostras "A", mg por 100g, Calculados na base seca.

Nº da Amostra	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Direto	2,08	1,52	1,20	1,31	1,71	2,04	1,73	2,19	1,65	2,24	1,19	1,28	1,76	1,93	2,35	2,78	2,46	1,99	3,30
Fervura 1 hora	2,08	1,52	1,20	1,31	1,70	2,04	1,73	2,19	1,65	2,24	1,19	1,28	1,76	1,87	2,35	2,78	2,45	1,99	3,30
Fervura 2 horas	2,08	1,53	1,20	1,31	1,69	2,04	1,73	2,14	1,65	2,24	1,25	1,28	1,76	1,87	2,35	2,78	2,45	1,99	3,25

TABELA III

Teores de Iodo nas amostras "H", mg por 100g, Calculados na base seca.

Nº da Amostra	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Direto	2,13	1,38	1,14	1,30	1,70	2,02	1,70	2,18	1,70	2,23	1,14	1,22	1,75	1,92	2,31	2,82	2,34	1,97	3,29
Fervura 1 hora	2,13	1,36	1,11	1,30	1,70	1,97	1,70	2,18	1,75	2,28	1,08	1,12	1,80	1,86	2,33	2,85	2,38	1,97	3,24
Fervura 2 horas	2,13	1,38	1,11	1,33	1,68	1,99	1,75	2,24	1,69	2,23	1,15	1,23	1,80	1,92	2,31	2,87	2,33	1,96	3,24

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Não houve redução dos teores de iodo durante o período de dois anos, nas amostras armazenadas em condições ambientais normais. Também não foi constatada perda de iodo nas amostras submetidas a cocção de uma e duas horas.

A variação dos resultados apresentados nas tabelas é inerentes à técnica volumétrica utilizada na dosagem do teor de iodo. Ocorre, também, pela dificuldade de homogeneização do sal na baixa concentração, que é exigida pela legislação vigente (1 a 3 mg por cento).

Ao teste "t" de Student, verificou-se que a variação dos teores de iodo medidos durante o período de dois anos não foi significativa ( $p < 0,5$ ). Tampouco foi observada variação significativa nas

amostras submetidas a cocção de uma e duas horas ( $p < 0,5$ ).

Sugerimos para fixação do prazo de validade do produto sal iodado, seja de dois anos, o que garante que a população esteja ingerindo quantidades controladas de iodo na alimentação via oral, como profilaxia do bócio endêmico.

## AGRADECIMENTOS

Ao colega José Leopoldo Ferreira Antunes, pelo cálculo estatístico aplicado ao trabalho.

À Dra. Yara Pereira Simoni da Silva, Coordenadora do GT/UPBE e ao corpo técnico da Fundação Nacional de Saúde - FNS, antiga SUCAM, pela colheita das amostras analisadas, pelo apoio e informações prestadas.

---

SILVEIRA, N. V. V. *et alii* - Iodine content stability in salt after boiling and shelf life. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 41-45, 1992.

**ABSTRACT:** The main objective of this work was to verify the iodine contents stability in ground and refined salt during a two years shelf life under normal storage conditions. Nineteen samples of recent iodized salt were collected and analysed at intervals of three months.

Samples were also boiled for two hours in the beginning and at the end of the period. The methodology used was the "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz". The confirmation of the stability of iodine contents in the salt became a must not only because it was necessary to fix a validity period for iodized salt but also because the addiction of iodine to the salt is the most efficient way to prevent and combat goiter. This work conclusion shows that iodine contents in ground and refined salt is stable for the period of two years in the conditions established.

**DESCRIPTORS:** Iodine in salt; Stability of the iodine in salt. Determination of iodine salt.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BÓCIO: UM PROBLEMA SÉRIO DE SOLUÇÃO SIMPLES. *Fome em Debate*, Brasília, 1 (3): jan./mar., 1968.
2. BRASIL, Leis, decretos, etc. - Lei nº 6.150 de 3 de dezembro de 1974. *Diário Oficial*, Brasília, 4 dez. 1974. Seq. 1, pt. 1, p. 13733.
3. BRASIL, Leis, decretos, etc. - Portaria nº 3 de 23 de fevereiro de 1984, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial*, Brasília, 24 de fev. 1984. Seq. 1, p. 2854.
4. BRASIL, Leis, decretos, etc. - Portaria nº 27 de 03 de fevereiro de 1982. *Diário Oficial*, Brasília, 05 de fev. 1982. Seq. 1 p. 2247.
5. COSTA, Z. G. A. & TAVARES, V. J. - *Programa de combate ao bócio endêmico: atualização do trabalho iniciado pela Divisão Nacional de Endemias Rurais em 1968*. Brasília, INAN/SUCAM, 1989.
6. CURSO-TALLER SOBRE DESORDENES POR DEFICIÊNCIA DE YODO Y SU CONTROL EN AMÉRICA LATINA, 1º, Quito, 1990. *Situación actual de DDI em Latinoamérica. Resumen del seminario*. Quito, Ministério de la Salud Pública/ Agencia de Cooperation para el Desarrollo (AGCD - Belgica/ OMS/ OPS/ UNICEF), s. d. (Proyecto "Lucha Operacional Contra el Bocio Endemico en el Ecuador").
7. DELLAVALLE, M. E. & BARBANO, D. N. - Iodine content of milk and other foods. *J. Food Protect.* 47 (9) : 678 - 84, 1984.
8. DEMAYER, E. M.; LOWENSTEIN, F. W. & THILLY, C. H. - *La lucha contra el bócio endêmico*. Ginebra, OMS, 1979.
9. GANDRA, Y. R. - Avaliação clínica do bócio endêmico. *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, 18: 396 - 404, 1984.
10. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985. p. 288.
11. MEDEIROS NETO, G. A. - Towards the eradication of iodine-deficiency disorders in Brazil through a salt iodination programme. *Bull. OMS*, 66 (5): 637 - 42, 1988.
12. MEETING OF THE PAHO SCIENTIFIC GROUP ON RESEARCH IN ENDEMIC GOITER, 3ª, Puebla, Mexico, 1968 - *Endemic goiter report*. J. B. STANBURY, Washington, D. C., PAHO, 1969. (PAHO Scientific Publ. nº 193).
13. MEETING OF THE TECHNICAL GROUP ON GOITER, 4ª, Guarujá, São Paulo, 1973. DUNN

- and G.A. Medeiros Neto - *Endemic goiter and cretinism: continuing threats to world health: report*. Washington, D. C.; PAHO, 1974. (PAHO Scientific Publ. n.º292).
14. MEETING OF THE PAHO/WHO TECHNICAL GROUP ON ENDEMIC GOITER, CRETINISM AND IODINE DEFICIENCY, 5º, Lima, 1983. John, T. DUNN *et alii*. *Towards the eradication of endemic goiter, cretinism and iodine deficiency: proceedings*. Washington, D. C., PAHO, 1986. (PAHO Scientific Publ. n.º 502).
15. SILVEIRA, N. V. V. & AMATO, C. - Verificação da interferência de carbonato de cálcio na dosagem de iodo em sal refinado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41 (2): 75- 8, 1981.
16. SPIEGEL, M. R. - *Estatística*. São Paulo, McGraw-Hill, 1981.
17. STAMBURY, J. B.; ERMANS, A. M.; HETZEL, B. S.; PRETELL, E. A. & QUERIDO, A. - Importancia sanitaria y prevención del bocio endémico y del cretinismo. *Cronica OMS*, 28: 246 - 55, 1974.

*Recebido para publicação em 15 de abril de 1992.*

## OCIMUM MICRANTHUM WILLD - MANJERICÃO DO BRASIL: CARACTERIZAÇÕES HISTOLÓGICA E QUÍMICA\*

Luzia Ilza Ferreira JORGE\*\*\*\*  
Nídia Franca ROQUE\*\*\*  
Vicente de Oliveira FERRO

RIALA 6/728

JORGE, L. I. F. e col. - *Ocimum micranthum* Willd - Manjerição do Brasil. Caracterizações histológica e química. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2) : 1992.

**RESUMO:** Folhas de *Ocimum micranthum* Willd são estudadas sob os aspectos químico e anat mico.   assinalada a presença de um pólo glandular e de um pólo tector, ambos pluricelulares. Estômatos diac ticos ocorrem em ambas as epidermes e os feixes vasculares são colaterais. A análise química revelou presença de 1,8 cineol, cânfora, eugenol e sesquiterpenos em seu óleo essencial. Os monoterp nos perfazem mais de 50% dos terpenóides totais presentes em folhas do vegetal coletado em solo brasileiro (ocorre inversão dessas porcentagens relativas quando se analisam folhas da mesma espécie coletadas em solo peruano).

**DESCRITORES:** *Ocimum micranthum* Willd. Manjeriço. Alfavaca.  leo essencial. Descri o histológica.

### INTRODU O

O g nero *Ocimum*   constituído de diversas espécies, a maioria delas nativa no Brasil. São plantas medicinais (antiespasm dicas, antifúngicas e estimulantes), conhecidas popularmente como manjeriço ou alfavaca.<sup>1, 3, 8, 10, 11, 12</sup>

*Ocimum micranthum* Willd, a alfavaca-do-campo,   arbusto de até 2 m de altura, com folhas pequenas e pecioladas, ovadas, agudas e levemente pubescentes<sup>11, 12</sup>. Ocorre do Caribe e do Peru até Estado de Santa Catarina no Brasil<sup>11, 12</sup>. É muito aromática, rica em óleo essencial.   antiq ssimo o emprego culinário da alfavaca ou manjeriço. Trata-se de um hábito originário da  ndia, onde a planta   também nativa, tendo passado pelo Oriente Médio, atingindo egípcios,  rabes, gregos e romanos<sup>1</sup>. Na Col mbia e no Equador, segundo PINKLEY<sup>10</sup>, é preparado um chá de propriedades alucinog nicas devido à presença de N, N dimetiltriptamina nesta espécie, ou em outras que entram na composi o da referida bebida<sup>10</sup>.

### MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de *Ocimum micranthum* Willd foram coletadas em hortas domésticas de residências desta Capital, SP.

O estudo anat mico das folhas foi conduzido mediante cortes   mão livre, empregando-se microscopia óptica, microproje o e corantes histológicos para a interpreta o e representa o dos elementos histológicos característicos.

A análise química do óleo essencial extraído das folhas por arraste com vapor d'água no aparelho de Clevenger modificado<sup>13</sup>, foi feita por espectrometria de massas. Os espectros de massas obtidos através de ioniza o por impacto eletrônico (IE) foram feitos em um sistema composto de cromatógrafo a gás modelo Varian 3400 acoplado a um espectr metro de massas Finnegan modelo ITD/800.

### RESULTADOS

#### I - Exame microscópico

*Ocimum micranthum* Willd   uma planta arbustiva, com folhas pecioladas, pequenas (cerca de

\* Realizado no Instituto Adolfo Lutz e no Instituto de Química (USP).

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Do Instituto de Química (USP).

\*\*\*\* Da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP).

3 cm de comprimento por 1,5 cm de largura na proporção mediana), ovais, opostas, com pecíolo curto e margens ligeiramente denteadas (Fig. 1-A).

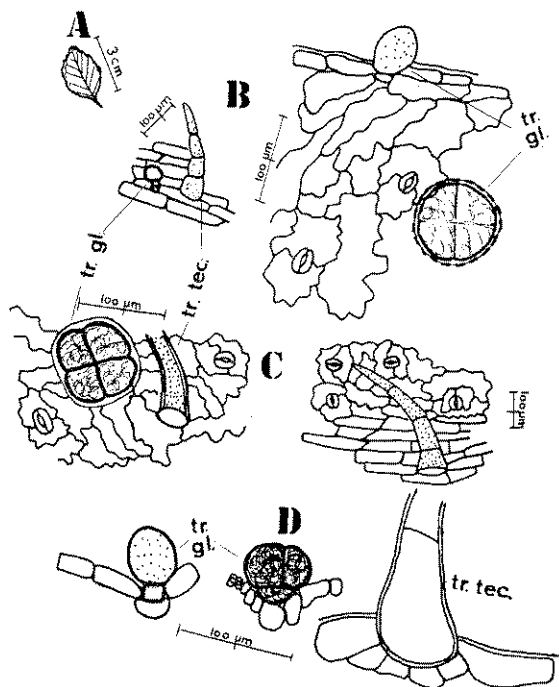


FIGURA 1

*Ocimum micranthum* Willd - Folha

A - Aspecto macroscópico

B - Epiderme superior (tr. gl. = tricoma glandular; tr. gl. = tricoma glandular; tr. tec. = tricoma tector).

C - Epiderme inferior

D - Tricomas (diversos detalhes)

As epidermes foliares são praticamente indistintas. Epiderme superior e epiderme inferior, quando observadas de face, mostram células de paredes finas e onduladas, guarnecidas de estômatos do tipo diacítico (Fig. 1-B e Fig. 1-C). O corte transversal revela pequena diferença de dimensões relativas entre elas: as células da epiderme inferior são ligeiramente maiores e alongadas tangencialmente que as células da epiderme superior (Fig. 2-A), onde predominam células radialmente alongadas.

O mesofilo é dorsiventral, com uma camada de parênquima paliádico e cinco ou seis camadas de parênquima lacunoso. Há um tricoma tector pluricelular simples constituído de três a seis células, cutícula verrucosa, base alargada, ápice afunilado e disposição ligeiramente curva (Fig. 1-C). O tricoma glandular (quando completamente desenvolvido) apresenta uma célula basal (pedúnculo), uma célula intermediária (colo) e uma região se-

cretora (cabeça) constituída de quatro células (Fig. 1-C e Fig. 1-D). Em fases iniciais e/ou intermediárias de desenvolvimento, o tricoma glandular pode apresentar-se como um tricoma de cabeça unicelular (Fig. 1-D). O tricoma glandular aparece inserido em depressões das células epidérmicas (Fig. 1-D e Fig. 2-A).

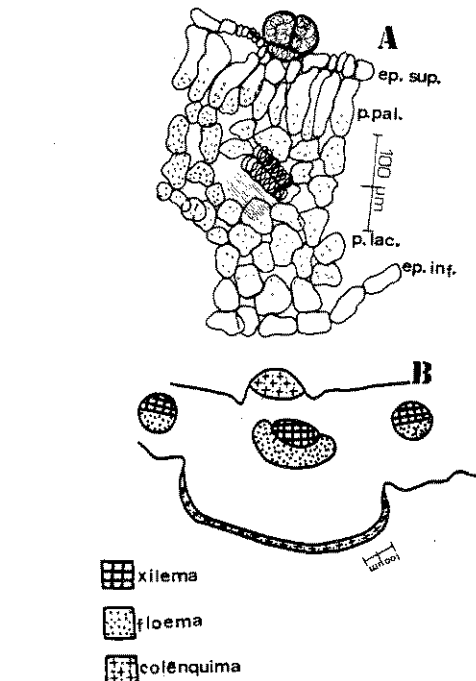


FIGURA 2

*Ocimum micranthum* Willd - Cortes transversais foliares

A - Corte transversal ao nível do limbo foliar em seu terço médio inferior (ep. sup. = epiderme superior; ep. inf. = epiderme inferior; p. pal. = parênquima paliádico; p. lac. = parênquima lacunoso)

B - Corte transversal ao nível da nervura central, no terço médio inferior da folha (desenho esquemático).

cretora (cabeça) constituída de quatro células (Fig. 1-C e Fig. 1-D). Em fases iniciais e/ou intermediárias de desenvolvimento, o tricoma glandular pode apresentar-se como um tricoma de cabeça unicelular (Fig. 1-D). O tricoma glandular aparece inserido em depressões das células epidérmicas (Fig. 1-D e Fig. 2-A).

Os feixes vasculares são do tipo colateral. Ao nível de nervura mediana ocorre colênquima na periferia de ambos os lados da folha (Fig. 2-B).

## 2 - Exame químico

O cromatograma de íons totais evidenciou a presença de três monoterpenos predominantes no óleo essencial de *Ocimum micranthum* Willd, dos quais dois monoterpenos foram identificados por seus espectros de massas como sendo 1,8-cineol e cânfora. O eugenol foi também identificado como uma das substâncias predominantes no óleo essencial. Os sesquiterpenos estão presentes em proporções menores que os monoterpenos, e não foram identificados.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

MARTELLI *et alii*<sup>8</sup> afirmam que *Ocimum micranthum* Willd distingue-se das outras espécies do mesmo gênero pela estrutura do seu rizoma. Contudo, observando os trabalhos de FIGUEIREDO<sup>4</sup> e de MORPHY *et alii*<sup>8</sup>, chegamos à conclusão de que a simples observação do tamanho e da disposição das folhas é suficiente para destacar-se a espécie *Ocimum micranthum* Willd da espécie *Ocimum nudicaule* Benth. A nossa preocupação neste trabalho é fornecer subsídios à identificação de *Ocimum micranthum* Willd quando não dispusermos de folhas integras para tanto, situação muito comum de acontecer com plantas de emprego medicinal e/ou alimentar. Nosso trabalho mostrou que as características anatômicas foliares de ambas as espécies são muito semelhantes, e portanto de pouca utilidade diagnóstica<sup>4</sup>. Sabemos também que plantas conhecidas como óregano e como manjerona apresentam idênticos elementos histológicos<sup>4</sup>, somando as dificuldades para os anatomistas. Diferenças anatômicas entre as *Labiatae* empregadas como condimentos, se houver, serão quantitativas, e nunca ou quase nunca qualitativas.

A estrutura morfológica das glândulas segue o padrão geral descrito para a família: há um pedúnculo (célula basal), uma célula intermediária (colo) de forma aproximadamente piramidal entre a região basal e as células da região secretora, em número de quatro. Com o desenvolvimento, as células da "cabeça" (região secretora) se deformam, constituindo uma bolsa cuticular carregada de óleo essencial nesta região. Nas folhas adultas a estrutura celular do tricoma glandular é desorganizada, restando apenas a bolsa cuticular cheia de secreção e alguns resquícios da estrutura inicial<sup>4</sup>.

O óleo essencial de *Ocimum micranthum* Willd coletado possivelmente na Índia<sup>7</sup> e no Peru<sup>2</sup>, assim como o óleo essencial da mesma espécie coletada em São Paulo, possui eugenol entre os seus constituintes mais abundantes. O 1,3-cineol está presente no óleo essencial tanto da planta brasileira como da planta peruana. A cânfora, no entanto, aparece como componente predominante apenas na primeira. Sesquiterpenos são relativamente mais abundantes no óleo essencial do *Ocimum micranthum* Willd peruano do que no óleo da mesma espécie coletada em solo brasileiro.

Os óleos essenciais de espécimes de *Ocimum nudicaule* Benth, coletados em Mato Grosso do Sul e em São Paulo não apresentaram, como constituintes mais abundantes, nenhuma das substâncias identificadas nos óleos das amostras de *Ocimum micranthum* Willd estudadas e/ou discutidas neste trabalho. O principal constituinte do óleo essencial de *Ocimum nudicaule* Benth, coletado no Mato Grosso do Sul é o metil-chavicol (98%)<sup>5</sup>.

Do exposto concluímos que as características químicas são mais distintivas que as características anatômicas para as espécies de *Ocimum*, e portanto, de maior importância diagnóstica. As composições químicas destes óleos essenciais apresentam diferenças qualitativas e quantitativas mesmo quando se comparam exemplares da mesma espécie coletados em solos diversos. Por exemplo, a planta brasileira de *Ocimum micranthum* Willd contém cânfora em seu óleo essencial, já os espécimes peruano e indiano do mesmo vegetal não.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra Inês Cordeiro do Instituto de Botânica, SP - Capital, pela identificação da espécie *Ocimum micranthum* Willd.

RIALA 6/728

JORGE, L. I. F. *et alii*. - *Ocimum micranthum* Willd - Manjeriço of Brazil. HISTOLOGY-CAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATIONS. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 47-50, 1992.

ABSTRACT: We have analysed leaves of *Ocimum micranthum* Willd (manjeriço) about its anatomic and chemical characteristics. Those characteristics included the presence of the tector and one glandular hair, diacitic stomas on both epidermis as well as colateral vascular bundles. The chemical analysis revealed the presence of 1,8-cineol, camphor, eugenol and sesquiterpenes in its assential oil. More than 50% of the whole terpenes present in the leaves of these vegetables in Brazilian soil are monoterpenes. Other studies showed that these relative percentages are inverted in plantes of the Peruvian soil.

DESCRIPTORS: *Ocimum micranthum* Willd, Manjeriço, alfavaca, óleo essencial, histologycal description.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALZUGARAY, D. - *Plantas que curam*. São Paulo, Três Livros e Fascículos, 983, v. 1. p. 42 - 3.
2. CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. & WOOD, K. V. - Essencial Oil Constituents of *Ocimum micranthum* Willd. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 120 - 2, 1990.

3. CRUZ, G. L. - *Dicionário das plantas úteis do Brasil.* 2ª ed. Rio de Janeiro, Editora Civilização Brasileira, 1982. p. 33 - 6.
4. FIGUEIREDO, R. C. L. - Sobre a anatomia dos órgãos vegetativos de *Ocimum nudicaule* Benth (Labiatae). *An. Acad. bras. Ciênc.*, 44 (3/4): 550 - 69, 1972.
5. FIGUEIREDO, R.; GIULIETTI, A. M.; BARRADAS, M. & SALATINO, A. - Morphology and essential oil in taxonomy of *Ocimum nudicaule* Benth (Labiatae). *Ciênc. Cult.*, 32 (Supl.): 65 - 73, 1980.
6. HITOKOTO, H. *et al.* - Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. envir. Microbiol.*, 39 : 818 - 22, 1980.
7. KHOSLA, M K.; PUSHPANGANDAN, P.; THAPPA, R. K. & SOBTI, S. N. - Taxinomia, citogenética e chemical investigation of *O. micranthum*. *Indian Perfum.* 24 : 148 - 52, 1980.
8. MARTELLI, A.; FUNDARO, A.; CALVINO, R. & FRATTINI, C. - L'olio essenziale di *Ocimum nudicaule* brasiliano. [The essential oil of the Brazilian *Ocimum nudicaule*]. *Ann. Chim.*, 61: 551 - 6, 1971.
9. MORPHY, L.; GOMES, J. C. & LABOURIAU, L. G. - *Ocimum nudicaule* Benth, a new source of methyl-chavicol. *An. Acad. bras. Ciênc.*, 42 (Supl): 147 - 58, 1970.
10. PINKLEY, H. V. - Plant admixtures to ayahuasca, the South America hallucinogenic drink. *Lloydia*, 32: 305 - 14, 1969.
11. PIO CORREA, M. - *Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas.* Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1978. p. 84.
12. SHULTZ, A. R. - *Introdução ao estudo da botânica sistemática.* Rio de Janeiro. Editora Globo, 1961, v. 2. p. 286.
13. WASICKY, R. - Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. *Rev. Fac. Farm. Bioquím.* S. Paulo, 1: 77 - 81, 1963.
14. ZILVERMAN, S. D. - The determinations of the relative percentages of selected members of the *Labiatae* in various powdered admixtures. *Am. J. Pharm.*, 128: 225 - 34, 1956.

Recebido para publicação em 10 de agosto de 1991.



## EFEITO CUMULATIVO DE DICOFOL EM LARVAS E IMAGOS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Heloisa H. C. BARRETTO\*  
Odete N. K. INOMATA\*  
Sirlei BRANCO\*\*  
Wladimir João TADEI\*\*

RIALA 6/720

BARRETTO, H. H. C. e col. - Efeito cumulativo de Dicofol em larvas e imagos de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2): 5-8, 1992.

**RESUMO:** Moscas (*Drosophila melanogaster*) foram criadas em meio de cultura à base de banana e agar, adicionado de cinco diferentes concentrações de Dicofol, pesticida bastante usado na citricultura paulista. A cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons de parte extraída da amostra com solvente orgânico, tornou possível quantificar resíduos do produto em todas as amostras de larvas e de imagos analisadas. Os resultados encontrados em imagos e larvas sugerem um acúmulo de Dicofol durante o ciclo de desenvolvimento das moscas.

**DESCRITORES:** Dicofol. Moscas (*Drosophila melanogaster*). Imagos, larvas, determinação.

### INTRODUÇÃO

A ação conjunta dos insumos aplicados à agricultura, notadamente o emprego de agrotóxicos, tem permitido o aumento da produção. Todavia, o uso indiscriminado de um número sempre crescente de produtos altamente tóxicos, tem contribuído para o desequilíbrio ambiental, causando sérios prejuízos até mesmo para a espécie humana.

Os compostos organoclorados, nestas últimas décadas, têm sido amplamente utilizados, de forma a tornarem-se parte integrante de ciclos biológicos, geológicos e químicos. A detecção na água<sup>5,9</sup> no solo<sup>8,16</sup> e na atmosfera<sup>7</sup>, mostra que o acúmulo tem alcançado níveis tóxicos afetando populações de pássaros<sup>2,4</sup>, peixes<sup>10</sup> e outros animais<sup>6,11,15</sup> agravando o problema da poluição e aumentando a contaminação da cadeia alimentar como demonstrado por Uhnak e col.<sup>14</sup>, ao analisarem amostras de batata, trigo, leite, ovos, carne e leite materno, durante os anos de 1975 a 1983.

No Brasil, os organoclorados estão proibidos para uso agrícola desde setembro de 1985 (Portaria

329 do Ministério da Agricultura) com algumas exceções como é o caso do Dicofol para culturas de algodão e citrus.

O Dicofol 1, 1-bis (clorofenil) - 2, 2, 2 - tricloro etanol é um óleo viscoso de cor marrom, solúvel na maioria dos solventes orgânicos e comercialmente encontrado como concentrado emulsionável e pó molhável a 18,5% e, como pó seco a 5%. Tem amplo emprego como acaricida em culturas de laranja do Estado de São Paulo.

Diante das poucas informações sobre persistência de compostos organoclorados em insetos foi verificada a possibilidade de larvas e imagos desta mosca desenvolvidas em meio de cultura contendo o Dicofol serem passíveis de armazenar este composto.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Meio de Cultura

água	1.000 ml
agar	12 g
banana-nanica	800 g
fermento Fleischmann	15 g

\* Da Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz — São Paulo — Brasil.

\*\* Do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto — Universidade Estadual Paulista — UNESP.

xarope Karo	25 ml
ácido propiônico	22 ml
solução alcoólica de Nipagin	2 ml

Todas as amostras foram mantidas congeladas até o momento da análise.

#### Reagentes

n-hexano para análise de resíduos  
éter etílico para análise de resíduos  
diclorometano para análise de resíduos  
sulfato de sódio anidro granulado  
silica gel 60, - 0,063-0,2000 nm (70-230mesh) Merck, aquecida por uma noite a 360° e desativada com 3% de água  
ácido sulfúrico concentrado  
xileno mais emulsificante  
padrão de dicofol

#### AMOSTRAS

Moscas de espécie *Drosophila melanogaster* de um estoque montado em março de 1986 a partir de oito fêmeas e mantido em câmara de temperatura constante a 25,0 ± 1,0°C.

A partir de uma solução contendo 2g/ml de Dicofol em xileno com emulsificante, preparou-se misturas de 100ml de meio de cultura com 10, 20, 40, 60 e 80 mg de Dicofol respectivamente. De cada uma destas misturas foram tomados 6,0 ml em tubos de ensaio onde foram colocados dez casais de moscas com três dias para um período de oviposição de 24 horas. Decorridos quatro dias os tubos foram deixados em freezer por uma hora e em seguida foram adicionados 3,0 ml de água destilada a ± 2,0°C visando a imobilização das larvas que eventualmente estivessem vivas. A seguir os tubos foram agitados de forma a desprender as larvas da parede e do meio de cultura.

As larvas (A) provenientes de cada tubo foram lavadas com água destilada em peneira fina até que todo o resíduo do meio fosse retirado. Procedida a secagem com papel absorvente foram armazenadas em frascos de vidro até o momento da análise.

Os imagos (B) foram obtidos a partir de 100 casais virgens com três dias de idade, após um período de oviposição de 24 horas. Quando da emergência eram coletados diariamente e após rápida esterilização acondicionados em frascos de vidro até a realização da análise.

Paralelamente montou-se um grupo com moscas desenvolvidas em meio de cultura sem dicofol e um outro grupo com moscas desenvolvidas em meio de cultura contendo 0,4 ml de xileno com emulsificante para se verificar a influência do solvente. Para obtenção das amostras controle, procedeu-se da mesma maneira acima citada para se obter as larvas (A) e imagos (B).

#### PROCEDIMENTO

Pesar a amostra e misturar com sulfato de sódio anidro granulado. Macerar em almofariz e extrair o pesticida com 3 x 5 ml de hexano. Reunir os extratos hexânicos em tubo e adicionar 0,1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Agitar. Decantar e transferir a camada superior com pipeta Pasteur. Para coluna cromatográfica contendo 4,5 g de sílica desativada. Eluir com 45,0 ml de solução a 25% de éter etílico em hexano. Concentrar, e injetar em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons nas seguintes condições:

Temperatura da coluna: 204°C  
Temperatura do detector: 230°C  
Temperatura do injetor: 225°C  
Velocidade do gás de arraste: 30 ml/min

Coluna de vidro espiralada de 1/8 de polegada de diâmetro interno, com seis pés de comprimento e fase estacionária 1,5% OV 17 + 1,95% OV 210 em gás Chrom Q II 100/120 mesh.

A sensibilidade do aparelho foi ajustada de maneira a se obter uma deflexão de 60% da escala do papel registrador, com 200 pg de dicofol e ruído de 0,1 mm.

Um teste prévio mostrou que o dicofol não é destruído no tratamento com ácido sulfúrico.

Para se avaliar a metodologia foi adicionada a amostra isenta do pesticida, 5 ml de uma solução de dicofol a 10 ng/ml e obteve-se uma recuperação de 84%.

#### RESULTADO E DISCUSSÃO

Em todas as amostras analisadas verificamos, pela (tabela 1), que houve retenção de quantidades elevadas de Dicofol em ambas as fases do desenvolvimento das moscas (larvas e imagos). Nos grupos controle dois de A e dois de B, como era esperado, não foi detectado resíduo no limite de 0,01 mg/kg. Verifica-se também que a quantidade de resíduos nas larvas é menor, o que sugere um efeito cumulativo do composto no imago. Há uma relação direta, nas duas fases do desenvolvimento, entre as quantidades do composto detectadas nas amostras, com a concentração de Dicofol adicionada ao meio de cultura, exceto para imagos tratados com 20 mg.

TABELA 1  
Concentração de dicofol em larvas e imagos de *Drosophila melanogaster*

Concentração de Dicofol adicionada ao meio mg/100ml	Larva controle mg/kg (ppm)	Larva (A) mg/kg (ppm)	Imago controle mg/kg (ppm)	Imago (B) mg/kg (ppm)
0,0	<0,01	—	<0,01	—
0,0	<0,01	—	<0,01	—
10,0	—	24,22	—	36,35
20,0	—	40,43	—	81,00
40,0	—	66,33	—	103,17
60,0	—	99,51	—	400,82
80,0	—	123,13	—	223,88

O armazenamento de Dicofol em tecido animal foi avaliado primeiramente por Smith e col.<sup>12</sup> utilizando ratos como organismo-teste. Os autores verificaram que após dez semanas de dieta com 10 mg/kg (ppm) do composto, a concentração no tecido adiposo das fêmeas foi o dobro da detectada nos machos.

Os resultados são concordantes com os de outros autores trabalhando com diferentes organismos, tais como os de Barbera e col.<sup>1</sup> que detectaram também Dicofol em peixes, com os de Montone<sup>7</sup> que encontrou resíduos e organoclorados tanto em peixes como em pássaros marinhos e com os de To-Figueiras e col.<sup>13</sup> no homem.

A concentração de resíduos detectada nos imagos mostra efeito cumulativo do composto ao longo do desenvolvimento, o que está de acordo com Karakaya e Ozalp<sup>3</sup> que já haviam observado que níveis de organoclorados aumentavam de acordo com o tempo de exposição.

#### CONCLUSÃO

Os maiores níveis de Dicofol nos imagos, entre um e meio para quatro vezes os respectivos níveis nas larvas, sugerem um acúmulo do produto durante o ciclo de desenvolvimento das moscas.

RIALA 6/720

BARRETTO, H. H. C. *et al.* - Cumulative effect of Dicofol in larvae and imagines of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2): 5-8, 1992.

ABSTRACT: Flies (*Drosophila melanogaster*) were reared on banana-agar medium with five different concentrations of dicofol pesticide very large used in paulista citrus. Gas chromatograph with eletron capture detector its possible to quantify residues of the chemical in all samples of larvae and imagines examined. Results found suggest an accumulation of dicofol during the development of the flies.

DESCRIPTORS: *Dicofol*, *Flies (Drosophila melanogaster)*. *Larvae*, *Imagines*, *Determination*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBERA, J. C.; LOPES, F. J.; HERNANDEZ, F.; MEDINA, J. & PASTOR, A. — Gas chromatographic determination of organochlorine pesticides; contamination of Dicofol, Fenson, and Tetradifon in fish and natural waters of a wet area beside the Mediterranean Sea. *Bull. environ. Contam. Toxicol.* 36: 211 - 218, 1986.
2. JOHNSTON, D. W. — Organochlorine pesticide residues in Florida birds of prey. 1969-76. *Pest. Monitor. J.* 12: 8-15, 1978.
3. KARAKAYA, A. E. & OZALP, S. — Organochlorine pesticides in human adipose tissue collected in Ankara (Turkey) 1984-1985. *Bull. environ. Contam. Toxicol.* 38: 941-945, 1987.
4. KING, K. A.; FLINCKINGER, E. L. & HILDEBRAND, H. H. — Shell thinning and pesticide residues in Texas aquatic bird eggs, 1970. *Pest. Monitor. J.* 12: 16 - 21, 1978.
5. LARA, W. H. & BARRETTO, H. H. C. — Resíduos de pesticidas clorados em águas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 69 - 74, 1972.
6. MARTINEAU, D.; BELAND, P.; DESJARDINS, C. & LAGACI, A. — Levels of organochlorine chemicals in tissues of beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Laurence Estuary, Quebec, Canada. *Arch. environ. Conntam Toxicol.* 16: 137 - 147, 1987.
7. MONTONE, C. — Hidrocarbonetos clorados no litoral do Estado de São Paulo, 1987. (Tese de

- Mestrado — Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.)
8. MOORE, D. G. & LOPES, B. R. — DDT residues in forest floors and soils of Western Oregon, september-november 1966. *Pest. Monit. J.* 14: 77-85, 1980.
  9. PEARCEP, A. P.; REYNOLDS, L. M. & DAVID, B. P. — DDT residues in rainwater in New Brunswick and estimate of aerial transport of DDT into the gulf of St. Lawrence, 1967-68. *Pest. Monitor. J.* 11: 199-204, 1978
  10. PICER, M.; PICER, N. & AHEL, M. - Chlorinated insecticide and PCB residues in fish and mussels of East Coastal waters of middle and North Adriatic Sea, 1974-75. *Pest. Monitor. J.* 12: 102-112, 1978.
  11. SCHICK, C. T.; BRENNAN, L. A.; BUCHANAN, J. B.; FINGER, M. A.; JOHNSON, T. M. & HERMAN, S. G. — Organochlorine contamination in shorebirds from Washington State and the significance for their falcon predators. *Environ. Monitor. Asses.* 9: 115-131, 1987.
  12. SMITH JR., R. B.; LARSON, P. S.; FINNERGAN, J. K.; HAAG, H. B.; HENNIGAR, G. R. & FLORAPPEARL, C. — Toxicology studies of 2,2 -bis- (chlorophenyl) - 2, 2, 2 - trichloroethanol (Kelthane). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1: 119 - 134, 1959.
  13. TO-FIGUEIRAS, J.; RODAMILANS, M.; GOMEZ, J. & CORBELLA, J. — Hexachlorobenzene residues in the general population of Barcelona. In: MORRIS, C. R. & CABRAL, J. R. P. - Hexachlorobenzene. INTERNATIONAL SYMPOSIUM, [s.l.] Proceedings [ s.n.t.] p. 147 - 148, 1986.
  14. UHNAK, J.; VENINGEROVA, M. & MDARIC, A. — Dynamics of hexachlorobenzene residues in the food chain. In: MORRIS, C. R. & CABRAL, J. R. P. - Hexachlorobenzene. INTERNATIONAL SYMPOSIUM, [ s.l. ] Proceeding [s.n.t.] p. 109 - 113, 1986.
  15. VEITH, G. D.; KUEHL, D. W.; LEONARD, E. N.; WELCH, K. & PRATT, G. — Fish, wildlife, and estuaries Polychlorinated biphenyls and other organic chemical residues in fish from major United States watersheds near the Great Lakes, 1978. *Pest. Monitor. J.* 15: 1 - 13, 1981.
  16. WOODWELL, G. M.; CRAIG P. P. & JOHNSON, H. A. — DDT in the biosphere: where does it go? *Scienc.* 174: 1101-1110, 1971.

Recebido para publicação em 8 de julho de 1991.

## COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO\*

Elza Schwarz Gastado BADOLATO\*\*  
Franca Durante de MAIO \*\*  
Mário TAVARES \*\*

RIALA 6/729

BADOLATO, E. S. G. e col. - Composição em ácidos graxos de óleos vegetais comestíveis comercializados no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 51-62, 1992.

RESUMO: Com o objetivo de determinar a composição em ácidos graxos de óleos vegetais comestíveis nacionais, foi analisado um total de 221 amostras de óleos de algodão, amendoim, arroz, babaçu, girassol, milho e soja, comercializados no Estado de São Paulo, empregando-se a técnica de cromatografia em fase gasosa. Todos os valores de ácidos graxos encontrados estiveram compreendidos dentro dos limites aplicados pela Comissão do *Codex Alimentarius* ou, no caso do óleo de arroz, próximos aos referidas na literatura internacional. Os óleos de algodão, amendoim, girassol, milho e soja apresentaram elevados teores de ácidos linoléico (em média, 53,7%, 38,0%, 66,7%, 47,3% e 54,5%, respectivamente) e, no caso do óleo de soja, significativo teor de ácido linolênico (em média, 7,1%), ambos considerados ácidos graxos essenciais, conferindo a esses óleos destacado valor nutricional. Os resultados obtidos poderão ser aproveitados na elaboração de tabelas de composição de alimentos ou em futura revisão das normas brasileiras relativas à identidade e qualidade dos óleos e gorduras comestíveis.

DESCRIPTORIOS: Óleos vegetais comestíveis. Ácidos graxos. Cromatografia em fase gasosa. Óleos comestíveis, composição. Ácidos graxos essenciais.

### INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras, uma das maiores classes de alimentos, ao lado dos carboidratos e das proteínas, são importantes na dieta humana pelo seu destacado papel como fonte de energia e de ácidos graxos essenciais para o organismo, Carpenter *et alii*<sup>6</sup>, Mason<sup>13</sup>, Mc Graw-Hill<sup>14</sup>, Mercadante e Rodriguez-amaya<sup>15</sup>. Devido a isto, torna-se necessário um estudo de sua composição, principalmente quanto aos teores de ácidos graxos, pois estes representam até 96% da mesma, Hartman & Esteves<sup>9</sup>. Tais dados são imprescindíveis na elaboração de normas e padrões de qualidade e também na confecção de tabelas de composição dos alimentos, - Rossell *et alii*<sup>18</sup>. Através da análise da composição dos ácidos graxos de óleos e gorduras é também possível detectar adulteração nestes produtos e a degradação de alimentos

que, em muitos casos, começa pela oxidação de ácidos graxos e insaturados, Mercadante e Rodriguez-amaya<sup>15</sup>.

Cabe destacar que nove óleos de origem vegetal figuram na relação dos dez óleos e gorduras mais produzidos no mundo, cuja liderança está com o óleo de soja, seguido pelo de dendê. Lago<sup>12</sup>, Record<sup>17</sup>. No Brasil, 90% do óleo consumido corresponde ao de soja que tem em nosso país o segundo produtor mundial, Lago<sup>12</sup>. Ressalte-se que cerca de 70% do volume produzido de óleos vegetais são empregados para consumo humano, principalmente na forma de margarina, gordura para panificação, óleos para salada e fritura, Ratray<sup>16</sup>.

Para identificar os óleos comestíveis, a técnica da cromatografia em fase gasosa, que determina a composição em ácidos graxos, tem apresentado os me-

\* Realizado no Laboratório da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 7<sup>o</sup> Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, São Paulo, 1991.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

lhores resultados, substituindo, conseqüentemente, os métodos clássicos, como os índices de iodo e de refração, Badolato *et alii*<sup>1</sup>, Holeman<sup>10</sup>, Rossell *et alii*<sup>18</sup>, Spencer *et alii*<sup>21</sup>, Sreenivasan<sup>22</sup>. Entretanto, as normas legais vigentes no território brasileiro, Brasil<sup>3</sup>, não incluem a referida composição nos padrões de identidade dos óleos e gorduras destinados à alimentação humana, exceto para os óleos de colza e de semente de uva, BRASIL<sup>4,5</sup>. Além destes constam das citadas normas os seguintes óleos: algodão, amendoim, arroz, babaçu, coco-da-baía, dendê, ger-gelím, girassol, milho, oliva, ouricuri e soja.

Os trabalhos publicado sobre a composição em ácidos graxos de óleos comestíveis fabricados no Brasil ou importados e aqui comercializados, como é o caso do óleo de oliva, objetivam avaliar fraudes, Badolato *et alii*<sup>1,2</sup>, Soares & Amaya<sup>20</sup>, Szpiz *et alii*<sup>23</sup>, Tavares *et alii*<sup>26</sup>, Vidal *et alii*<sup>27</sup>, e não necessariamente a obtenção de dados atualizados sobre a composição dos mesmos. Dentro da literatura consultada, o único que teve este objetivo foi o de Mercadante e Rodriguez-Amaya<sup>15</sup>, o qual avaliou a composição em ácidos graxos de óleos comestíveis comercializados na cidade de Campinas.

Considerando o abordado anteriormente, este trabalho tem como objetivo determinar a composição em ácidos graxos de óleos vegetais comestíveis (algodão, amendoim, arroz, babaçu, girassol, milho e soja), de fabricação nacional, comercializados no Estado de São Paulo, a fim de que os resultados obtidos possam contribuir com futura revisão das normas e padrões de óleos e gorduras bem como na elaboração de tabelas de composição de alimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisadas neste trabalho amostras de óleos vegetais comestíveis comercializados no Estado de São Paulo, de diversas marcas, enviadas para análise ao Instituto Adolfo Lutz por parte de órgãos de fiscalização da Secretaria da Saúde do mesmo Estado, pelo Departamento Estadual de Polícia do Consumidor (DECON), ou pelos próprios fabricantes ou importadores.

Para estabelecer a composição em ácidos graxos, foram consideradas apenas as amostras que se revelaram puras, num total de 221, assim discriminadas: oito amostras de óleo de algodão, 21 amostras de óleo de amendoim, 46 amostras de óleo de arroz, 19 amostras de óleo de babaçu, 10 amostras de óleo de girassol, 70 amostras de óleo de milho e 47 amostras de óleo de soja. Segundo informação dos fabricantes, as amostras dos óleos de algodão, girassol e milho foram submetidas ao processo de "winterização", com o objetivo de torná-las resistentes ao frio.

### Cromatografia gasosa

Das 46 amostras de óleo de arroz, oito corresponderam a marcas comerciais e 38 tiveram seus lipídios

extraídos em laboratório, a partir do arroz em casca, em aparelho extrator de Soxhlet, usando-se éter etílico como solvente, para se estabelecer o perfil cromatográfico dos respectivos óleos e utilizá-los como padrões. Os lipídios extraídos dessa forma, bem como todas as demais amostras, foram metilados segundo a técnica descrita nas *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*<sup>11</sup>.

A análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi efetuada num cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama, acoplado a um integrador. Foi usada uma coluna de aço inoxidável, de seis pés de comprimento por 1/8 de polegada de diâmetro interno, empacotada com succinato de dietileno glicol (DEGS) a 20% sobre Chromosorb W/AW como suporte sólido, numa temperatura programada de 150 a 190°C, empregando-se nitrogênio como gás de arraste.

### Identificação e quantificação dos ácidos graxos

A identificação foi conduzida comparando os tempos de retenção com padrões conhecidos. A quantificação foi feita com um integrador.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 a 7 apresentam os valores mínimo, médio e máximo obtidos quanto à composição em ácidos graxos dos óleos analisados, bem como as taxas aplicadas pela Comissão do *Codex Alimentarius*<sup>8</sup> para a referida composição. As figuras 1 a 7 mostram os respectivos perfis cromatográficos para cada um daqueles óleos.

Todos os óleos examinados tiveram os valores de ácidos graxos compreendidos dentro dos limites adotados pelo *Codex Alimentarius*<sup>8</sup>, com exceção do óleo de arroz, pois o *Codex* não costuma incluir o óleo de arroz nos seus padrões de qualidade e identidade para óleos e gorduras comestíveis. Entretanto, se comparado à literatura internacional, Mason<sup>13</sup>, o teor médio dos ácidos graxos saturados e insaturados dos óleos de arroz ora analisados se aproxima daqueles.

Quanto aos óleos de arroz, milho, algodão e soja os resultados obtidos, inclusive quanto aos totais de ácidos saturados e insaturados, se assemelharam aos de Mercadante e Rodrigues-amaya<sup>15</sup>, que analisaram tais óleos, comercializados na cidade de Campinas.

No tocante ao óleo de babaçu, os resultados vieram a confirmar seu elevado grau de saturação (83,1%), devido principalmente ao alto conteúdo de ácido láurico (43,0%), o que lhe proporciona uma grande estabilidade contra oxidação, maior do que os outros óleos comerciais, Young<sup>28</sup>, ponto importante se considerarmos que este óleo é usado na fabricação de margarinas e gorduras compostas e, regionalmente, para frituras, Hartman e Esteves<sup>9</sup>.

Verificou-se que os óleos de amendoim, algodão, girassol e soja exibiram teores médios de ácido oléico próximos ao limite mínimo fixado pela

Comissão do *Codex Alimentarius*<sup>8</sup>, enquanto que os valores médios do ácido linoléico se aproximaram do limite máximo. Esta variação provavelmente se deve a fatores climáticos, edafológicos, local de cultivo, tipo e grau de maturação dos frutos ou sementes, que influenciam na composição dos óleos vegetais, Tango<sup>24, 25</sup>. Quanto ao óleo de milho, embora não tendo se comportado da mesma maneira com relação aos dois ácidos, revelou um teor médio

de ácido linoléico equiparado aos dos citados óleos. Ressalte-se que este ácido é considerado um ácido graxo essencial, conferindo aos referidos óleos nacionais um destacado valor nutricional. No caso do óleo de soja, esse destaque deve ser estendido ao significativo teor de ácido linolênico encontrado no mesmo, já que se trata também de ácido graxo essencial.

TABELA 1  
Composição dos ácidos graxos do óleo de amendoim

Ácido graxo	Valor % (p/p)*			
	Mínimo	Máximo	Médio	<i>Codex Alimentarius</i> <sup>8</sup>
C < 14	-	-	-	< 0,4
Mirístico	-	-	-	< 0,6
Palmítico	11,1	15,8	13,0	6,0 - 16,0
Palmitoléico	< 0,1	0,7	0,1	< 1,0
Margárico	-	-	-	< 0,1
Heptadecenóico	-	-	-	< 0,1
Esteárico	2,0	5,3	3,3	1,3 - 6,5
Oléico	34,2	43,2	40,2	35,0 - 72,0
Linoléico	33,0	42,0	38,0	13,0 - 45,0
Araquídico	0,4	3,2	1,1	1,0 - 3,0
Linolênico	0,2	2,2	1,0	< 0,3
Gadoléico	-	-	-	0,5 - 2,1
Behênico	0,7	3,9	2,4	1,0 - 5,0
Erúico	-	-	-	0,3
Lignocérico	-	-	-	0,5 - 3,0
Total de AGS	14,6	28,2	19,8	-
Total de AGI	67,4	88,1	79,3	-
Relação AGS/AGI	1/4,6	1/3,1	1/4,0	-

\* Resultados de 21 amostras.

AGS = ácidos graxos saturados.

AGI = ácidos graxos insaturados.

TABELA 2  
Composição dos ácidos graxos do óleo de arroz.

Ácido graxo	Valor % (p/p)*			
	Mínimo	Máximo	Médio	Masson (13)
Mirístico	0,1	0,6	0,4	-
Palmítico	12,5	21,5	17,2	-
Palmitoléico	< 0,1	1,6	0,2	-
Esteárico	1,1	3,8	2,4	-
Oléico	43,4	54,4	48,7	-
Linoléico	20,7	36,0	29,0	-
Araquídico	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-
Linolênico	0,4	2,0	1,5	-
Behênico	< 0,1	2,7	0,5	-
Total de AGS	13,7	28,6	20,5	18,6
Total de AGI	64,5	94,0	79,4	80,3
Relação AGS/AGI	1/4,7	1/3,3	1/3,9	1/4,3

\* Resultados de 46 amostras.

AGS = ácidos graxos saturados.

AGI = ácidos graxos insaturados

TABELA 3  
Composição dos ácidos graxos do óleo de babaçu.

Ácido graxo	Valor % (p/p)*			Codex Alimentarius <sup>2</sup>
	Mínimo	Máximo	Médio	
Caprílico	3,1	6,0	4,9	2,6-7,3
Cáprico	4,3	5,9	5,1	1,2-7,6
Láurico	40,0	46,8	43,0	40,0-55,0
Mirístico	16,2	20,1	17,5	11,0-27,0
Palmítico	8,0	9,9	9,1	5,2-11,0
Esteárico	3,0	3,8	3,5	1,8-7,4
Oléico	11,4	18,6	14,6	9,0-20,0
Linoléico	1,2	3,8	2,3	1,4-6,6
Total de AGS	74,6	92,5	83,1	-
Total de AGI	12,6	22,4	16,9	-
Relação AGS/AGI	1/0,2	1/0,2	1/0,2	-

\* Resultados de 19 amostras.

AGS = ácidos graxos saturados.

AGI = ácidos graxos insaturados.

TABELA 4  
Composição dos ácidos graxos do óleo de milho "winterizado"

Ácido graxo	Valor % (p/p)*			Codex Alimentarius <sup>2</sup>
	Mínimo	Máximo	Médio	
Láurico	-	-	-	< 0,3
Mirístico	< 0,1	< 0,1	< 0,1	**
Palmítico	9,0	14,0	13,7	9,0-14,0
Palmitoléico	< 0,1	0,50	0,1	< 0,5
Esteárico	1,1	4,0	2,2	0,5-4,0
Oléico	32,0	40,7	35,5	24,0-42,0
Linoléico	40,5	51,4	47,3	34,0-62,0
Araquídico	< 0,1	0,7	0,1	< 1,0
Linolênico	< 0,1	2,0	1,1	< 2,0
Gadoléico	-	-	-	< 0,5
Behênico	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,5
Lignocérico	-	-	-	< 0,5
Total de AGS	10,1	18,9	16,0	-
Total de AGI	72,5	94,6	84,0	-
Relação AGS/AGI	1/7,2	1/5,0	1/5,3	-

\* Resultados de 70 amostras.

\*\* Provavelmente devido a um erro de impressão, o valor aplicado pelo *Codex Alimentarius* (8) foi de 9,0-14,0% para o ácido mirístico. Até 1989, o mesmo *Codex* (7) aplicava o valor < 0,1%.

AGS = ácidos graxos saturados.

AGI = ácidos graxos insaturados.



TABELA 5  
Composição dos ácidos graxos do óleo de algodão "winterizado"

Ácido graxo	Valor % (p/p)*			Codex Alimentarius <sup>2</sup>
	Mínimo	Máximo	Médio	
C < 14	-	-	-	< 0,1
Mirístico	0,5	0,9	0,7	0,4-2,0
Palmítico	21,7	25,9	23,6	17,0-31
Palmitoléico	< 0,1	1,0	0,4	0,5-2,0
Estearico	< 0,1	2,5	2,2	1,0-4,0
Oléico	17,2	20,9	19,5	13,0-44,0
Linoléico	50,3	57,7	53,7	33,0-59,0
Araquídico	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,7
Linolênico	< 0,1	0,3	0,1	0,1-2,1
Gadoléico	-	-	-	< 0,5
Behênico	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,5
Erúxico	-	-	-	< 0,5
Lignocérico	-	-	-	< 0,5
Total de AGS	22,2	29,4	26,5	-
Total de AGI	67,5	79,9	73,7	-
Relação AGS/AGI	1/3,0	1/2,7	1/2,8	-

\* Resultados de 8 amostras.  
AGS = ácidos graxos saturados.  
AGI = ácidos graxos insaturados.

TABELA 6  
Composição dos ácidos graxos do óleo de girassol "winterizado"

Ácido graxo	Valor % (p/p)*			Codex Alimentarius <sup>2</sup>
	Mínimo	Máximo	Médio	
C < 14	-	-	-	< 0,4
Mirístico	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,5
Palmítico	6,4	7,8	7,0	3,0-10,0
Palmitoléico	< 0,1	0,1	< 0,1	< 1,0
Estearico	3,0	5,6	4,1	1,0-10,0
Oléico	19,4	24,0	21,7	14,0-35,0
Linoléico	62,6	68,2	66,7	55,0-75,0
Araquídico	< 0,1	0,3	0,1	< 1,5
Linolênico	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,3
Gadoléico	-	-	-	< 0,5
Behênico	< 0,1	0,6	0,3	< 1,0
Erúxico	-	-	-	< 0,5
Lignocérico	-	-	-	< 0,5
Nervônico	-	-	-	< 0,5
Total de AGS	9,4	14,3	11,5	-
Total de AGI	82,0	92,4	88,4	-
Relação AGS/AGI	1/8,7	1/6,5	1/7,7	-

\* Resultados de 10 amostras.  
AGS = ácidos graxos saturados.  
AGI = ácidos graxos insaturados.

TABELA 7  
Composição dos ácidos graxos do óleo de soja.

Ácido graxo	Valor % (p/p)*			Codex Alimentarius <sup>2</sup>
	Mínimo	Máximo	Médio	
C < 14	-	-	-	< 0,1
Mirístico	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,5
Palmítico	8,6	14,0	11,5	7,0-14,0
Palmitoléico	< 0,1	0,5	< 0,1	< 0,5
Estearico	1,4	5,5	3,5	1,4-5,5
Oléico	19,0	27,5	23,2	19,0-30,0
Linoléico	49,3	62,0	54,5	44,0-62,0
Araquídico	< 0,1	0,2	< 0,1	< 1,0
Linolênico	4,7	11,0	7,1	4,0-11,0
Gadoléico	-	-	-	< 1,0
Behênico	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,5
Total de AGS	10,0	19,7	15,0	-
Total de AGI	73,0	101,0	84,8	-
Relação AGS/AGI	1/7,3	1/5,1	1/5,7	-

\* Resultados de 47 amostras.

AGS = ácidos graxos saturados.

AGI = ácidos graxos insaturados.

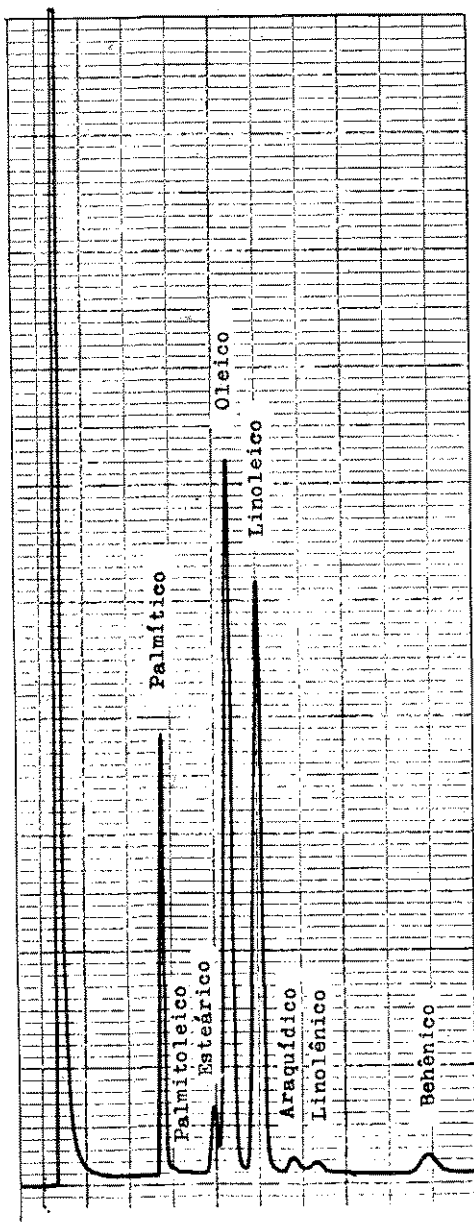


FIGURA 1  
Cromatograma de óleo de amendoim puro.

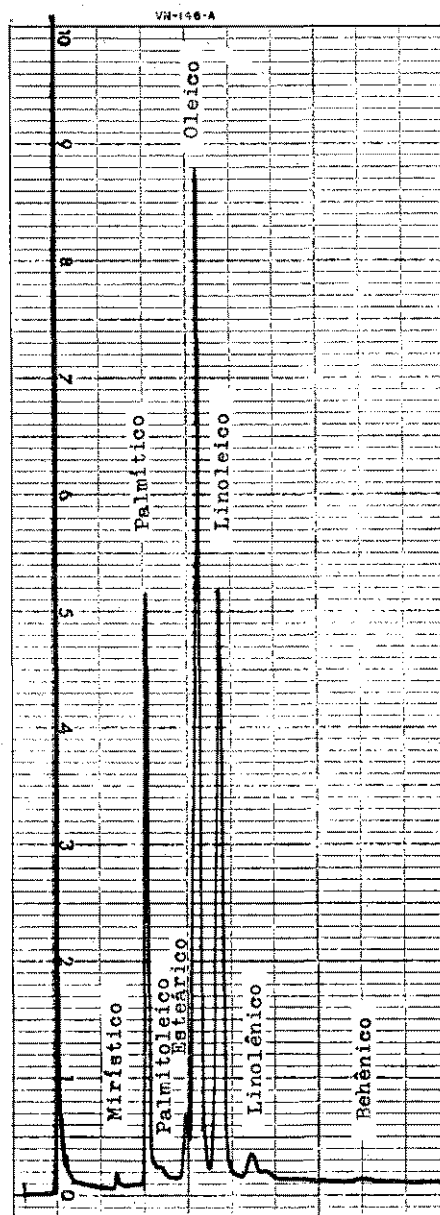


FIGURA 2  
Cromatograma de óleo de arroz puro.

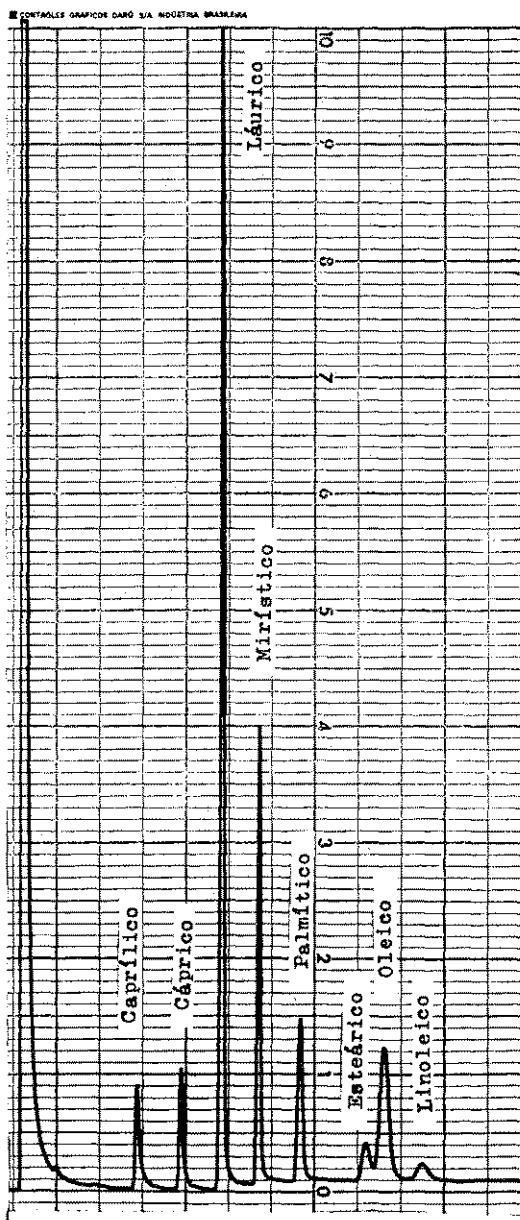


FIGURA 3  
Cromatograma de óleo de coco babaçu puro.

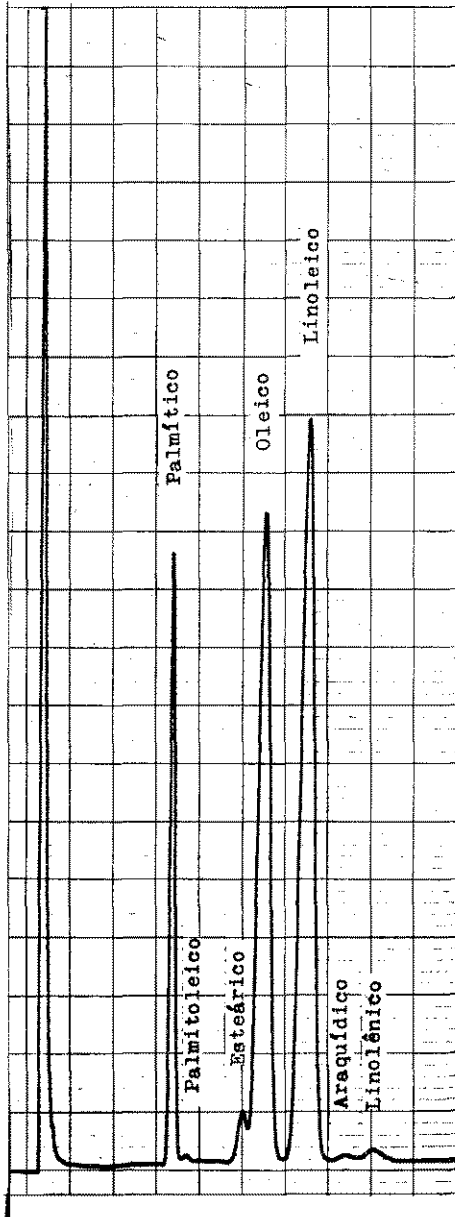


FIGURA 4  
Cromatograma de óleo de milho puro.

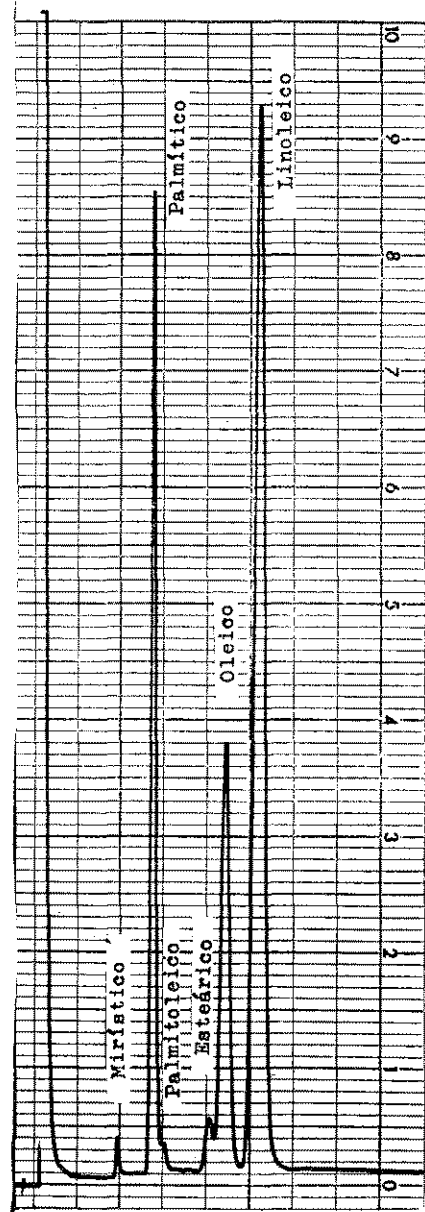


FIGURA 5  
Cromatograma de óleo de semente de algodão puro.

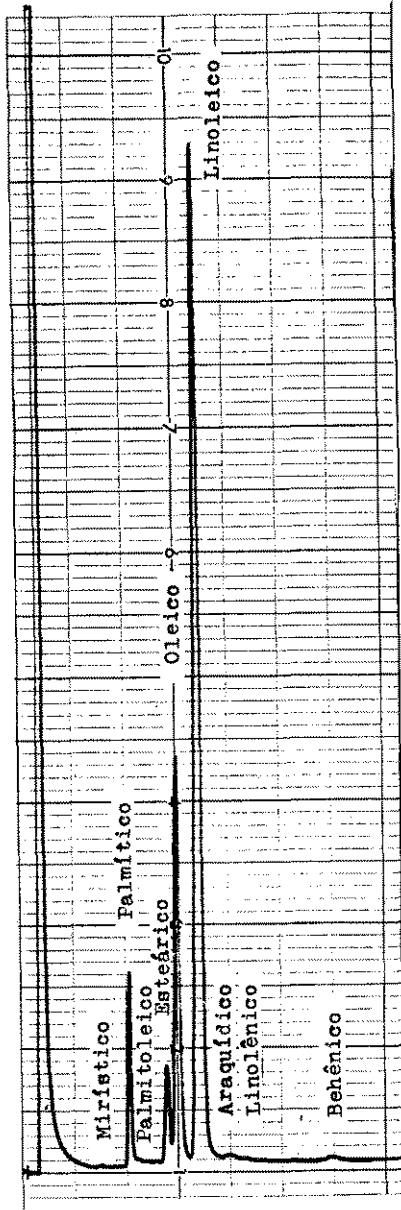


FIGURA 6  
Cromatograma de óleo de semente de girassol puro.

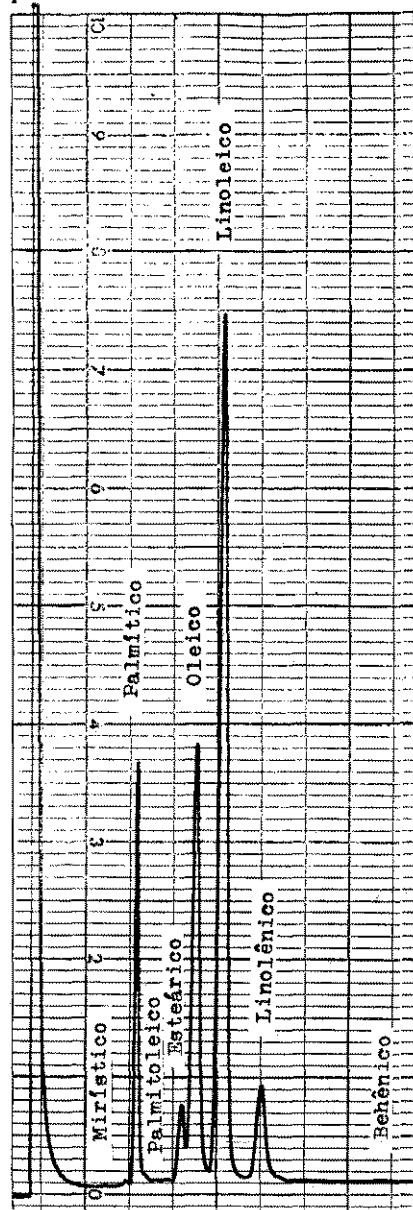


FIGURA 7  
Cromatograma de óleo de soja puro.

## CONCLUSÃO

Os óleos de amendoim, algodão, girassol, milho e soja apresentaram alto teor de ácido linoléico e, no caso do óleo de soja, significativo teor de ácido linolênico, ambos considerados ácidos graxos essenciais que lhes confere um destacado valor nutricional.

Dada a importância dos ácidos graxos na composição dos óleos e gorduras, espera-se que os resultados obtidos possam contribuir na elaboração de tabelas de composição dos alimentos, assim como possam ser aproveitados em futura revisão das normas nacionais relativas à identidade e qualidade dos óleos e gorduras comestíveis.

BADOLATO, E.S.G. *et al.* - Fatty acid composition of edible vegetable oils commercialized in São Paulo State. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 51-62, 1992.

**ABSTRACT:** In order to determine the fatty acid composition of pure edible vegetable oils produced in Brazil and on sale in São Paulo State, were analysed 221 samples, by gas-liquid chromatography. These samples included babassu, corn, cottonseed, peanut, rice bran, soybean and sunflower oils. The contents of fatty acids found for all the oils were within the range applied by the *Codex Alimentarius* Commission and, for rice bran oil, the results agreed with those mentioned in the international literature. Some of these oils (corn, cottonseed, peanut, soybean and sunflower) showed a high content of linoleic acid (in average, 47,3% , 53,7% , 38,0% , 54,5% and 66,7% , respectively) and, in the case of soybean oil, significant content of linolenic acid (in average, 7,1%), both considered as essential fatty acids, that gave to the referred Brazilian oils a considerable nutritional value. The fatty acids values found can contribute to the elaboration of food composition tables and can also be included in the Brazilian legal standards of edible oils and fats.

**DESCRIPTORS:** Edible vegetable oils. Fatty acids. Gas-liquid chromatography . Edible oils, composition. Essentials fatty acids.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BADOLATO, E. S. G.; DURANTE, F.; ALMEIDA, M. E. W. & SILVEIRA, N. V. V. Óleo de oliva - avaliação de sua qualidade. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41 (1): 63 - 70, 1981.
2. MAIO, F. D.; LAMARDO, L. C. A. & ZENEBON, O. Óleos naturais: verificação de sua qualidade por cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47 (1/2): 87 - 95, 1987.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 22/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Estabelece padrão de identidade e qualidade para óleos e gorduras comestíveis, destinados à alimentação humana. *Diário Oficial*, Brasília, 06 set. 1977. Sec. I, p. 11807 - 10.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução Normativa nº 25/79 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade a que deve obedecer o óleo de colza comestível refinado. *Diário Oficial*, Brasília, 24 set. 1979. Sec. I, pt. I, p. 13883 - 4.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 05/89 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Fixa a identidade e as características de qualidade a que deve obedecer o óleo de semente de uva refinado. *Diário Oficial*, Brasília, 02 jun. 1989. Sec. I, pt. I, p. 8621.
6. CARPENTER, D. L.; LEHMANN, J.; MASON, B. S. & SLOVER, H. T. Lipid composition of selected vegetable oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 52 (12): 713-8, 1976.
7. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Report of the eighth session of the Codex Committee on Fats and Oils*. Rome, FAO/WHO, 1976. p. 23 (ALINORM 76/19, Appendix V).
8. BRASIL. *Codex standards for edible fats and oils*. Rome, FAO/WHO, 1989. (CAC - Division II).
9. HARTMAN, L. & ESTEVES, W. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais*. São Paulo, Secretaria de Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Coordenadoria da Indústria e Comércio, (s.d.) p. 11 (Série Tecnologia Agroindustrial, 13).
10. HOLEMAN, E. H. - A century of analytical excellence - food adulteration detection : 100 years of progress in AOAC methodology. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 67 (6): 1029 - 34, 1984.
11. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. São Paulo. - *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, I.O.E., 1985. p. 245 - 66.
12. LAGO, R. - Pesquisa e produção de óleos, gorduras e derivados. *Informativo SBCTA*, 11: 4, 1989.
13. MASSON, L. - Relative nutritional value of various dietary fats and oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 58 (3): 249 - 55, 1981.
14. McGraw-Hill *encyclopedia of food, agriculture & nutrition*. New York, McGraw-Hill, 1977. p. 229 - 30.
15. MERCADANTE, A. Z. & RODRIGUES-AMAYA, D. B. - Avaliação da composição de ácidos graxos de óleos comestíveis. *Bol. SBCTA*, 20 (1/2): 29 - 40, 1986.
16. RATTRAY, J. B. M. - New Fats and oils through biotechnology. *Inform. I* (11): 945 - 51, 1990.
17. RECORD palm oil production forecast. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 66 (8): 1026 - 42, 1989.

18. ROSSELL, J. B. ; KING, B. & DOWNES, M. J. - Composition of oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 62 (2): 221 - 30, 1985.
19. ———— Detection of adulteration. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 60 (2): 333 - 9, 1983.
20. SCARES, L. V. & AMAYA, D. R. - Identificação e quantificação de adulterantes em óleo de oliva por cromatografia gasosa. *Bol. SBCTA*, 15 (1): 1- 17, 1981.
21. SPENCER, G. F.; HERB, S. F. & GORMISKY, P. J. - Fatty acid composition as basis for identification of comercial fats and oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 53 (3): 94 - 6, 1976.
22. SREENIVASAN, B. - Component fatty acids and composition of some oils and fats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 45 (4): 259 - 65, 1968.
23. SZPIZ, R. R.; PEREIRA, D. A. & JABLONKA, F. H. - *Avaliação de óleos comestíveis comercializados no Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, EMBRAPA-CTAA, 1985. (EMBRAPA - CTAA. *Boletim de Pesquisa*, 13).
24. TANGO, J. S.; LACAZ, P. A. A.; SANTOS, L. C. dos; TURATTI, J. M.; SILVA, M. T. C.; FIGUEIREDO, I. B. de; MANTOVANI, D. M. B. & CAMPOS, S. D. da S. - Características físicas e químicas do óleo de dendê. *Bol. ITAL*, 18 (4): 509 - 42, 1981.
25. ————; TURATTI, J. M.; SILVA, M. T. C.; SHIROSE, I. & YOTSUYANAGI, K. - Influência do local de plantio no teor e características do óleo de algumas cultivares de soja. *Bol. ITAL*, 20 (4): 355 - 74, 1983.
26. TAVARES, M.; BARBÉRIO, J. C.; BADOLATO, E. S. G.; MAIO, F. D. & CARVALHO, J. B. - Identificação e quantificação de adulterantes do óleo de dendê por meio de cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (2): 145 - 50, 1989.
27. VIDAL, P. A.; RICCIARDI, A. J. & FERREIRA, J. F. - Determinação da adição de óleo de soja a outros óleos vegetais comestíveis por cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39 (1): 67 - 77, 1979.
28. YOUNG, F. V. K. - Palm kernel and coconut oils: analytical characteristics, process technology and uses. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 60 (2): 326A - 331A, 1983.

Recebido para publicação em 31 de agosto de 1992.



## BACTERIÓFAGOS FECAIS EM ÁGUAS, VERDURAS CRUAS NÃO LAVADAS E OUTROS PRODUTOS ALIMENTÍCIOS: OBSERVAÇÕES QUANTO AO SEU ACHADO DURANTE SURTO DE HEPATITE INFECCIOSA E EM CONDIÇÃO NORMAL.\*

Dílma Seala GELLI \*\*  
Aldo de SOUZA \*\*

RIALA6/730

GELLI, D. S.; e col. - Bacteriófagos fecais em águas, verduras cruas não lavadas e outros produtos alimentícios: observações quanto ao seu achado durante surto de hepatite infecciosa e em condição normal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 52 (1/2): 63-69, 1992.

**RESUMO:** Esse estudo relata resultados referentes à ocorrência de fagos (colifagos e shigelafagos) em 304 amostras de águas, nove de esgoto e 268 de verduras cruas não lavadas não relacionadas com ocorrência de infecções humanas por vírus entéricos e em 14 amostras de água, 8 de verduras cruas não lavadas e 41 outros produtos alimentícios (17 de leite cru, 17 de pós para o preparo de alimentos e 7 de alimentos prontos), coletadas em um município de São Paulo onde ocorria um surto de hepatite infecciosa. A porcentagem de positividade para fagos nas amostras coletadas no local onde ocorria o surto foi maior (20,63%) do que nas amostras controle (8,58% das amostras de verduras e 7,57% das amostras de água). Considerando-se somente as amostras de água de poço e nascente (não cloradas) e de verduras, verifica-se que a positividade foi de 50% nas amostras associadas ao surto e 8,58% nas amostras controle. Todas (100%) as amostras positivas do grupo controle revelaram presença de colifagos, enquanto os shigelafagos foram encontrados em 53,38% dessas amostras. Por outro lado, nas amostras associadas ao surto, a ocorrência de colifagos foi de 46,15% e de shigelafagos, 100%. O trabalho apresenta ainda considerações sobre esses achados, discutindo o papel dos bacteriófagos fecais como indicadores microbianos de contaminação fecal e como indicadores da presença de outros vírus entéricos, e seu valor na avaliação microbiana de produtos alimentícios, inclusive água.

**DESCRITORES** - Colifagos e shigelafagos. Indicadores virais de poluição fecal. Hepatite infecciosa e bacteriófagos.

### INTRODUÇÃO

Os agentes de Doenças Veiculadas por Alimentos incluem vírus entéricos patogênicos ao homem, entre os quais estão os enterovírus, adenovírus, reovírus, o vírus da hepatite infecciosa e os que causam diarreias epidêmicas<sup>2,3,4,7,8,9,13,16</sup>. No período de 1974 - 78 o "Centers for Disease Control" dos Estados Unidos relatou a ocorrência de 21 surtos de infecções entéricas por vírus, envolvendo 994 pessoas, veiculados comprovadamente por alimentos<sup>4</sup>. Na Inglaterra, Appleton e col.<sup>2</sup> sugeriram que diarreias de etiologia desconhecida são muito

provavelmente causadas por agentes virais veiculados por alimentos. Na Austrália, infecções pelo vírus Norwalk foram relacionadas ao consumo de ostras cruas<sup>7</sup>. Entretanto, o vírus que com maior frequência está associado ao consumo de alimentos, é o agente da hepatite infecciosa<sup>3,4</sup>.

A determinação analítica de partículas virais patogênicas viáveis não é realizada rotineiramente na análise de produtos alimentícios. Esta determinação depende de instalações especiais de laboratório e de pessoal devidamente treinado, pois é atividade analítica complexa; mesmo em alimentos envolvi-

\* Trabalho realizado na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

\*\* Da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

dos epidemiologicamente na sua transmissão, esta determinação não é realizada — período de incubação relativamente longo, praticamente impedindo a análise pela ausência de restos alimentares disponíveis<sup>1,4,5,13</sup>.

Os vírus são veiculados passivamente pelos alimentos, sem se multiplicarem, pois são parasitos intracelulares obrigatórios, dependentes de célula viva para se expressarem biologicamente. Entretanto, as partículas virais presentes nos produtos alimentícios sofrem a influência de fatores que podem interferir com sua viabilidade: temperaturas altas, secagem, ação de soluções desinfetantes e de aditivos químicos, antagonistas microbianos, processos de lavagem relacionados à capacidade de aderência física em superfícies, principalmente dos vegetais, entre outros<sup>3,8,10</sup>.

A seleção dos microorganismos “índices” ou “indicadores” de contaminação de origem fecal é baseada em alguns parâmetros que incluem sua origem e procedência, presença constante na microbiota intestinal da população, não multiplicação e/ou dificuldade de adaptação e permanência no ambiente comum e determinação analítica simples, barata e relativamente rápida, de fácil interpretação e padronização. Neste contexto, *Escherichia coli*, coliformes de origem fecal e enterococos são os que apresentam maior importância, interesse, reprodutibilidade analítica e metodologia padronizada<sup>3,8</sup>. Entretanto, outras características devem ser avaliadas para que os indicadores assinalados sejam considerados absolutos. A resistência química e física das formas biológicas, por exemplo, pode diferir quando se comparam as bactérias entre si, com as partículas virais e com os agentes de infecções parasitárias. Assim, os dados de presença/ausência de bactérias de origem fecal em um produto alimentício não estão inquestionavelmente relacionados com a presença/ausência de agentes de infecções entéricas virais e parasitários<sup>3,5,6,8</sup>.

Os bacteriófagos de origem fecal estão associados a determinados grupos de bactérias entéricas. Suas características de resistência e permanência no meio ambiente e nos produtos alimentícios são mais próximas e semelhantes aos dos vírus entéricos. A determinação analítica dos bacteriófagos é simples, baseada na sua capacidade de infectar, se multiplicar e lisar células bacterianas hospedes específicas<sup>3,8,11,12,14</sup>. Dentre os bacteriófagos usados como indicadores, os colifagos, hospedeiros da *Escherichia coli*, são considerados por muitos autores como indicadores de qualidade da água potável, representando uma contaminação de origem fecal e possível presença de outros vírus entéricos. Considera-se, para tanto, a presença de *E. coli* e de seus fagos no trato intestinal das diferentes espécies de animais de sangue quente<sup>3,6,8,11,12,17</sup>. Outros fagos como os de *Shigella spp* e de *Samonella spp*, são também considerados de interesse<sup>9,14</sup>. Na França, tanto a pesquisa de colifagos como de shigelafagos

são determinações analíticas para a certificação da qualidade microbiológica da água<sup>14</sup>.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a presença de bacteriófagos de origem fecal (colifagos e shigelafagos) em amostras de produtos alimentícios coletadas durante ocorrência de surto de hepatite infecciosa, comparando os resultados com os obtidos de amostras coletadas em condição de normalidade (controles).

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de água: 304 amostras de controle, sendo 233 de poços cavados, 36 de nascentes, 31 de rede de distribuição pública e quatro de recreação (piscinas), 14 amostras de águas de município onde ocorria surto de hepatite infecciosa, sendo dez da rede de distribuição pública, não clorada e quatro de rio e lagoa. O número total de amostras de água analisada foi de 318.

Amostras de esgoto: nove amostras, coletadas na região da cidade de São Paulo.

Amostras de verduras cruas não lavadas: 268 amostras de controle, procedentes do CEASA/CEAGESP, cultivadas em cerca de dez diferentes municípios do Estado e oito procedentes do município onde ocorria o surto, cultivadas em hortas comunitária e particular. O número total de amostras de verduras analisadas foi de 276. Amostras de produtos alimentícios: 41, procedentes do município onde ocorria o surto, sendo 17 de leite cru não pasteurizado, 7 de produtos prontos para o consumo (sorvete, iogurte, pastel e doces de confeitaria) e 17 de pós para o preparo de alimentos destinados à alimentação escolar da maioria dos municípios brasileiros, cuja indústria fabricante está situada no município em questão. As amostras positivas destes pós para o preparo de alimentos foram analisadas também após o preparo, que foi realizado seguindo as instruções contidas no rótulo do produto.

Cepas receptoras de fagos: *E. coli* IP 5530 e *Shigella sonnei* IP 6310, ambas originárias da Coleção de Culturas do Instituto Pasteur de Paris, França, e mantidas liofilizadas pela Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz Central.

Metodologia de análise: Para a determinação de presença de bacteriófagos fecais em água, utilizou-se a metodologia descrita por Serres e col.<sup>14</sup>. Para a determinação nos demais produtos, utilizou-se o mesmo método, com as adaptações pertinentes no que se refere ao preparo da amostra para análise: enxaguadura das amostras de verduras em 100 ml de água peptonada tamponada e homogeneização de 25 g de cada um dos demais produtos em 225 ml de água peptonada tamponada. Foram retiradas alíquotas de 10 ml tanto do líquido de enxaguadura como do homogeneizado, para a determinação dos fagos de *E. coli* e *S. sonnei*. As etapas da metodologia utilizada incluem enriquecimento do possível fago pre-

sente, em meio de cultura contendo a cepa receptora específica, filtragem em membrana para a retirada das bactérias presentes (ou inativação térmica das bactérias em forma vegetativa) e observação de lise sobre cultura da cepa receptora específica sobre superfície de agar em placa.

Leitura dos resultados: Foram consideradas positivas para a presença de colifagos e/ou shigelafagos, as amostras que apresentavam lise completa das cepas receptoras. Em caso de lise incompleta e portanto duvidosa, procedeu-se à análise por microscopia eletrônica para a confirmação da presença dos fagos - visualização das partículas virais e sua relação com as células da bactéria receptora.

### RESULTADOS

Os resultados de presença/ausência de colifagos e shigelafagos encontrados estão expressos nas ta-

belas 1, 2 e 3. As tabelas 1 e 2 se referem às amostras - controle: verduras cruas não lavadas, procedentes do CEASA/CEAGESP (tabela 1) e amostras de água (tabela 2). A tabela 3 se refere aos resultados das amostras coletadas de município onde ocorria surto de hepatite infecciosa. Não constam de tabelas os resultados das duas amostras de pós para o preparo de alimento analisadas após preparo e cocção, que foram negativos, e os resultados das nove amostras de esgoto, que revelaram sete amostras positivas (77,78%) sendo que, das mesmas, todas revelaram a presença de colifagos (100%) e duas, a presença também de shigelafagos (28,57%). As figuras 1 e 2 são fotografias obtidas da confirmação positiva de resultados duvidosos em placas.

TABELA 1  
Incidência de bacteriófagos fecais (colifagos e shigelafagos) em amostras-controle de verduras cruas sem lavagem (coletadas em condições normais).

Tipo	Total de amostras	Negativas (%)	Positivas (%)*		
			Total	Colifagos	Shigelafagos
Alface	119	106 (89,08)	13 (10,92)	13 (100)	3 (23,08)
Escarola	54	50 (92,59)	4 (7,41)	4 (100)	2 (50,00)
Almeirão	58	52 (89,66)	6 (10,34)	6 (100)	3 (50,00)
Agrião	23	23 (100)	0 (0)	-	-
Rúcula	10	10 (100)	0 (0)	-	-
Acelga	2	2 (100)	0 (0)	-	-
Couve e Brócoli	2	2 (100)	0 (0)	-	-
Total	268	245 (91,42)	23 (8,58)	23 (100)	8 (34,78)

\* A porcentagem de colifagos e shigelafagos expressa se refere ao total das amostras positivas.

TABELA 2  
Incidência de bacteriófagos fecais (colifagos e shigelafagos) em amostras- controle de águas (coletadas em condição normal)

Origem	Total de amostras	Negativas (%)	Positivas (%)*		
			Total	Colifagos	Shigelafagos
Poço	233	220 (94,42)	13 (5,58)	13 (100)	13 (100)
Nascente	36	26 (72,22)	10 (27,78)	10 (100)	0 (0)
Rede	31	31 (100)	0 (0)	-	-
Recreação	4	4 (100)	0 (0)	-	-
Total	304	281 (92,43)	23 (7,57)	23 (100)	13 (56,52)

\* A porcentagem de colifagos e shigelafagos expressa se refere ao total das amostras positivas.

TABELA 3  
Incidência de bacteriófagos fecais (colifagos e shigelafagos) em amostras coletadas de município durante surto epidêmico de hepatite infecciosa.

Tipo	Total de amostras	Negativas (%)	Positivas (%)*		
			Total	Colifagos	Shigelafagos
Água **	14	7 (50,00)	7 (50,00)	3 (42,86)	7 (100)
Verduras ***	8	4 (50,00)	4 (50,00)	2 (50,00)	4 (100)
Leite cru	17	17 (100)	0 (0)	-	-
Alimento pronto ****	7	7 (100)	0 (0)	-	-
Pó para preparo *****	17	15 (88,24)	2 (11,76)	1 (50,00)	2 (100)
Total	63	50 (79,37)	13 (20,63)	6 (46,15)	13 (100)

\* A porcentagem de colifagos e shigelafagos expressa se refere ao total de amostras positivas.

\*\* Inclui água de rede (10 amostras - 50 % positivas) e de rio e lagoa (4 amostras, 2 positivas).

\*\*\* Inclui alface (2 amostras) e 1 amostras de cada dos seguintes: brócoli, escarola, almeirão, repolho, espinafre e couve.

\*\*\*\* Inclui sorvete, iogurte, pastel e doces de confeitaria.

\*\*\*\*\* Produtos destinados à merenda escolar (pós para o preparo de sopa, mingau e molho). Após o preparo conforme instruções contidas no rótulo, as amostras foram negativas para os bacteriófagos pesquisados.

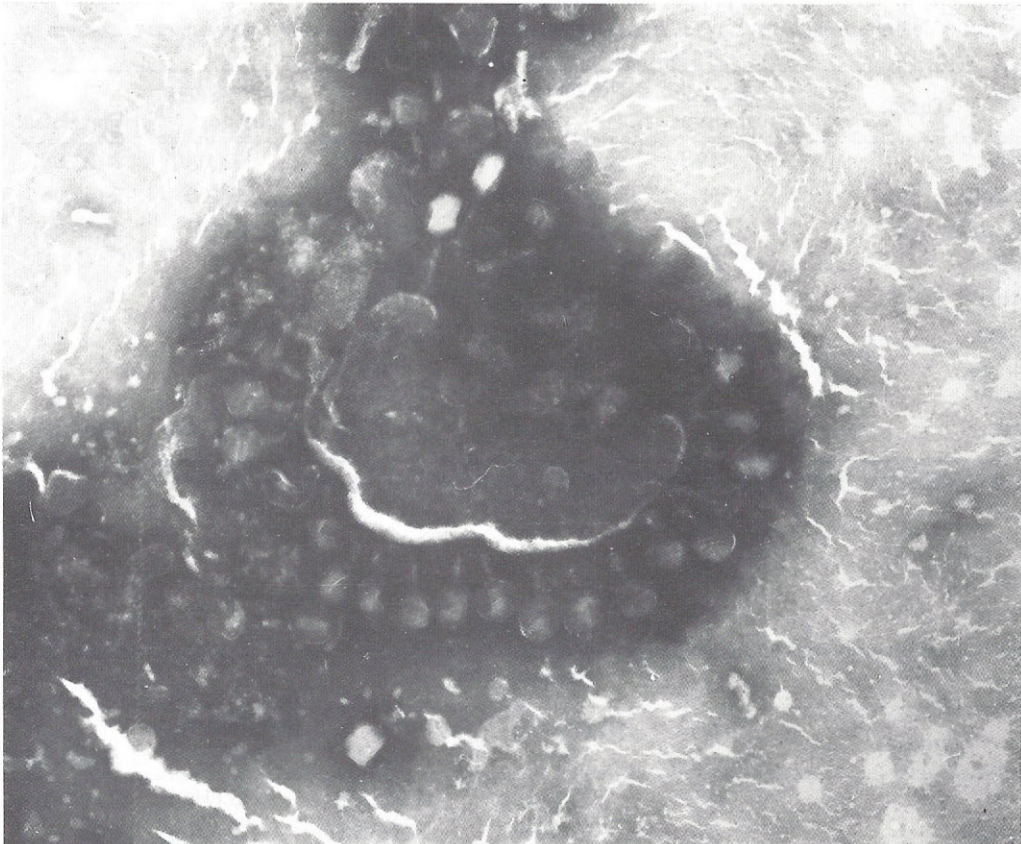


FIGURA 1

Microscopia eletrônica de shigelafagó

Técnica: impregnação pelo ácido fosfotungstico (coloração negativa).

Aumento: 12.000 vezes.

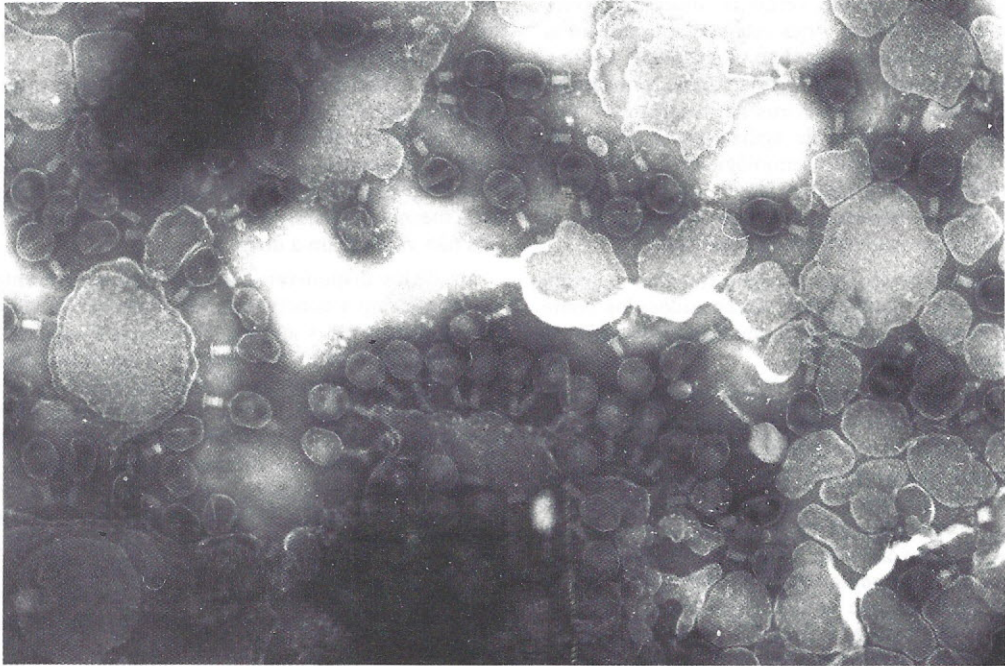


FIGURA 2

Microscopia eletrônica de colifagos.

Técnica: impregnação pelo ácido fosfotungstico (coloração negativa).

Aumento: 12.000 vezes.

#### *Interpretação dos Resultados*

A análise comparativa dos resultados expressos nas tabelas mostra diferença significativa entre a tabela 3 com as demais. A porcentagem da presença de fagos nas amostras coletadas em município que estava em situação epidêmica é maior (20,63%) do que nas amostras-controle respectivamente, 8,58% das verduras e 7,57% das águas). Se considerarmos somente as amostras de água de poço e nascente (não cloradas) e de verduras, contidas na tabela 3, esta diferença é ainda maior, ou seja, 50% das amostras procedentes do município em questão, são positivas para os fagos pesquisados. Os resultados destas determinações nos outros produtos alimentícios, contidos na tabela 3, não indicam veiculação significativa destes microorganismos.

É importante assinalar que as amostras de esgoto revelaram 77,78% de positividade, o que pode ser considerado uma condição de normalidade, pela origem e procedência fecal dos fagos.

No que se refere à incidência de colifagos e de shigelafagos, os resultados também diferem. A incidência de colifagos considerando somente as amostras positivas de verduras-controle, é de 100%, assim como nas de águas-controle (tabelas 1 e 2) e nas amostras de esgoto, sendo menor a incidência de shigelafagos - respectivamente 34,78%, 56,52% e 28,57%. Ao contrário, nas amostras coletadas no

município que se apresentava em situação epidêmica, a presença de colifagos é de 46,15%, enquanto os shigelafagos são prevalentes (100% das positivas). A exceção se refere às amostras-controle de água de poço, que, apesar de revelar incidência baixa de positividade (5,58%), em todas foi constatada a presença concomitante de colifagos e de shigelafagos, conforme tabela 2.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O papel dos fagos como indicadores de qualidade microbiológica é discutível. Alguns autores consideram que os mesmos são importantes, não só por sua origem fecal, mas sobretudo pela similaridade biológica com outros vírus entéricos patogênicos do homem. Assim, estes autores se referem principalmente à importância que os fagos podem ter na avaliação da qualidade e na indicação de risco à saúde pela água de consumo, incluindo a água mineral<sup>6,11,12,14,15,17</sup>. As verduras, considerando a água de irrigação e a possível aderência da partícula viral em sua superfície, são também consideradas. O papel de indicador de qualidade e risco que os fagos podem ter na avaliação de outros produtos alimentícios, por outro lado, é tema pouco explorado,<sup>8,9</sup> sendo que a maioria dos autores se referem especificamente aos vírus entéricos patogênicos e não a indicadores de sua presença,<sup>2,4,7,10,13,16</sup>. A im-

portância da água e das verduras consumidas cruas nas infecções entéricas virais está relacionada com as observações e dados da epidemiologia destes agentes. Entretanto, considerando as dificuldades para a determinação analítica destes vírus na maioria dos laboratórios, a necessidade de agilizar as atividades de Vigilância Sanitária e Epidemiológica e de buscar uma simplificação analítica, os fagos são considerados especialmente interessantes como microrganismos indicadores da avaliação destes produtos<sup>3,4,12</sup>.

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que os fagos fecais podem ser considerados como microrganismos indicadores importantes, conforme observações anteriores,<sup>12</sup>.

Ainda, indicam que a determinação tanto dos colifagos como dos shigelafagos é de interesse. A *E. coli* é uma bactéria entérica presente no intestino dos animais de sangue quente, como microbiota normal, sendo que a mesma e seus fagos têm relação direta com contaminação de origem fecal por qualquer destas espécies animais, incluindo o homem. Esta associação é diferente para *Shigella sonnei* e seus fagos, uma vez que esta bactéria é um patógeno exclusivo do homem e que seus fagos devem estar presentes predominantemente no intestino da população humana<sup>12</sup>. A prevalência dos shigelafagos nas amostras coletadas no município onde ocorria surto de hepatite infecciosa comparada à das amostras-controlé sugere que os mesmos têm importância na elucidação dos veículos de agentes virais humanos.

Os resultados obtidos das amostras de produtos alimentícios prontos para consumo são insuficientes

para concluir sobre a importância deste indicador microbiano para estes produtos. A presença de amostras positivas de pós para o preparo de alimentos assim como de verduras, atestam a distribuição dos fagos principalmente pela via hídrica, uma vez que a indústria e as hortas usavam água do município afetado. Entretanto, a ausência de surto de hepatite infecciosa em municípios que receberam produtos desta mesma indústria permite concluir que os mesmos não veicularam a doença.

Os dados disponíveis e os obtidos no presente trabalho levam à conclusão sobre a necessidade de levantamentos mais amplos e da complementação das observações aqui contidas, incluindo a determinação de fagos de outras bactérias entéricas patogênicas ao homem, como a *Salmonella spp.* A padronização metodológica para fins de comparação dos resultados entre os diferentes laboratórios, incluindo a definição dos receptores bacterianos específicos em função das características da lise das bactérias específicas é igualmente importante para o correto dimensionamento do significado dos bacteriófagos fecais para atividades de vigilância sanitária e epidemiológica de produtos alimentícios e água.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos funcionários da Seção de Meios de Cultura, da Seção de Coleção de Culturas e aos funcionários da Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz Central, pela colaboração prestada à realização deste trabalho.

---

GELLI, D. S. *et al.* - *Fecal bacteriophages in water, not washed and fresh green salads and other food products - Observation about its presence during infectious hepatitis outbreak and in normal condition.* *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 63-69, 1992.

**ABSTRACT:** This study shows results about phages occurrence (coliphages and shigellaphages) in 304 samples of drinking water, 9 of wastewater and 268 of not washed fresh green salads not related with viral human infections by enteric virus and in 41 samples of water, 8 of not washed green salad and 41 samples of others food products (17 raw milk, 17 powdered products and 7 ready-to-eat products), collected in a municipality of São Paulo during a infectious hepatitis outbreak. The percentage of phages positivity in the local where was occurring the outbreak was greater (20,63%) than the samples control (8,58% of green salad's samples and 7,57% of water's samples). Considering only well and spring water's samples (not chlorinated) and green salads, it is observed that the positivity is 50% among the outbreak's samples and 8,58% among the control samples. All (100%) of the control group positivies samples showed colophages and 53,38% shigellaphages. On the other hand, the samples related with the outbreak were 4615% positive for coliphages and 100% positives for shigellaphages. It is made some consideration about these results, discussing the role of fecal basteriophages as microbial indicator of fecal contamination and as indicator of others enteric virus' presence and its importance in the microbial evaluation of food products, including water.

**DESCRIPTORS:** *Coliphages and shigellaphages. Viral indicators of fecal contamination. Infectious hepatitis and bacteriophages.*

---

GELLI, D. S. & SOUZA, A. de - Bacteriófagos fecais em águas, verduras cruas não lavadas e outros produtos alimentícios: observações quanto ao seu achado durante surto de hepatite infecciosa e em condição normal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 52 (1/2): 63-69, 1992.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 16<sup>th</sup> ed., Washington, Amer. Pub. Health A., 1985, p. 946 - 974.
2. APPLETON, H.; PALMER, S. R. & GILBERT, R. J. - Foodborne gastroenteritis of unknown aetiology: a virus infection? *Brit. Med. J.*, 282: 1801 - 1802, 1981.
3. BANWART, G. J. - *Basic Food Microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1989, p. 89 - 92 e 274 - 278.
4. CLIVER, D. O.; ELLENDER, R. D. & SOBSEY, M. D. - Foodborne virus. In: SPECK, M. L. ed. - *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Amer. Pub. Health A., 1984. c. 39.
5. CLIVER, D. O.; O'NEILL, P. E. & KITCHENS, J. F. - Surveillance methods for viruses in foods. *Milk Food Technol.*, 32: 421 - 425, 1969.
6. DUTKA, B. J.; EL-SHAARAWI, A.; MARTINS, M. T. & SANCHES, P. S. - North and south American studies on the potential of coliphages as a water quality indicator. *Water Res.*, 21: 1127 - 1134, 1987.
7. EYLES, M. J.; DAVEY, C. R. & HUNTLEY, E. J. - Demonstration of viral contamination of oysters responsible for an outbreak of viral gastroenteritis. *J. Food Protect.*, 44: 294 - 296, 1984.
8. HARTMAN, P. A.; PETZEL, J. P. & KASPAR, C. W. - New methods for indicator microorganisms. In: PIERSON, M. D. & STERN, N. J. - *Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology*. New York, Marcel Dekker, 1986, p. 200 - 201.
9. KENNEDY JR., J. E.; OBLINGER, J. L. & BITTON, G. - Recovery of coliphage from chicken, pork sausage and delicatessen meats. *J. Foods Protect.*, 47: 623 - 626, 1984.
10. KONOWALCHUK, J. & SPEIRS, J. I. - Survival of enteric viruses on fresh vegetables. *J. Milk Food Technol.*, 38: 469 - 472, 1975.
11. KOTT, Y.; ROSE, N.; SPERBER, S. & BETZER, B. - Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Res.*, 8: 165 - 171, 174.
12. PEDRO, N. V.; KUSSUMI, T. A.; GELLI, D.S.; KAWANO, M. & SOUZA, A. - Aspectos higiênico-sanitários de águas de poços cavados em diferentes áreas socio-econômicas de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48: 21 - 27, 1988.
13. SANDERS, A. C.; BRYAN, F. L.; OLSON, J. C. & MADDEN, J. M. - Foodborne illness - suggested approaches for the analysis of foods and specimens obtained in outbreaks. In: SPECK, M. L. ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Amer. Pub. Health A., 1984. c. 38.
14. SERRES, L.; AMARIGLIO, A. & PETRANXIENNE, D. - *Contrôle de la Qualité des Produits Laitiers*. Analyse microbiologique et analyse sensorielle. 1er. Groupe P. Bacteriophages. Issy - les - Moulinaux, Ministère de l'Agriculture, 1973. Tome 2.
15. STETLER, R. E. - Coliphages as indicators of enteroviruses. *Appl. environ. Microbiol.*, 48: 668 - 670, 1984.
16. SULLIVAN, R.; PELLER, J. T.; TIERNEY, J. T. & LARKIN, E. P. - Examination of oysters for enteroviruses. In: *Bacteriological Analytical Manual*, 6th. ed. Association of Official Analytical Chemists, 1984. c. 20.
17. WENTSEL, R. S.; O'NEILL, P. E. & KITCHENS, J. F. - Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. *Appl. environ. Microbiol.*, 43: 430 - 434, 1982.

Recebido para publicação em 10 de agosto de 1991.

## A BACTERIOLOGIA DA TUBERCULOSE: ATIVIDADES DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ - SOROCABA - SP\*

Eny Aparecida Matheus da SILVA\*\*  
Daisy Nakamura SATO \*\*  
Maria Alice da Silva TELLES \*\*  
Irineu Zamboni\*\*\*  
Yara Solange Kubo FONSECA\*\*\*

RIALA 6/731

SILVA, E. A. M. e col. A Bacteriologia da tuberculose: Atividades do Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 52 (1/2): 71-76, 1992.

**RESUMO:** Com o objetivo de avaliar os métodos bacteriológicos para diagnóstico e controle de tratamento da tuberculose pulmonar, os autores analisaram os dados obtidos no período de 1980 - 1990, no Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba. A baciloscopia foi realizada em 26.803 amostras de escarro de 11.295 sintomáticos respiratórios, sendo examinada uma média de 2,34 amostras por pacientes. Pela baciloscopia 1.147 casos novos foram encontrados. No controle de tratamento 28.405 amostras foram examinadas com uma positividade de 41,12%. Neste período foram realizadas 21.134 culturas e obteve-se 3.634 culturas positivas no controle de tratamento e 1.902 no diagnóstico; 274 casos novos de tuberculose foram diagnosticados pela cultura. Das 5.536 culturas positivas, 5.431 cepas pertenciam ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium - intracellulare* e uma cepa identificada como *Mycobacterium szulgai*; 1.668 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foram submetidas ao teste de sensibilidade às drogas e o resultado foi de 16,53% de resistência entre os pacientes sem tratamento prévio e 47,45% entre os pacientes em tratamento. Os autores concluem pela necessidade de uma metodologia organizada e coerente com as condições de cada região, para que a bacteriologia seja importante suporte ao Programa de Controle da Tuberculose.

**DESCRITORES:** Tuberculose. Bacteriologia. Diagnóstico.

### INTRODUÇÃO

Há mais de cem anos, em 24 de março de 1882 precisamente, Robert Koch descobriu o agente da tuberculose. Em sua época, este ato produziu grandes expectativas de uma vitória sobre a doença e a esperança da redução do sofrimento físico, mental e dos problemas econômicos acarretados. Hoje, a Organização Mundial da Saúde<sup>1</sup> estima que ocorrem no mundo, por ano, aproximadamente oito milhões de casos de tuberculose com cerca de três milhões de mortes. Existem quinze milhões de doentes, sendo que a metade destes casos são altamente

infecciosos<sup>5</sup>, e a maioria está localizada nos países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento.

Diante das dificuldades para atingir o desenvolvimento sócio-econômico, resta a esses países ainda afligidos pela tuberculose, redobrar esforços para tornar acessíveis medidas específicas para controlar a tuberculose com mais eficácia e com menor custo possível. Esses esforços da Organização Mundial da Saúde<sup>8,9</sup>, tomaram forma de um programa de controle através da integração dos serviços gerais da saúde na luta contra a tuberculose. Em tais programas a busca de casos representa o ponto de partida e a bacteriologia sua ferramenta principal<sup>6</sup>.

\* Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz — Laboratório I de Sorocaba.

\*\* Pesquisadores Científicos do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Biologistas do Instituto Adolfo Lutz.



A bacteriologia permite identificar os bacilíferos responsáveis pela cadeia infecciosa da tuberculose e encaminhá-los para o tratamento adequado. O fato de os casos com exame direto positivo serem aqueles que estão mais enfermos, que têm a maior probabilidade de morrer se não tratados, assim como disseminar a infecção, orienta as metas para os programas de controle e a utilização adequada dos recursos.

Diante do exposto, os autores avaliam as atividades da bacteriologia da tuberculose, na período de 1980-1990, em Sorocaba, São Paulo.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

No período de 1980-1990 foram examinadas no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba, 57.539 amostras de escarro provenientes de indivíduos adultos e sintomáticos atendidos nos Centros de Saúde e Hospitais da região, para diagnóstico ou controle de tratamento da tuberculose pulmonar.

A região de Sorocaba está situada na região sudeste do Estado de São Paulo e tem uma população de 2.023.330 habitantes. É uma região sócio-econômica de nível médio, cuja economia baseia-se principalmente na agropecuária. Atualmente, uma franca zona industrial se desenvolve na cidade sede da região que é Sorocaba.

O atendimento médico é oferecido à população pelo Estado, através do Sistema Único de Saúde de maneira municipalizada, guardando uma hierarquia quanto às atividades de saúde. Gerenciando essas atividades estão os Escritórios Regionais de Saúde (ERSA), sendo que o Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba, fornece o suporte laboratorial para as Vigilâncias Sanitária e Epidemiológica da região.

Neste período, foram examinadas 26.803 amostras para o diagnóstico de 11.295 sintomáticos respiratórios, 28.405 amostras de pacientes em tratamento e 2.331 amostras sem informação quanto ao diagnóstico ou controle de tratamento.

A metodologia utilizada para baciloscopia, cultura, identificação e teste de sensibilidade, seguiu as normas internacionais preconizadas<sup>2,3</sup>.

A baciloscopia foi realizada rotineiramente em todas as amostras pelos métodos de Ziehl-Neelsen e fluorescência, sendo que os resultados assinalados para fins de padronização de metodologia são os da técnica de Ziehl-Neelsen.

A cultura foi realizada, no diagnóstico, em todas as amostras com quantidade suficiente, após a realização da baciloscopia, enquanto que no controle de tratamento a realização das mesmas estava condicionada à solicitação médica. Todas

as culturas positivas foram identificadas através das características culturais, pigmentação das colônias e provas bioquímicas.

Os testes de sensibilidade às principais drogas antituberculosas, isonizadas, rifampicina, pirazinamida, estreptomicina e etambutol, foram realizados em 254 culturas isoladas de pacientes sem tratamento prévio e de 1.414 pacientes durante o tratamento, se os mesmos apresentassem resposta terapêutica desfavorável com bacteriologia positiva após o terceiro mês de tratamento.

#### RESULTADOS

Das 57.539 amostras de escarro examinadas pela baciloscopia, obteve-se 1.714 amostras positivas para o diagnóstico, 11.682 amostras positivas no controle de tratamento e 265 amostras positivas sem informação quanto ao diagnóstico ou controle de tratamento. Na tabela 1, tem-se as variações anuais destes resultados.

As 26.803 amostras de escarro provenientes de 11.295 sintomáticos respiratórios apresentaram positividade de 15,17% correspondendo a 1.147 (10,15%) casos novos de tuberculose positivos à baciloscopia. A média de amostras examinadas por paciente foi de 2,37.

As 28.405 amostras de escarro de pacientes em tratamento apresentaram 11.682 (41,12%) amostras positivas ao exame direto.

Das 13.392 amostras submetidas à cultura do diagnóstico 1.902 foram positivas, sendo que, 274 (2,42%) casos foram diagnosticados apenas pela cultura, isto é, apresentaram baciloscopia negativa e cultura positiva (tabela 2).

Das 7.742 culturas realizadas com amostras de escarro provenientes de pacientes em tratamento, 3.634 (49,93%) apresentaram resultados positivos.

No período estudado, 5.536 culturas positivas foram identificadas, resultando 5.531 cepas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, quatro ao complexo *Mycobacterium avium - intracellulare* e uma cepa ao *Mycobacterium szulgai* (tabela 3).

As 1.668 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* submetidas ao teste de sensibilidade às drogas apresentaram os seguintes resultados: em 254 cepas isoladas de pacientes sem tratamento prévio 42 (16,53%) apresentaram resistência e em 1.414 cepas isoladas de pacientes em tratamento foi encontrado resistência em 671 (47,45%) cepas.

As resistências isoladas para cada droga e para as principais associações de drogas constam na tabela 4.

TABELA 1  
 Exames baciloscópicos realizados no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba, São Paulo, no período de 1980 a 1990.

Ano	Diagnóstico		Controle de Tratamento		Sem Informação*		Total de Amostras Analisadas
	Amostras Analisadas	Amostras Positivas	Amostras Analisadas	Amostras Positivas	Amostras Analisadas	Amostras Positivas	
1980	3460	117	3368	916	182	07	7010
1981	3932	152	3252	1112	194	18	7378
1982	4004	196	4097	1648	177	19	8278
1983	4098	170	3989	1804	133	09	8220
1984	2727	150	3481	1650	127	08	6335
1985	2251	217	2556	980	172	17	4979
1986	1687	140	2102	876	165	17	3954
1987	1153	78	1468	647	170	13	2791
1988	1214	98	1625	812	269	32	3108
1989	986	137	1450	816	427	61	2863
1990	1291	259	1017	421	315	64	2623
TOTAL	26803	1714	28405	11682	2331	265	57539

\* Sem informação quanto ao diagnóstico ou controle de tratamento.

Fonte: Dados de relatório estatístico do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba - S.P.

TABELA 2  
 Número e porcentagem de casos novos de tuberculose diagnosticados pela baciloscopia e cultura, no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba, no período de 1980-1990.

Ano	Sintomáticos Respiratórios	Resultados Obtidos				Total de Casos Novos	
		Baciloscopias Positivas		Culturas Positivas		nº	%
		nº	%	nº	%		
1980	1058	75	7,09	12	0,57	87	8,22
1981	1350	95	7,04	25	1,12	120	8,89
1982	1273	124	9,74	09	0,39	133	10,45
1983	1222	116	9,49	34	1,48	150	12,27
1984	1319	105	7,96	44	2,72	149	11,30
1985	1312	132	10,06	27	2,04	159	12,12
1986	1003	84	8,37	22	1,85	106	10,57
1987	718	62	8,63	28	3,09	90	12,53
1988	742	67	9,03	31	4,18	98	13,21
1989	499	91	18,24	16	3,20	107	21,44
1990	799	196	24,53	26	3,25	222	27,78
TOTAL	11295	1147*	10,15	274**	2,42	1421	12,58

\* Casos novos diagnosticados pela baciloscopia.

\*\* Casos novos diagnosticados apenas pela cultura.

Fonte: Dados registrados do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba - São Paulo.

TABELA 3  
 Culturas realizadas e identificadas no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba  
 São Paulo, no período de 1980 a 1990.

Ano	Diagnóstico		Controle de Tratamento		Total de Culturas Positivas	Total de Culturas Identificadas como <i>M. Tuberculosis</i>	MOTT*
	Amostras Analisadas	Amostras Positivas	Amostras Analisadas	Amostras Positivas			
1980	1311	112	1077	328	440	440	-
1981	1053	173	887	398	571	570	1(a)
1982	1322	190	803	316	506	506	-
1983	1936	210	1054	541	751	751	-
1984	1445	182	911	504	686	686	-
1985	1228	149	592	301	450	450	-
1986	1348	244	621	257	501	501	-
1987	912	115	535	310	425	425	-
1988	940	117	519	280	397	396	1 (b)
1989	802	162	515	292	454	454	-
1990	1095	248	228	107	355	352	3 (a)
Total	13392	1902	7742	3634	5536	5531	5

\* MOTT - Mycobacteria other than *M. tuberculosis* (Micobactérias outras que não o *M. tuberculosis*):

a) *M. avium-intracellulare*

b) *M. szulgai*

Fonte: Dados de registros do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba - São Paulo.

TABELA 4  
Resistência inicial e adquirida, Estado de São Paulo, janeiro de 1986 a julho de 1990.

Drogas	Resistência Inicial		Resistência Adquirida	
	nº	%	nº	%
INH	7	2,76	98	6,93
RFP	2	0,79	21	1,49
PZA	1	0,39	22	1,56
EMB	0	0,00	5	0,35
SM	11	4,33	49	3,47
INH+RFP	7	2,76	119	8,42
INH+SM	5	1,96	104	7,35
INH+PZA	1	0,39	31	2,19
INH+EMB	0	0,00	5	0,35
PZA+SM	1	0,39	12	0,84
PZA+EMB	0	0,00	2	0,14
SM+EMB	0	0,00	1	0,07
RFP+SM+PZA	1	0,39	13	0,91
INH+RFP+EMB	1	0,39	14	0,99
INH+RFP+SM	4	1,57	107	7,56
INH+RFP+PZA	1	0,39	32	2,26
INH+RFP+SM+PZA	0	0,00	14	0,99
INH+RFP+SM+EMB	0	0,00	13	0,92
INH+RFP+SM+EMB+PZA	0	0,00	9	0,63
TOTAL DE CEPAS RESISTENTES	42	16,54	671	47,45

Obs: Números de cepas estudadas: 254 para resistência inicial  
1414 para resistência adquirida

INH = isoniazida; RFP = rifampicina; PZA = pirazinamida;  
SM = estreptomicina e EMB = etambutol.

#### DISCUSSÃO

A baciloscopia é o método de escolha para o diagnóstico da tuberculose em regiões de alta incidência como a de Sorocaba. É um método simples, rápido, econômico e confiável. A álcool-ácido resistência característica das micobactérias é o fundamento do método de coloração, por isso a especificidade da baciloscopia no diagnóstico da tuberculose, se não é absoluta, entretanto, aproxima-se de 100% em regiões de baixa incidência de micobacterioses.

Outra limitação do exame direto é a sensibilidade, uma vez que cerca de  $10^5$  bacilos por mililitro de escarro são necessários para que a probabilidade do exame positivo seja de 100%. Esta observação justifica o fato de as formas primária e menos avançadas de tuberculose pulmonar, geralmente não serem detectadas por este método<sup>4,7</sup>.

Apesar destas limitações, em nossos estudos a baciloscopia constituiu uma arma importante no diagnóstico

da tuberculose pulmonar. A variação da positividade ocorreu devido a alterações no atendimento médico à população, neste período, sendo que nos últimos anos, houve um aumento de casos diagnosticados, graças à descentralização dos serviços de saúde e conseqüente melhoria no atendimento.

Ao analisarmos a cultura verificamos que a mesma proporcionou um acréscimo de 2,42% em relação ao total de casos diagnosticados, equivalente a um rendimento de 19,28% se considerarmos o total de pacientes diagnosticados (tabela 2).

O acréscimo na descoberta de casos fornecido pela cultura mostrou-se significativo, evidenciando a necessidade da realização da cultura no momento do diagnóstico, principalmente nas formas iniciais da doença.

Além do exposto, a realização da cultura permite o isolamento e identificação do *Mycobacterium tuberculosis* e de outras micobactérias, possibilitando a diferenciação entre tuberculose e as micobacte-

riosos, que são doenças causadas por outras micobactérias que não a *Mycobacterium tuberculosis*. Nosso serviço registrou quatro casos de infecções pulmonares causadas pelo *Mycobacterium avium - intracellulare* e um caso devido ao *Mycobacterium szulgai*.

Os resultados de resistência obtidos com a realização de testes de sensibilidade às drogas foram importantes na avaliação do tratamento e dos esquemas terapêuticos utilizados, e constituem importantes parâmetros epidemiológicos na organização do Programa de Controle da Tuberculose.

Ao analisar os dados obtidos neste período, os autores ressaltaram a importância de uma metodologia organizada, sistemática e coerente com a realidade de cada região para que um fiel dimen-

sionamento do problema auxilie a adoção de estratégias no combate à tuberculose.

A avaliação destes dados nada tem de original nos locais que desenvolvem uma metodologia completa no diagnóstico bacteriológico da tuberculose, o que é raro entre nós. Continuamos a frisar a importância da baciloscopia, no Programa de Controle da Tuberculose, identificando as formas infectantes responsáveis pela cadeia infecciosa da doença. Com a descentralização das atividades de saúde o número de exames diminuiu, a positividade aumentou e vem crescendo em todo mundo, no Brasil e também em nossa região, quem sabe pelos aspectos sociais da doença.

SILVA, E. A. M. *et al.* - Tuberculosis bacteriology: activities of Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 52 (1/2): 71-76, 1992.

**ABSTRACT:** This study was made to evaluate the bacteriological methods used for the diagnosis and the treatment of pulmonary tuberculosis. The data were obtained by Instituto Adolfo Lutz Sorocaba in the period of 1980-1990. The direct microscopical examination was made in 26803 sputum samples from 11206 respiratory sintomatics. It was examined an average of 2.34 samples per patient. 1147 new cases were discovered by microscopical examination. To the treatment control 28405 samples were obtained from patients in treatment and 1902 in the diagnosis. 274 new cases of pulmonary tuberculosis were diagnosed by the culture only. From the 5563 positive cultures, 5431 strains belonged to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, 4 to the *Mycobacterium avium - intracellulare* complex and one was identified as *Mycobacterium szulgai*. The sensibility test to the antituberculosis drugs was performed in 1668 strains of *Mycobacterium tuberculosis*. It was found resistant strains in 16,53% of patients with no previous treatment and in 47,45% of patients in treatment. The authors concluded that it is important to have an organized and appropriated methodology of tuberculosis diagnosis in each region. In this case, the bacteriological methods would be of important help to the Tuberculosis Control Program.

**DESCRIPTORS:** Tuberculosis. Bacteriology. Diagnosis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRE, P.; TEN DAM, G.; CHAM, C. & KOCHI, A. - *Tuberculosis in the present time: a global overview of the tuberculosis situation*. Geneva. WHO/TVB, 1991. p. 91 - 158.
2. DAVID, H. L. & MEYER, L. - *Micobacteriologie em Santé Publique*. Centre National de Reference pour la Tuberculose et les Mycobacteries. Paris, Institute Pasteur, 1980.
3. KANTOR, I. N. - *Bacteriologia de la tuberculosis humana e animal*. Martinez, Centro Panamericano de Zoonoses, 1988. (Serie de Monografias Cientifica y técnicas 11/Rev.I).
4. KANTOR, I. N. - *Nuevos metodos diagnósticos en tuberculosis*. *Bol. Informat. Colabat.* 7: 18 - 20 1991.
5. MURZY, C. J. L.; STYBLO, K. & ROUILLON, A. - *Tuberculosis en los paises em desarrollo: magnitud, intervenciones e costo*. *Bull. int. Un. Tuberc. Enf. Resp.* 65: 6 - 26, 1990.
6. ORGANIZATION Panamericana de la Salud / OMS - *Controle de Tuberculosis em America Latina*. Manual de Normas y Procedimientos para Programa Integrado. Washington D. C., OMS, 1979. (Publ. Cient. 376).
7. TOMAN, K. - *Tuberculosis. Detection de casos y Quimioterapia. Preguntas y respuestas*. Washington D.C., Organization Panamericana de la Salud, 1980. (Publ. Cient. 392).
8. WORLD Health Organization - *Informe del Comité de Expertos en Tuberculosis*. Washington D.C., WHO, 1964. (Serie de Informes Técnicos, 290).
9. WORLD Health Organization - *Informe del Comité de Expertos en Tuberculosis*. Washington D. C., WHO, 1974. (Serie de Informes Técnicos, 552).

Recebido para publicação 11 de setembro de 1992.

## AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NA DETECÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE SOJA EM MISTURAS LÁCTEAS\*

Neusa Vitória V. SILVEIRA \*\*  
Maria Auxiliadora de B. RODAS \*\*  
Sabria AUED - PIMENTEL \*\*  
Jacira Hiroco SARUWTARI \*\*

RIALA6/732

SILVEIRA, N. V. V. e col. - Avaliação de parâmetros físico-químicos na detecção do extrato solúvel de soja em misturas lácteas. *Rev. Inst. A. Lutz*, 52 (1/2): 77-81, 1992.

**RESUMO:** Foram estudadas as composições centesimais e os perfis cromatográficos dos ácidos graxos das gorduras de extrato solúvel de soja, de leite em pó integral e de suas misturas, nas proporções de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 gramas do extrato solúvel de soja para completar 100 gramas da mistura, com o leite em pó integral. A finalidade deste trabalho foi avaliar a possível aplicação na determinação do extrato solúvel de soja em misturas lácteas. Pela análise da composição centesimal pôde-se detectar a presença do extrato solúvel de soja nas misturas a partir de dez por cento, que revela um aumento de proteínas e diminuição de gordura e carboidratos. Em relação à análise dos ácidos graxos, somente a partir de 20 por cento de adição do extrato solúvel de soja às misturas padrão, pôde-se verificar a presença do extrato de soja, principalmente, pelo aumento do teor do ácido linoléico apresentado.

**DESCRITORES:** Extrato solúvel de soja em misturas lácteas, avaliação. Parâmetros físico-químicos para detecção do extrato solúvel de soja em misturas lácteas.

### INTRODUÇÃO

Os técnicos dos órgãos responsáveis pela aquisição de produtos lácteos destinados à merenda escolar, fazem a avaliação dos mesmos comparando as formulações apresentadas pelos produtores com os resultados dos laudos analíticos fornecidos pelos laboratórios oficiais das amostras correspondentes. Esses dados vão orientar os nutricionistas na confecção dos cardápios destinados à merenda escolar. As análises feitas em laboratórios oficiais exigem cuidados para escolha dos métodos utilizados, pois se destinam a detectar e prevenir fraudes contra a saúde pública e a economia popular<sup>15</sup>.

Para detectar a presença do extrato solúvel de soja em misturas lácteas, já foram estudados muitos métodos: pela identificação e quantificação de proteína de origem animal e vegetal, através do perfil cromatográfico dos seus aminoácidos; por métodos imunológicos e eletroforéticos<sup>7, 11, 13</sup>.

Nos últimos anos, tem sido crescente o emprego da soja e seus derivados na formulação de produtos para a alimentação humana. A soja pode oferecer proteína de boa qualidade e a sua adequação à saúde é possível quando o produto tem uma formulação balanceada em alimentos processados. O extrato de soja oferecido com a complementação de aminoácidos essenciais, vai fornecer o nitrogênio necessário para crianças em idade escolar e para adultos carentes desses nutrientes. É um alimento também indicado como alternativa do leite nas dietas nutricionais para indivíduos com intolerância à lactose<sup>2, 8, 12, 16, 18</sup>.

É certo que a adição do extrato de soja à mistura láctea, em substituição ao leite em pó, é financeiramente um atrativo. A sua presença é permitida em vários produtos lácteos, desde que seja declarada nas suas formulações, quando se

\* Realizado nas Seções de Laticínios e de Cromatografia Gasosa do Instituto Adolfo Lutz, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

tratar de merenda escolar. E, na rotulagem, nos demais casos<sup>3, 5, 14</sup>.

A proposta deste trabalho é avaliar parâmetros para detectar extrato solúvel de soja em alimento lácteo, pelo estudo da composição centesimal e comparação dos perfis cromatográficos dos ácidos graxos, das gorduras do extrato solúvel de soja desidratado, leite em pó integral, como padrões e as misturas dos mesmos, em quantidades conhecidas.

#### MATERIAL E MÉTODO

Foram preparadas misturas padrão de leite de vaca em pó integral com extrato solúvel de soja puro. O extrato solúvel de soja, nas misturas, encontrava-se nas seguintes proporções: 00, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 por cento, correspondendo a numeração das amostras, respectivamente do número 1 ao número 11.

As composições centesimais foram determinadas em todas as amostras de leite em pó integral do extrato solúvel de soja e das suas misturas, segundo os métodos indicados nas *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz para alimentos*<sup>9</sup>.

Os ácidos graxos, presentes na gordura extraída das amostras pelo método de Soxhlet, foram determinados pela cromatografia em fase gasosa. Os ésteres dos ácidos graxos e o glicerol foram transformados em metil ésteres, segundo metodologia descrita nas *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*<sup>9</sup>. Utilizou-se um cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama, de marca CG - modelo 500. Para a separação dos metil ésteres dos ácidos graxos, foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida, de 25 cm de comprimento, tendo um filme de polietileno glicol (PEG), como fase estacionária. Foram obedecidas as seguintes condições de operação: temperatura programada de coluna: 60 a 260°C; velocidade de programação: 10°C/minuto; temperatura do injetor e do detector: 260°C; gás de arraste: hidrogênio, com fluxo aproximado de 0,8 ml/minuto. Os ácidos graxos foram identificados através de seus padrões de ésteres metílicos e a quantificação feita por normalização de área através de um integrador, marca CG - modelo 300.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na tabela 1, encontram-se relacionados os dados da composição centesimal e, na tabela 2, as porcentagens dos ácidos graxos das amostras analisadas.

Os resultados apresentados nas análises das composições centesimais das misturas padrão, indicados na tabela 1, mostram que na proporção que aumenta a quantidade de extrato solúvel de soja adicionado ao leite em pó integral, aumentam os teores de proteínas e diminuem consideravelmente os teores de gordura e glicídios. Segundo dados da literatura, o extrato de soja contém mais proteínas e menos gordura e carboidratos do que o leite em pó integral<sup>4, 10, 14</sup>.

A partir de 10% de extrato solúvel de soja adicionado, é possível observar uma discrepância nos valores normais daqueles constituintes do leite em pó integral<sup>10</sup>. Entretanto, considera-se que não há nada que comprove a presença do extrato solúvel de soja nas misturas padrão.

avaliando o perfil cromatográfico dos ácidos graxos apresentados pelas amostras puras e suas misturas, observou-se que a porcentagem obtida para o ácido linonéico mostrou ser o parâmetro mais sensível na indicação da presença do extrato de soja (tabela 2). Isto porque a gordura de soja contém altos teores daquele ácido graxo, maior que 45%<sup>6</sup>, enquanto que na gordura de leite de vaca, os teores são mais baixos, inferiores a 5% (tabela 3). Com relação aos outros ácidos graxos, o cáprico, caprótico, caprílico, mirístico, palmítico, láurico, a presença do adulterante só é observável para níveis de adição superiores a 60%, devido à ampla faixa de variação daqueles ácidos graxos, na gordura do leite de vaca<sup>1, 17</sup>. Para baixos níveis de adição, os valores desses ácidos graxos situaram-se dentro da faixa característica da gordura do leite da vaca. A partir de 20% de adição de extrato solúvel de soja as misturas padrão, o teor de ácido linoléico situa-se bastante acima do limite normalmente encontrado na gordura do leite em pó<sup>1, 17</sup>.

O estudo da composição em ácidos graxos não pode ser considerado decisivo na avaliação da presença do extrato solúvel de soja no leite em pó integral, visto que apenas um, dentre os vários ácidos graxos, apresentou seus valores normais alterados, e só ocorrendo para adições superiores a 20%.

Do estudo realizado, conclui-se que a partir da composição centesimal das amostras estudadas, percebe-se a presença do extrato solúvel de soja com 10%, no mínimo, de adição. A partir do perfil cromatográfico dos ácidos graxos, pelo teor do ácido linoléico, tem-se a indicação da presença do extrato solúvel de soja com 20%, no mínimo, de adição.

TABELA 1

Composição centesimal obtida para o leite em pó integral, misturas de leite em pó integral com extrato solúvel de soja e para o extrato solúvel de soja puro (%PP).

Amostras N <sup>o</sup>	L.P.I.*	Misturas de leite em pó integral com extrato solúvel de soja										E.S.S.**
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
Determinações	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	00%	
Umidade	2,8	2,9	3,0	3,0	3,0	3,2	2,9	3,3	3,3	3,1	3,1	
Cinzas	5,7	5,7	6,0	5,5	5,3	5,3	5,5	5,4	5,4	5,6	5,5	
Gordura	27,0	27,5	26,1	25,0	24,8	24,3	23,3	21,6	21,6	21,6	22,1	
Proteína	-27,2	30,4	32,9	34,2	36,9	37,0	39,4	43,2	43,2	47,5	51,9	
Glicídios	37,3	33,5	32,0	32,3	30,0	30,2	28,9	26,5	23,0	22,2	17,4	

TABELA 2

Composição de ácidos graxos de gordura de leite em pó integral, misturas de leite em pó integral com extrato de soja e de extrato solúvel de soja puro (%P/P de metil ésteres).

Amostras N <sup>o</sup>	L.P.I.*	Misturas de leite em pó integral com extrato solúvel de soja										E.S.S.**
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
Determinações	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	00%	
Ácido butírico (C 4:0)	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Caprótico (C 6:0)	2,6	1,8	1,9	0,7	1,7	0,7	1,0	1,1	0,4	-	-	-
Ácido Caprílico (C 8:0)	1,6	1,2	1,3	1,0	1,2	0,7	0,5	-	-	-	-	-
Ácido cáprico (C 10:0)	3,9	2,4	2,4	2,1	2,2	1,2	1,1	0,8	0,5	-	-	-
Ácido Láurico (C 12:0)	2,9	2,7	2,7	2,5	2,4	1,6	1,4	0,9	0,6	-	-	-
Ácido Mirístico (C 14:0)	10,5	11,0	10,2	9,7	8,7	6,4	5,8	4,1	2,9	1,2	-	-
Ácido Miristoléico (C 14:1)	0,9	1,2	1,1	1,1	0,9	0,8	0,5	0,4	-	-	-	-
C15	1,6	1,4	1,2	1,2	1,2	1,0	1,4	0,9	0,4	-	-	-
Ácido Palmítico (C 16:0)	27,2	30,6	29,1	28,9	26,9	24,1	24,7	22,0	16,7	15,0	12,6	
Ácido Palmitoléico (C 16:1)	3,6	1,8	1,7	2,2	1,5	1,3	1,1	0,8	0,6	-	-	-
C17	1,5	1,0	0,8	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Estearico (C 18:0)	12,4	11,7	10,5	9,5	9,5	8,8	8,5	7,8	6,4	5,1	4,1	
Ácido Oléico (C 18:1)	21,2	26,1	25,1	26,1	25,0	24,5	24,3	24,0	22,2	23,7	18,3	
Ácido Linoléico (C 18:2)	4,7	4,9	9,8	12,2	15,5	19,8	23,5	26,5	36,1	44,8	46,9	
Ácido Linolénico (C 18:3)	0,7	0,9	1,5	1,3	1,3	1,9	2,2	2,7	4,1	6,1	8,1	

\* L.P.I. = Leite em pó integral

\*\* E.S.S. = Extrato solúvel de soja puro



TABELA 3

Composição em Ácidos Graxos da Gordura de Leite de Vaca e de Óleo de Soja (% P/P de Metil Ésteres).  
Dados Obtidos da Literatura<sup>1,6,17</sup>.

Ácidos Graxos	Ácidos Butírico	Ácido Capróico	Ácido Cáprilico	Ácido Cáprico	Ácido Caprícol-éico	Ácido Láurico	Ácido Lauro-leico	Ácido Mirístico	Ácido Miris-léico	C <sub>15</sub>	Ácido Palmi-tico	Ácido Palmi-léico	C <sub>17</sub>	Ácido Esteárico	Ácido Oléico	Ácido Lino-léico	Ácido Araqui-dico	Ácido Lino-lênico
Gordura de leite de Vaca	0,4 a	0,6 a	0,2 a	1,2 a	tr*	1,9 a	tr*	6,3 a	0,5 a	0,5 a	22,6 a	1,1 a	0,3 a	4,5 a	16,7 a	0,3 a	tr*	0,3 a
Gordura de leite de Vaca	2,6	3,4	4,7	5,2		6,1		20,8	3,0	1,7	41,6	3,9	1,0	19,6	38,8	2,2		2,2
Gordura de leite de Vaca	3,0 a	1,5 a	0,5 a	1,0 a	—	2,5 a	—	8,0 a	—	—	25,0 a	—	—	8,0 a	30,0 a	4,0 a	0,4 a	—
Óleo de soja	4,0	3,0	2,0	3,5	—	5,0	—	11,0	—	—	29,0	—	—	13,0	40,0	5,0	1,0	—
	—	—	—	—	—	—	—	<0,5	—	—	7,0 a	<0,5	—	2,0 a	19,0 a	48,0 a	<1,0	4,0 a
											12,0			5,5	30,0	58,0		10,0

\* tr = traços

SILVEIRA, N. V. V. *et al.* - Evaluation of physical-chemical parameters for detection of soy soluble extract in lacteous mixture. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 77-81, 1992.

ABSTRACT: Studies were performed on centesimal composition and chromatographic profiles of fatty acids drawn out from soy soluble extract fat derived, from whole milk powder and from their mixtures in the proportions of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 grams of the soy extracts to complete 100 grams of the mixtures with the whole milk powder. The purpose was to evaluate the possible presence of soy soluble extract in milk mixture. From the analysis of the centesimal composition the presence of the soy soluble extract can be detected in mixture starting from 10 per cent, which shows a protein increasing and fat and carbohydrate decrease. Regarding the detection of soy soluble extract through the analysis of fatty acids, safe results should only be considered if soy soluble extract presence is superior to 20%, specially by the evaluation of the linoleic acid content.

DESCRIPTORS: Soy soluble extract in lacteous mixture. Lacteous mixture evaluation. Physical-chemical parameters for detection of soy soluble extract in lacteous mixture.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BADOLATO, E. S. G.; DURANTE, F. & ALMEIDA, M. E. W. - Composição dos ácidos graxos do leite de vaca de diferentes raças. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. São Paulo, 39 (2): 127 - 35, 1979.
2. BEER, W. H.; MURRAY, E.; OH, S.; PEDERSEN, H. E.; WOLFE, R. W. & YOUNG, V. R. - A long-term metabolic study to asses the nutritional value of and immunological tolerance to two soy-protein concentrates in adult humans. *Amer. J. Clin. Nutr.* 50 (5): 997 - 1007, 1989.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Lei 8.078 de 11 de setembro de 1990. *Diário Oficial*, Brasília, 12 set. 1990. Seção I (supl.) p. 1 - 12.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução n.º 27/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 28 jun. 1978. Seção I, pt. I, p. 12.236.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução n.º 14/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 28 jun. 1978. Seção I, pt. I, p. 9896 - 9.
6. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - *Codex standards for edible fats and oils*. Rome FAO/WHO, 1982. (CAC - vol. 11).
7. ELDRIDGE, A. C. - Determination of soy protein in processed foods. *J. Amer. Oil chem. Soc.* 58 (3): 483 - 5, 1981.
8. ERDMAN JR, J. W. & FORDICE E. J. - Soy products and the human det. *Amer. J. Clin. Nutr.* 49 (5): 725 - 37, 1989.
9. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985. v. 1. p. 21, 27, 42, 44, 266.
10. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - *Tabelas de Composição de Alimentos*. 3ª ed. Rio de Janeiro, IBGE, 1985. (Estudo Nacional de Despesa Familiar) t. 1, p. 112.
11. KUMAGAI, E. A.; SETINA, M. L. & AMAYA-FARFÁN, J. - Análise de qualidade de misturas protéicas pelo aminograma característico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 6 (2): 121 - 34, 1986.
12. LIENER, I. E. - Factors affecting the nutritional quality of soy products. *J. Amer. Oil. chem. Soc.* 58 (3): 40 - 15, 1981.
13. OLSMAN, W. J. - Methods for the detection and determination of vegetable proteins in meat products. *J. Amer. Oil. chem. Soc.*, 56 (3): 285 - 7, 1979.
14. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. - Decreto n.º 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de out. 1978. p. 149 - 152, 223 - 234. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. (NTA 2 e NTA 36).
15. SILVEIRA, N. V. V. ; DUARTE, M.; CHOUCOUREL, E. L.; SARUWTARI, J. H. & RODAS, M. A. B. - Avaliação de misturas utilizadas no preparo de bebidas lácteas para a merenda escolar. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. São Paulo, 48 (1/2): 17 - 9, 1988.
16. TORÚN, B.; VITERI, F. E. & YOUNG, V. R. - Nutrition role of soya protein for humans. *J. Amer. Oil chem. Soc.* 58 (3): 400 - 6, 1981.
17. VEISSEYRE, R. - Caracteres, composición y estructura de la leche. In: *Lactologia técnica*. 2ª ed. Zaragoza, Acribia, 1988. c. 1, p. 5.
18. YOUNG, V. R. - Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J. Am. diet Assoc.* 91 (7): 828 - 35, 1991.

Recebido para publicação em 1ª de outubro de 1992.

## INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM PAÇOCAS DE AMENDOIM CONSUMIDAS NA CIDADE DE CAMPINAS, ESTADO DE SÃO PAULO.\*

Valéria Pereira da Silva FREITAS \*\*  
Maria Irene Cibela BADOLATO \*\*

RIALA 6/733

FREITAS, V. P. S. & BADOLATO, M. I. C. - Incidência de aflatoxinas em paçocas de amendoim consumidas na cidade de Campinas, Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 83-87, 1992.

RESUMO: Foram analisadas um total de 316 amostras de paçocas de amendoim de 4 marcas diferentes e de 2 tipos: GIBI (doce) e GT (creme) coletadas semanalmente, no período de janeiro a dezembro de 1988 em fábricas e depósitos na cidade de Campinas, onde se localiza um grande número de fábricas de doces de grande, médio e pequeno porte bem como vários depósitos de doces. Foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada. Das 316 amostras analisadas, 205 (64,95%) encontravam-se contaminadas com aflatoxinas numa faixa de 4 a 195 µg/kg e destas, 51,58% continham teores acima do limite tolerado pela legislação brasileira (30 µg/kg).

DESCRIPTORIOS: Aflatoxinas, determinação em paçocas de amendoim. Paçocas, determinação de aflatoxinas. Cromatografia em camada delgada.

### INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos com substâncias tóxicas produzidas por fungos e outros microorganismos, constitui um grave problema por suas implicações na saúde humana e na disponibilidade de alimentos de origem animal e vegetal.

As micotoxinas são compostas de diversas estruturas químicas, produzidas por fungos toxigênicos, sob condições adequadas<sup>7, 15</sup>.

Os fungos produtores de micotoxinas são saprófitos habituais do solo, ar e quando o meio ambiente é propício, colonizam em diversos substratos<sup>7, 15</sup>.

Dentre as micotoxinas encontradas em alimentos, as que causam maior dano aos animais e ao homem são as aflatoxinas. A aflatoxina B1 (AFB1) é considerada o mais potente hepatocarcinogênico conhecido<sup>2, 3, 4, 5, 6</sup>.

O Brasil é um país de clima predominantemente tropical com todas as condições que levam à contaminação dos alimentos por aflatoxinas, e vários trabalhos foram realizados em relação às aflatoxinas sendo que a maioria envolve levantamento dos teores

de aflatoxinas em alimentos e rações<sup>8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18</sup>.

Em 1982, SABINO *et alii*<sup>13</sup> analisaram 50 amostras de pastas de amendoim e 106 de paçoca, encontrando níveis de até 278 µg/kg e 260 µg/kg respectivamente. Scussel e Amaya em 1985<sup>18</sup> analisaram 241 amostras de amendoim e seus produtos, limitada à cidade de Campinas. Destas 128 amostras foram positivas das quais 92 continham teores acima do limite de tolerância permitida pela legislação brasileira<sup>1</sup>. A paçoca alcançou níveis de 1282 µg/kg de AFB1 e 476 µg/kg de AFG1.

Considerando que a paçoca de amendoim tem como principal alvo o consumo pela população infantil e é distribuída na merenda escolar, resolvemos dar continuidade ao estudo sobre as variações dos níveis de aflatoxinas B1 e G1 na cidade de Campinas, no período de janeiro a dezembro de 1988, onde se localiza um grande número de fábricas de doces de grande, médio e pequeno porte bem como vários depósitos de doces.

\* Realizado na Seção de Bromatologia e Química/ I. A. Lutz - Campinas.

\*\* Da seção de Bromatologia e Química do I. A. Lutz de Campinas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas um total de 316 amostras de paçoca de amendoim, de quatro marcas diferentes (A, B, C, D) e de dois tipos : Gibi (doce) e GT (creme), coletadas semanalmente, no período de janeiro a dezembro de 1988 em fábricas e depósitos.

O método utilizado para determinação das aflatoxinas foi o descrito no livro Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>16</sup> que nada mais é que o método BF do AOAC<sup>19</sup> com pequenas modificações. A confirmação da identidade das aflatoxinas foi feita pelo método do ácido trifluoracético (TFA)<sup>19</sup>.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e gráficos 1 e 2.

Do total de 316 amostras analisadas no período de 12 meses (janeiro - dezembro/88), 64,9% estavam contaminadas com aflatoxinas, sendo que 51,58% apresentaram teores acima do limite de tolerância de 30 ppb (B1 + G1) estipulado pela legislação brasileira<sup>1</sup>.

Fato digno de menção foi a redução dos níveis de aflatoxinas nas amostras de paçoca coletadas nos meses de inverno quando as condições climáticas não são favoráveis à contaminação, exceto aquelas da marca C que continham maior contaminação devido, possivelmente, a um controle de qualidade inadequado, indicando assim a má qualidade do amendoim utilizado.

Correlacionando os nossos achados com aqueles obtidos por Sabino *et alii*<sup>13</sup> e Scussel & Rodrigues-Amaya<sup>18</sup>, que analisaram, respectivamente, paçoca de amendoim consumida no Estado de São Paulo e amostras de amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980-1982, foram encontrados, no presente estudo, teores mais elevados de aflatoxinas (acima de 30 ppb). Este fato demonstra que apesar dos conhecimentos sobre os efeitos das Aflatoxinas o problema de contaminação do amendoim continua sendo uma preocupação para a saúde pública, mostrando a necessidade da manutenção de um controle contínuo e sistemático das matérias-primas.

TABELA 1  
Níveis de aflatoxinas (B1 + G1) em paçocas de amendoim

MARCA	N <sup>o</sup> Total amostras	N <sup>o</sup> amostras N.D. *	N <sup>o</sup> amostras < 30µg/kg	N <sup>o</sup> amostras > 30µg/kg	Variação	
					Mínimo µg/kg	Máximo µg/kg
A	79	41	14	24	8	163
B	79	10	12	27	5	181
C	79	17	3	59	8	195
D	79	24	2	53	8	195
Total	316	122	31	163		

\* N.D. = Não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

TABELA 2  
Incidência de aflatoxinas (B1 + G1) em paçocas de amendoim, tipo GT (creme) e tipo GIBI (doce)

MARCA	GT (creme)				GIBI (doce)			
	n <sup>o</sup> amostras	n <sup>o</sup> amostras N.D.*	n <sup>o</sup> amostras < 30µg/kg	n <sup>o</sup> amostras > 30µg/kg	n <sup>o</sup> amostras	n <sup>o</sup> amostras N.D.*	n <sup>o</sup> amostras < 30µg/kg	n <sup>o</sup> amostras > 30µg/kg
A	78	39	15	24	1	1	-	-
B	56	18	13	25	23	16	5	2
C	68	8	2	58	11	6	4	1
D	75	21	2	52	4	2	1	1
Total	277	86	32	159	39	25	10	4

\* N.D. = Não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

TABELA 3  
Distribuição mensal da contaminação por aflatoxinas (B1 + G1) nas amostras de paçocas de amendoim dos tipos GT e GIBI.

Marca	Jan	Feb	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total	
	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30	n > 30		
A	8 (12,5)	18 (12,5)	5 (40)	27 (71,43)	9 (77,77)	7 (28,57)	2 (0)	8 (10)	0 (25)	14 (0)	15 (25)	0 (75)	4 (3)	79
B	8 (0)	0 (25,87)	7 (40)	25 (25)	28 (22,22)	2 (57,14)	9 (12,5)	2 (20)	7 (50)	4 (80)	2 (20)	4 (75)	3 (75)	79
C	8 (62,5)	5 (100)	7 (100)	5 (100)	8 (100)	8 (57,14)	9 (100)	9 (22,2)	7 (60)	4 (75)	3 (40)	5 (75)	2 (40)	79
D	8 (0)	0 (0)	6 (50)	0 (62,5)	3 (100)	8 (100)	5 (100)	10 (87,5)	10 (90)	6 (75)	6 (40)	8 (100)	4 (100)	79

\* 30µg/kg

n=n' de amostras analisadas com teores acima de 30µg/kg

\*\* os números entre parênteses indicam a % de amostras acima de 30µg/kg

GRÁFICO I - Valores de aflatoxina B<sub>1</sub> + G<sub>1</sub> em paçoca de amendoim

GRÁFICO I

Valores de aflatoxina B<sub>1</sub> + G<sub>1</sub> em paçoca de amendoim

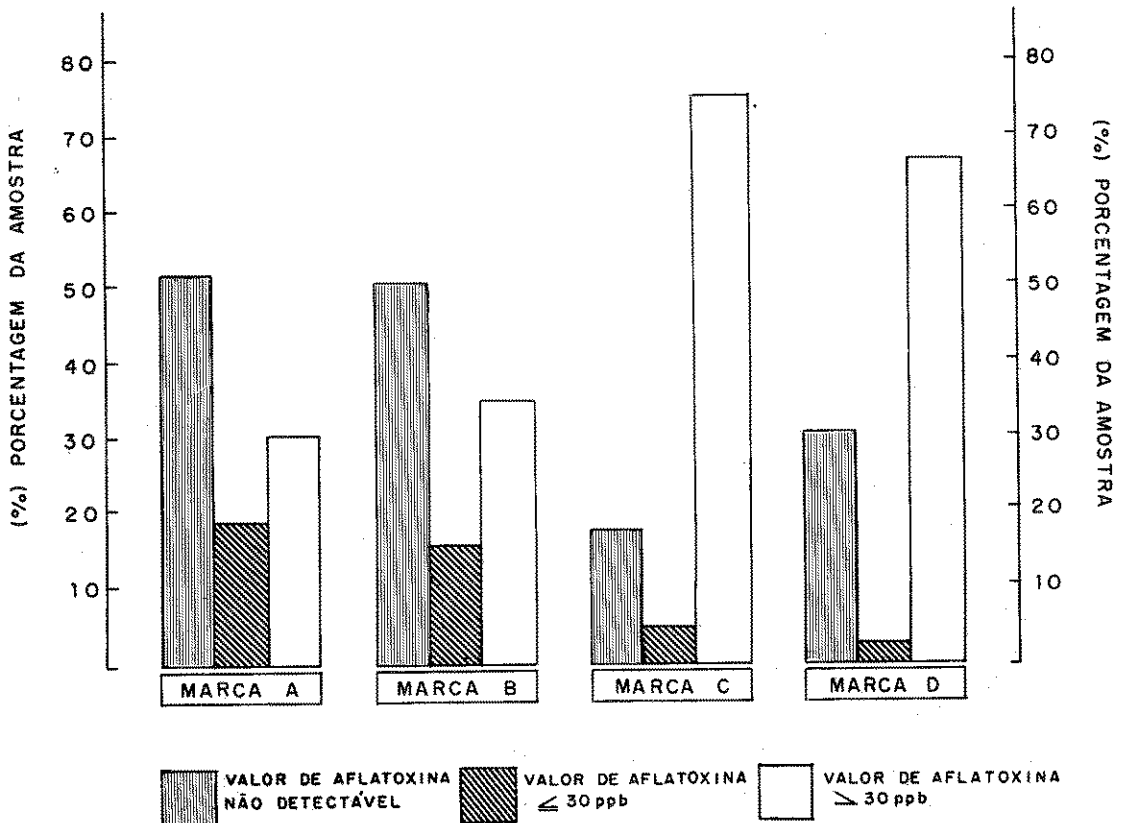
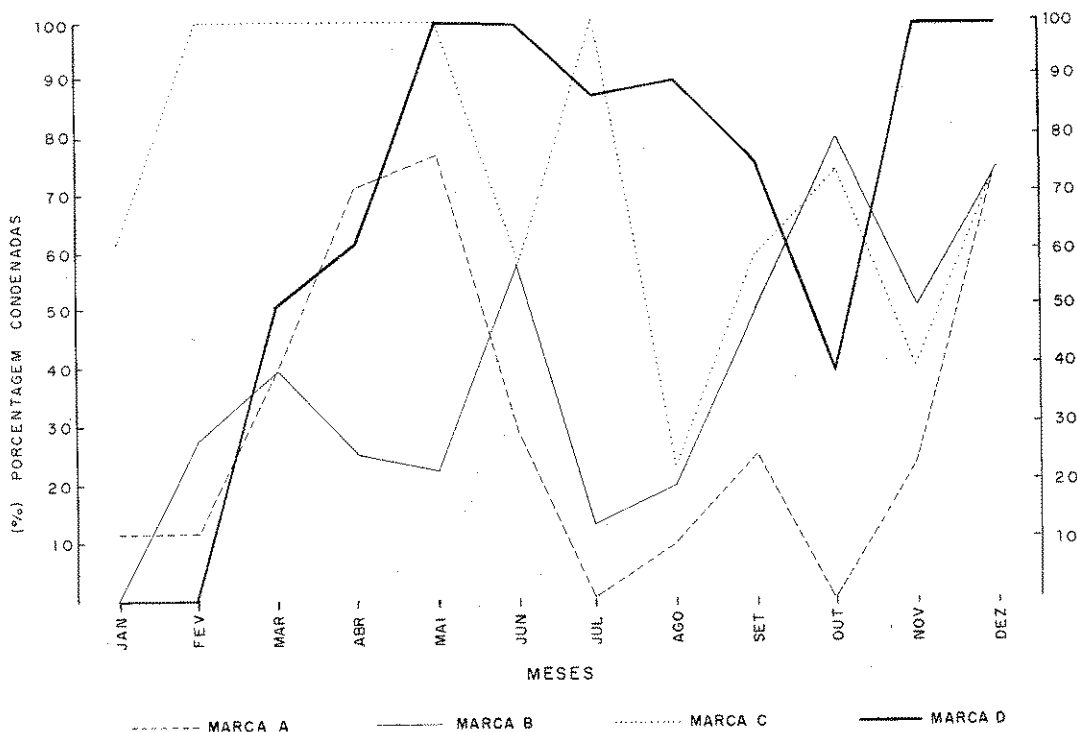


GRÁFICO II

Variação percentual de amostras com valores de aflatoxina > 30 ppb em função dos meses (ano 1988)



AGRADECIMENTOS

A Myrna Sabino pela expressiva ajuda na execução

do trabalho e a Levi Meirelles Alves pela colaboração técnica do presente trabalho.

FREITAS, V. P. S. & BADOLATO, M. I. C. - Incidence of aflatoxins in peanut sweet bars, consumed in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 52(1/2):83-87, 1992.

**ABSTRACT:** Samples of three hundred sixteen of peanut sweet bars were analysed for determination of the amount of aflatoxins. They were taken out from 4 different marks and two types as called "gibi" (sweet) and "GT" (cream). This samples were collected weekly since January to December 1988, in industries and storehouses from Campinas city where there are many factories processing peanut, with large, medium and small capacity. Thin-layer chromatography was employed for determination of aflatoxins. Aflatoxins were detected in 205 samples (64,95%) ranged from 4 to 195µg/kg. These 205 samples, 163 (51,58%) had concentration higher than those tolerated by pertinent Brazilian legislation (30µg/kg).

**DESCRIPTORS:** Aflatoxins, determination in peanut sweet bars, determination of aflatoxins, thin-layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, Leis, decretos, etc. - Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Sec. 1, pt. 1, p. 710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.

2. IARC - Working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Geneva, 1971. *Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. Lyon, IARC, 1972. v. 1. p. 145 - 156.

3. IARC - *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. Some

- naturally occurring substances. Lyon, IARC, 1976, V. 10, p. 55 - 65.
4. IARC - *Iarc monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some food additives, and naturally occurring substances*, Lyon, IARC, 1983, v.31, p. 17.
  5. IARC - *IARC, monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon, suppl. 7: 83 - 87, 1987.
  6. MIROCHA, C. J. - Historical aspects of mycotoxicology and developments in aflatoxicosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS, Cairo, 1981. *Proceedings*. Cairo, National Research Centre, 1983. p. 23 - 31.
  7. MIROCHA, C. J. & CHRISTENSEN, C. M. - Biologia dos fungos toxigênicos. In: *Encontro Nacional de Micotoxinas: Problemas e Soluções*. São Paulo, 1980. *Anais*. São Paulo, 1980, p. 11 - 22.
  8. PRADO, G. - Incidência de AFB1 em alimentos. *Rev. Farm. Bioquim.* 5: 147 - 157, 1989.
  9. PRADO, G.; MATTOS, S. V. de M. & PEREIRA, E. C. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 9: 138 - 145, 1989.
  10. PURCHIO, A. - Search for B1 aflatoxin and similar Fluorescent compounds in Brazilian Cassava flour. *Rev. Microbiol.* 3: 121 - 125, 1972.
  11. SABINO, M. - Variação de níveis de aflatoxina B1 em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40: 153 - 158, 1980.
  12. SABINO, M. & CORREA, M. J. S. - Aflatoxina B1 em feijão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41: 83 - 87, 1981.
  13. SABINO, M.; INOMATA, E. I. & LAMARDO, L. C. A. - Variação dos níveis de aflatoxinas B1 em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42: 39 - 44, 1982.
  14. SABINO, M.; ZORZETTO, M. A. P.; PEDROSO, M. O. & MILANEZ, T. V. - Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49: 41 - 44, 1989.
  15. SAITO, M.; ENOMOTTO, M.; TATSUNO, T. & URAGUCHI, K. *apud* LIN, M. T. - Biologia dos fungos toxicogênicos. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS: PROBLEMAS E SOLUÇÕES. São Paulo, 1980. *Anais*. São Paulo, 1980. p. 11 - 22.
  16. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, 1985. v. 1. p. 430 - 435.
  17. SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-MAYA, D. B. & DA SILVA, W. J. - Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea Mays* L. ) e em seus produtos derivados comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 6: 75 - 85, 1986.
  18. SCUSSEL, V. M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. - Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980 - 1982. *Bol. SBCTA*, 19: 109 - 119, 1985.
  19. STOLOFF, L. & SCOTT, P. M. - Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th ed. Arlington, Virginia, A. O. A. C., 1984.

Recebido publicação em 10 de agosto de 1991.

## ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM CAFÉ\*

Marcia Regina Pennacino do Amaral MELLO \*\*  
Regina Sorrentino MINAZZI-RODRIGUES \*\*  
José Byron de CARVALHO \*\*  
Issao SHIROSE \*\*\*

RIALA6/734

AMARAL MELLO, M.R.P. e col. - Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de cafeína em café. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2):89-95, 1992.

RESUMO: Foram realizados estudos comparativos entre três métodos de extração para determinação de cafeína em amostras de café cru, café torrado, café solúvel e extrato de café. Compararam-se os métodos: de Cortes, descrito nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"; este mesmo método, com modificações relativas à quantidade de amostra e de Lee Kum-Tatt modificado. Verificou-se que os métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificados forneceram os melhores resultados, e que este último, além disso se destacou como o mais apropriado para análises de rotina pela sua rapidez e operacionalidade.

DESCRITORES: Café, determinação de cafeína em. Cafeína em café, determinação. Métodos de extração, estudo comparativo.

### INTRODUÇÃO

O café, talvez seja a bebida mais conhecida e apreciada em todo o mundo. Além de suas características organolépticas destaca-se a sua ação estimulante sobre o sistema nervoso central, a musculatura esquelética e o sistema circulatório, ação essa devida à presença do alcalóide trimetilxantina ou cafeína.<sup>3</sup>

O teor da cafeína no café pode variar de 0,5% a 2,0% dependendo da espécie<sup>4</sup>, e tem sido utilizado como parâmetro de qualidade, tanto do café cru em grão, como do café torrado e do café solúvel. A legislação brasileira, de 1978, exige um teor mínimo de 1% p/p de cafeína para o café cru em grão, de 0,7% p/p para café torrado e de 2,0% p/p para café solúvel<sup>1,10</sup>.

Muitos métodos analíticos são citados na literatura para a quantificação da cafeína em café. Esses métodos incluem a determinação gravimétrica<sup>2,5</sup>, a espectrofotometria na região do ultravioleta<sup>5,6,9,11,12</sup> e a cromatografia líquida de alta resolução<sup>7</sup>.

A quantificação de cafeína em cafés tem sido realizada, na maioria dos casos, por meio da determinação espectrofotométrica, que tem se mostrado seletiva, simples e rápida. A etapa precedente a essa quantificação pode ser realizada através de extração ácida, como descrita nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"<sup>5</sup> com base no método de Cortes<sup>2</sup>, ou seja, por carbonização seletiva da matéria orgânica da amostra pelo ácido sulfúrico concentrado, para liberação da cafeína, seguida da extração com clorofórmio. No que se refere a essa técnica, os autores têm constatado que a variação da quantidade de ácido em relação à amostra utilizada pode resultar na obtenção de diferentes teores de cafeína.

Alguns autores, entretanto, utilizam extração alcalina com hidróxido de amônio e clorofórmio e subsequente passagem do extrato através de coluna de alumina, com vistas à remoção de impurezas interferentes<sup>6</sup>.

\* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no VII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, São Paulo, 1991.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Seção de Estatística).



Com o objetivo de escolher a melhor conduta para determinar cafeína em amostras de café, levando em consideração facilidade de operação, eliminação de possíveis interferências e obtenção de bons resultados na faixa de concentração estudada, foi realizado um estudo comparativo entre o método oficial descrito no livro *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, e este mesmo método com modificações relativas a quantidades de amostra e o método de Lee Kum-Tatt<sup>6</sup>, baseado em extração alcalina, com modificações.

## MATERIAL E MÉTODOS

### a) MATERIAL

Foram analisadas 42 amostras de café, assim distribuídas de acordo com a forma de apresentação: dez amostras de café cru em grão, dez amostras de café torrado e moído, dez amostras de café solúvel e doze amostras de extrato de café.

### b) MÉTODOS

Foi realizado um estudo comparativo entre três métodos de extração de cafeína: a) método I.A.L. — baseado em extração ácida, empregando-se a técnica descrita no livro de "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" v. 1, 1985; b) método I.A.L. modificado — empregando-se a mesma técnica, apenas alterando-se a quantidade de amostra; c) método Lee Kum-Tatt modificado — baseado em extração alcalina.

A partir da extração, a dosagem da cafeína obtida foi feita por espectrofotometria na região do ultravioleta.

#### b. 1 Método I.A.L.

Pesar com precisão  $n$  g da amostra em um béquer de 100 ml (onde  $n = 2$  g para café cru e café torrado; 1 g para o café solúvel e extrato de café). Adicionar cuidadosamente, evitando a formação de grumos, com auxílio de uma vareta de vidro, 4 ml de ácido sulfúrico. Homogeneizar. Aquecer em banho-maria por 15 minutos. Adicionar, com cuidado, 50 ml de água destilada fervente. Aquecer por mais de 15 minutos. Filtrar a quente. Lavar o béquer e o filtro com três porções de 10 ml de água quente, acidulada com ácido sulfúrico. Receber o filtrado e as águas de lavagem em um funil de separação de 250 ml. Esfriar. Adicionar 30 ml de clorofórmio. Agitar. Esperar a separação das camadas. Decantar a camada clorofórmica, por meio de um filtro umedecido com clorofórmio, para um balão de fundo chato de 250 ml com junta esmerilhada. Repetir a extração com mais três porções de 30 ml de clorofórmio. Evaporar o clorofórmio. Dissolver o resíduo em água destilada quente, filtrando para um balão volumétrico de 1000 ml. Completar o volume com água destilada. Medir a absorvância a 274 nm, em espectrofotômetro. Determinar a quantidade de cafeína correspondente, usando curva-padrão previamente estabelecida.

Curva-padrão — preparar uma solução-estoque de cafeína com 10 mg/100 ml. Com auxílio de bureta transferir alíquotas de 2, 3, 5, 7, 8, 10 e 15 ml para balões de 100 ml. Completar o volume com água destilada. Medir a absorvância a 274 nm, usando um branco para calibração do espectrofotômetro.

#### b. 2 Métodos I.A.L. modificado

Empregou-se a mesma técnica descrita acima, apenas alterando-se a quantidade de amostra (1 g ao invés de 2 g para café cru e café torrado e 0,5 g ao invés de 1 g para café solúvel).

#### b. 3 Método de Lee Kum-Tatt modificado

Pesar 1,0g para café cru, torrado e extrato de café ou 0,5g para café solúvel, transferir para um frasco erlenmeyer de 125 ml contendo 3 ml de solução de hidróxido de amônio a 10%; adicionar 50 ml de clorofórmio contendo 1% de etanol, aquecer sob refluxo por dez minutos. Passar o conteúdo do frasco através de um funil contendo algodão, de maneira que o filtrado seja recebido diretamente em uma coluna de vidro (2,5 cm de diâmetro x 25 cm de altura) "empacotada" com 10 g de óxido de alumínio neutro (atividade I). Lavar o frasco com mais duas porções de 50 ml do clorofórmio contendo 1% de etanol. Recolher o eluato em um balão de fundo chato de 250 ml com junta esmerilhada. Evaporar o clorofórmio e dissolver o resíduo em água destilada quente, filtrando para um balão volumétrico de 1000 ml. Completar o volume com água. Medir a absorvância a 274 nm, em espectrofotômetro. Determinar a quantidade de cafeína correspondente, usando uma curva-padrão previamente estabelecida.

As modificações introduzidas no método original de Lee Kum-Tatt referem-se ao volume de clorofórmio usado na extração, tempo de aquecimento sob refluxo e leitura da cafeína em água destilada em vez de clorofórmio.

Salienta-se que as modificações, tanto para o método I.A.L. como para o método de Lee Kum-Tatt foram introduzidas após vários testes com relação ao tempo e à eficiência de extração.

### c) ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### c. 1 Para análise conjunta dos dados de café cru, café torrado e moído e café solúvel

Os dados de teores de cafeína em café foram submetidos à análise da variância, segundo o delineamento de parcelas subdivididas (*split-plots design*) incluindo nas parcelas o fator tipos de café e nas subparcelas o fator métodos de extração, e a interação tipos de café x métodos de extração. Quando da significância ( $p < 0,05$ ) dessa interação, estudou-se o efeito de um fator em relação ao outro. A análise da variância foi complementada com o teste de TuKey para o confronto das médias referentes a tipos de café e a métodos de extração da cafeína.

c. 2 Para extrato de café

Os dados de teores de cafeína foram submetidos à análise da variância segundo o modelo de dois critérios de classificação, e as médias referentes a métodos de extração confrontadas pelo teste de Tukey.

Para ambos os casos o nível de erro para os testes estatísticos foi fixado em 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da determinação de cafeína das amostras pelos métodos citados, encontram-se relacionados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, de acordo com o tipo de amostra.

Tabela 1  
Teores de cafeína nas amostras de café cru, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N <sup>o</sup>	Método I.A.L. g/100g	Método I.A.L. modificado g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	0,93	1,08	0,91
2	0,94	1,08	0,98
3	0,94	1,14	0,97
4	1,03	1,14	1,00
5	1,01	1,13	0,97
6	0,95	1,15	1,10
7	0,99	1,15	0,92
8	0,97	1,05	0,97
9	0,91	1,08	0,92
10	0,92	1,08	0,90

Tabela 2  
Teores de cafeína nas amostras de café torrado e moído, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N <sup>o</sup>	Método I.A.L. g/100g	Método I.A.L. modificado g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	1,04	1,28	1,31
2	1,08	1,38	1,33
3	1,08	1,35	1,20
4	1,07	1,31	1,30
5	0,99	1,22	1,22
6	0,98	1,22	1,23
7	0,98	1,31	1,24
8	1,02	1,35	1,24
9	1,56	1,80	1,89
10	1,02	1,22	1,22

Tabela 3  
Teores de cafeína nas amostras de café solúvel, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N <sup>o</sup>	Método I.A.L. g/100g	Método I.A.L. modificado g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	2,51	2,77	2,77
2	2,29	2,49	2,48
3	2,52	2,71	2,69
4	2,19	2,52	2,40
5	2,18	2,39	2,40
6	2,48	2,80	2,92
7	2,35	2,69	2,58
8	2,32	2,63	2,62
9	2,06	2,26	2,33
10	2,49	2,70	2,65

Tabela 4  
Teores de cafeína nas amostras de extrato de café, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N <sup>o</sup>	Método I.A.L. g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	0,96	1,00
2	1,04	1,06
3	1,06	1,00
4	2,36	2,66
5	2,37	2,68
6	2,32	2,51
7	1,16	1,16
8	1,20	1,16
9	1,17	1,17
10	2,30	2,42
11	2,54	2,83
12	2,60	2,75

Uma vez que as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" não indicam o procedimento para extração da cafeína do extrato de café, adotou-se nesse

caso o mesmo método I.A.L. indicado para outros tipos de café, mas adequando-se a quantidade de

amostra a ser utilizada em função da concentração de cafeína presente.

Confrontando os valores de cafeína obtidos, verifica-se que o método I.A.L. modificado mostrou-se mais eficiente que o método I.A.L. para os cafés cru, torrado e solúvel.

Comparando-se os métodos I.A.L. modificado (extração ácida) e Lee Kum-Tatt modificado (extração alcalina), verifica-se que somente no caso do café cru, pelo fato da cafeína estar ligada a outras substâncias, o que não ocorre nas demais formas de café<sup>8</sup>, a extração ácida mostrou-se mais eficiente.

Algumas considerações devem ser feitas com relação à operacionalidade de cada método. Assim, os métodos I.A.L. e I.A.L. modificado apresentam como desvantagens o fato de incluírem uma etapa de extração da cafeína envolvendo agitação em funil de separação e problemas de formação de emulsões, principalmente nos casos de amostras de café verde e de extrato de café. Embora solucionáveis, tais inconvenientes retardam o andamento da análise. Comparativamente, o método de Lee Kum-Tatt modificado mostrou-se mais simples e rápido.

Os resultados estatísticos constam dos Quadros 1, 2, 3 e 4.

Quadro 1  
Análise da variância dos dados de teores de cafeína nos cafés cru, torrado, moído e solúvel.

F.V. *	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tipos de café (T)	2	38,779042		
Resíduo (a)	27	1,685740	0,062435	
Subtotal	(29)	(40,464782)		
Método de extração (M)	2	0,795049		
Interação T x M	4	0,185605	0,046401	24,94 (p < 0,05)
Resíduo (b)	54	0,100480	0,001861	
Total	89	41,545916		

C.V. (parcelas) = 15,73%

C.V. (subparcelas) = 2,72%

\* F.V. = fonte de variação

S.Q. = soma de quadrados

F = valor da estatística F

G.L. = graus de liberdade

Q.M. = quadrado médio

C.V. = coeficiente de variação

p = nível mínimo de significância

Quadro 2

Confronto das médias de métodos de extração dentro de cada forma de extração devido à significância da interação tipos de café x métodos de extração.

- D.M.S. (5%) = diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro de 5%

- As médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey

MÉTODOS	TIPOS DE CAFÉ		
	Torrado	Cru	Solúvel
I.A.L.	1,08 a	0,96 a	2,34 a
I.A.L. modificado	1,34 b	1,11 b	2,60 b
Lee Kum-Tatt modificado	1,32 b	0,96 a	2,58 b
D.M.S. (5%)	0,05	0,05	0,05

Quadro 3  
Confronto das médias de formas de apresentação dentro de cada método de extração devido à significância da interação tipos de café x métodos de extração.

TIPOS DE CAFÉ	MÉTODOS		
	I.A.L.	I.A.L. modificado	Lee Kum-Tatt modificado
Torrado	1,08 a	1,34 a	1,32 a
Cru	0,96 a	1,11 b	0,96 b
Solúvel	2,34 b	2,60 c	2,58 c
D.M.S. (5%)	0,16	0,16	0,16

- D.M.S. (5%) = Diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro 5%

- As médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Quadro 4  
Análise da variância dos dados dos teores de cafeína no extrato de café.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Métodos	1	0,07260	0,07260	7,78 (p < 0,05)
Amostras	11	12,57493	1,14318	122,57 (p < 0,05)
Resíduo	11	0,10260	0,009327	
Total	23	12,75013		

C.V. = 5,33%

O Quadro 1 mostra que o efeito da interação tipos de café x métodos de extração foi significativo ( $p < 0,05$ ), indicando que o efeito de um fator depende do outro. Indica também que o coeficiente de variação (c.v.) para parcelas e subparcelas foi de magnitudes 15,73% e 2,72% respectivamente.

O Quadro 2 mostra que os teores de cafeína obtidos pelos métodos I.A.L. modificado e Lee Kum-Tatt modificado não diferiram significativamente entre si, tanto para café torrado como para café solúvel, mas que diferiram do obtido pelo método I.A.L. Já para o café cru, o teor de cafeína pelo método I.A.L. modificado foi significativamente superior aos obtidos pelos métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificado.

O Quadro 3 mostra que o teor de cafeína no café solúvel foi significativamente superior aos demais tipos de café para todos os métodos utilizados, e que no café torrado, o teor de cafeína foi significativamente superior ao café cru nos métodos I.A.L. modificado e Lee Kum-Tatt modificado, mas não no método I.A.L.

O Quadro 4, correspondente ao extrato de café, mostra que a magnitude do coeficiente de variação (c.v.) foi de 5,33%. Sendo o teor médio de cafeína pelos métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificado de magnitudes 1,76 e 1,87, respectivamente, e a diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Tukey igual a 0,09, tem-se que o teor de cafeína pelo

método de Lee Kum-Tatt modificado foi significativamente superior ao obtido pelo método I.A.L.

#### CONCLUSÕES

Nas condições experimentais e diante dos resultados estatísticos, pôde-se concluir que:

a) Os diferentes métodos de extração de cafeína não apresentaram a mesma eficiência.

b) Pelo método I.A.L. determinou-se teor médio de cafeína sempre inferior ao dos demais métodos.

c) No café solúvel o teor de cafeína sempre foi superior ao dos demais tipos, nos três métodos utilizados.

d) No café cru o teor de cafeína foi inferior aos demais tipos quando se utilizaram os métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificado, o que não ocorreu no caso do método I.A.L. modificado.

e) Para as amostras de cafés torrado e solúvel, os métodos I.A.L. modificado e Lee Kum-Tatt modificado apresentaram idênticos resultados.

f) Para o extrato de café o método Lee Kum-Tatt modificado resultou em um teor de cafeína superior ao do método I.A.L.

Os estudos realizados indicaram que os métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt, modificados, forneceram os melhores resultados. O método de Lee Kum-Tatt modificado, além disso, mostrou-se o mais apropriado para análises de rotina pela sua rapidez e operacionalidade.

AMARAL MELLO, M,R,P, *et al.* — Comparative study of extraction methods to determine caffeine in coffee.

ABSTRACT: Comparative studies were made among three extraction methods to determine caffeine in samples of crude, roasted, soluble coffee as well as in coffee extract. The methods used were: Cortes', method according to the Analytic Norm of Adolfo Lutz Institute, the same method with modifications concerning the sample quantity, and the modified Lee Kum-Tatt method. Based on the obtained results, it was proved that I.A.L. and Lee Kum-Tatt modified methods presented the best results, although the Lee Kum-Tatt modified method would be the most appropriate to routine analyses for its rapidity, operationality and good results.

DESCRIPTORS: Coffee, determination of caffeine in. Caffeine in coffee, determination. Extraction methods, comparative study.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Sec. 1, pt. 1, p. 11511-3. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)...
2. CORTES, F.F. — Nota sobre um novo processo de doseamento da cafeína no café. *Rev. Soc. bras. Quim.*, 4:105.1933. (Nota prévia)
3. ELIAS, P.S. — Problèmes biologiques courants concernant le café et la cafeïne. *Café Cacao The*, 30:199-210, 1986.
4. FOBÉ, L.A. — Cafeína. *Bol. CTPTA*, 6:22-5,1966.
5. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985. v.1, p. 189-92;195-6.
6. KUM-TATT, L. — A routine method for determining caffeine in coffee mixtures. *Analyst*, 86:825-8, 1961.
7. MADISON, B.L.; KOZAREK, W.J. & DANO, C.P. — High pressure liquid chromatography of caffeine in coffee. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 59: 1258-61, 1976.
8. Nery, J.P. — Química do café. *Bol. CTPTA*, 2:24-35, 1964.
9. PASEIRO, P. & SIMAL, J. — Contribucion a la determinacion espectrofotometrica de cafeina en cafes. *An. Bromat.*, 36:97-108, 1984.
10. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p.1 (NTA 42, 43 e 44). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
11. SMITH, R.F. & REES, D.I. — The spectrophotometric determination of caffeine in coffee and tea products, with special reference to coffee and chicory mixtures. *Analyst*, 88:310-13, 1963.
12. SMITH, R.F. — The spectrophotometric determination of caffeine. *Analyst*, 89: 146-47, 1964.

Recebido para publicação em 10 de agosto de 1991.

## RABIES VIRUS IN McCOY CELL LINE. Part I — Cytopathic effect and replication\*

Yeda L. NOGUEIRA

RIALA 6/721

NOGUEIRA, Y. L. - Rabies virus in McCoy cell line. Cytopathic effect and replication. Part I - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 9-16, 1992.

ABSTRACT: The cytopathic effect caused by rabies virus is not easy to detect, although the McCoy cell line showed high sensitivity to this virus.

The titre increased at each new passage and the ERA strain reached titre higher than  $10^{8.0}$  LD<sub>50</sub>/0,03 ml after eight successive passages only.

The kinetics of infection showed that 48 hours after inoculation, the cell reaches the peak of infection and the cellular proteins synthesis is inhibited.

The data are reproducible suggesting that this cell line could be used for diagnostic purposes and for virus mass production.

DESCRIPTORS: *McCoy cell line. Cytopathic Effect (CPE). Rabies virus. ERA strain. Viral mass production.*

### INTRODUCTION

Rabies virus propagations using the replication technique in cell systems (other than from nervous origin) is not established with success: the evidence of cytopathic effect (CPE) and its association with virus replication is also unclear according to Kissling, Atanasiu *et alii*, Wiktor *et alii*.<sup>2,15,22</sup>

In 1972, Wiktor and Clark<sup>23</sup> studied the chronic infection of rabies virus in mammalian and reptile cell cultures and no CPE was observed. These authors concluded that interferon produced was responsible for the persistent infection in these cells hiding the occurrence of CPE.

With the aim of producing anti-rabies vaccine for human use Atanasiu *et alii*, Fernandes *et alii*, and Montagnon *et alii*<sup>3,8,19</sup> used several kinds of cell lines and after about 20 - 30 passages of the virus in each cell line used, obtained primary culture of calf foetus, human diploid cell (WI - 38) and more recently also the cell line from green monkey (VERO). Although no cell alteration was observed, maybe the WI - 38 showed some signs of alternation, but not significant or typical of cytopathic effect.

Other authors, Kawai *et alii*; Kawai *et al.*<sup>12,13</sup>, used a series of methods to obtain CPE in the BHK-21, clone 13 cell, such as: variation of incubator temperature, irradiation of cells, interference with DI particles, etc. In 1985, Honda *et alii*<sup>10</sup> used cells named Sym-1, clone 04, of human neuroblastom infected with rabies virus HEP (Flury strain), and proved that the virus replication produces large amounts of interferon maintaining the persistent infection. With the use of anti-interferon serum, the replication was stimulated with the presence of CPE.

Persistent infection with rabdovirus has been studied in great detail and over long periods by Holland *et alii*<sup>11</sup>. The presence of DI particles has been observed in vesicular stomatitis and rabies virus by Villarreal *et al.* and by Youngner *et al.*<sup>20,24</sup>

During the revision of specialized literature it was verified that there was no systematic evidence of persistent presence of CPE as a result of replication of rabies virus.

In 1982 and 1987 Nogueira<sup>17,18</sup> showed the sensitivity of the McCoy cell line to rabies virus, with definitive and constant presence of CPE when rabies virus was

\* This work has had the financial support of the grant 43.84.0011 from FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) and Instituto Adolfo Lutz, São Paulo — Brazil.

inoculated. Besides, it was referred the adaptation of the rabies virus in these cells to be easy.

This paper has the aim to show the replication of rabies virus in McCoy cell line, the persistent CPE presence and the maintenance of the immunochemistry characteristic of the virus in the subsequent passages. This finding can be potentially a method to be used in the rapid diagnosis of infection caused by this virus. Titration of the antigen and serum neutralization reactions can be performed with this cell line.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

The cell culture used was the McCoy cell line obtained from American Type Culture Collection (ATCC) catalogued as # 1696.<sup>1</sup>

For the assay with rabies virus it was cultivated in Eagle's medium supplied by 2% of foetal calf serum (FCS).

### Virus

The ERA strain (vaccine) from Biovet Laboratory was used. The titre was  $10^{4.5}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml obtained from mice brains. The end point was calculated by the Reed-Muench method.<sup>16</sup>

The infection mock medium and the infected cells were harvested, and the samples were used for titration and part of them was frozen to -20°C.

### Mice

Swiss-Webster mice were used for titration purposes.

### Kinetics of Virus Replication

Multi-well plates, Limbro-Flow, with 24 wells were used. Briefly reported, cell monolayers were

split in concentration of  $4.2 \times 10^{5.0}$  cells/ml. Twenty-four hours before, the cells grew in the growth medium (Eagle's medium + 5% FCS).

Afterwards, the medium was removed, the cells washed with Buffer Balanced Saline (BBS) and the virus from the 6<sup>th</sup> passage, which titre,  $10^{6.2}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml, was added to each well. The adsorption was performed during 30 minutes at 33°C temperature in the incubator and each well completed with 1.5 ml by maintenance medium (Eagle's medium + 2.0% FCS) and again incubated at 33°C temperature. At intervals of 24, 48, 72 and 96 hours, the cells were removed, stained for immunofluorescence antibody reaction (FA), and observed in epifluorescence microscope (IM-35 Zeiss) objective 40. Photos were taken and the film used was the Ilford 400 ASA, automatic exhibition.

### Kinetics of Inhibition of Protein Cell's Synthesis

A radioactive label (Leucine labelled with Sulphur) Leu-<sup>35</sup>S was used for incorporation in cells' synthesis.

Following that,  $4.2 \times 10^{5.0}$  cells/ml were put in each of the multi-well plates (24 wells) 24 hours before. The next day the cells number was  $1.3 \times 10^{6.0}$  cells/ml. The M.O.I. was 0.5. Radiation pulses were given during 30 minutes in intervals of 24, 48, 73 and 96 hours. Each sample was harvested after the pulses, respectively, and was worked for cpm determination in beta-Beckman Scintillation Apparatus. The process was: a) removing the sample, b) adding lytic buffer, c) filtering in HA membrane through vacuum for macromolecules retention, d) fixing with Trichloro acetic acid (TCA), e) collecting the membrane in the scintillation vials and f) adding 3.0 ml of scintillation liquid (POP-POPOP), as described previously by Wagner *et al.*<sup>21</sup>

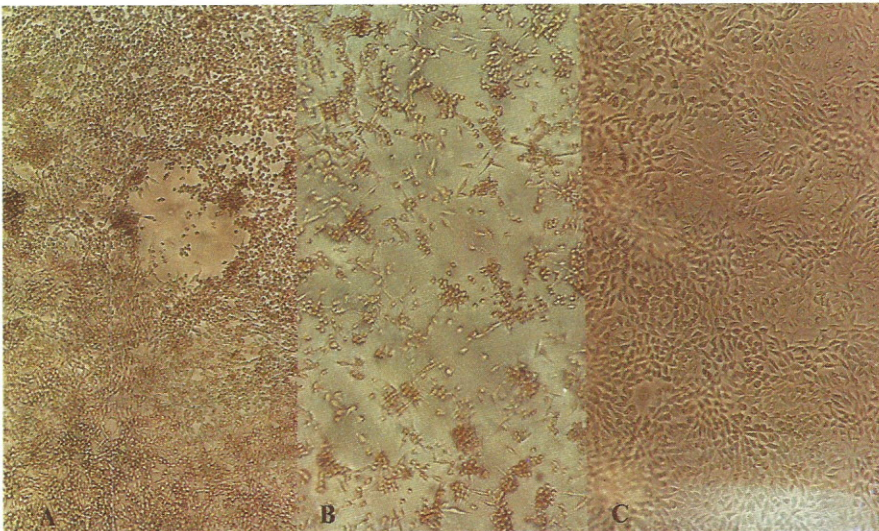


FIGURE 1:  
Cytopathic Effect in McCoy Cell Observed by Photomicrography



System: A and B-McCoy cell infected; C - Control (optic microscopy; objective 6.3 , IM 35-Zeiss microscope). The cytopathic effect begins in individualized cells that suffer morfolological alterations sequentially. At first the cells become like fibroblasts (oblong cells), then they detach from the monolayer making a little hole, the virus is released and infects the cells around (fig. 1A). After the total cellular lise the cells detach from the monolayer and become round cells (fig. 1B). The McCoy cell line is an uniform monolayer with polyhedral cells and epithelioid aspect (fig. 1C).

#### Electron Microscopy

The brains of paralytic mice were fixed in 2% of glutaraldehyde 0.1M phosphate buffer, pH=7.2 for two hours at room temperature and washed twice in phosphate buffer. Then they were kept overnight in uranyl acetate at 4°C and washed in distilled water once. The brains were post-fixed in osmic acid 1%, stained with uranyl acetate and treated with Polylyte T.200 and 1200 overnight before polymerization. Sections were prepared using Potebulum MT 1 microtome, collected on 300 mesh grids and stained again with uranyl acetate and Reinold's stain solution. The sections were studied in a Phillips EM 400 T electron microscope.

#### RESULTS

The titres were calculated according to the method of Reed-Muench<sup>16</sup>, starting with one vaccine (ERA strain), which titre,  $10^{4.5}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml, was inoculated intra-cerebrally in 5-to-9-day-old baby mice.

This strain of virus inoculated in McCoy cell line didn't increase its titre at first and second successive passages. Already in the third passage the titre increased significantly and improved in the 7<sup>th</sup> passage, which titre was  $10^{8.0}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml, also obtained in mice brains (table 2, figure 2).

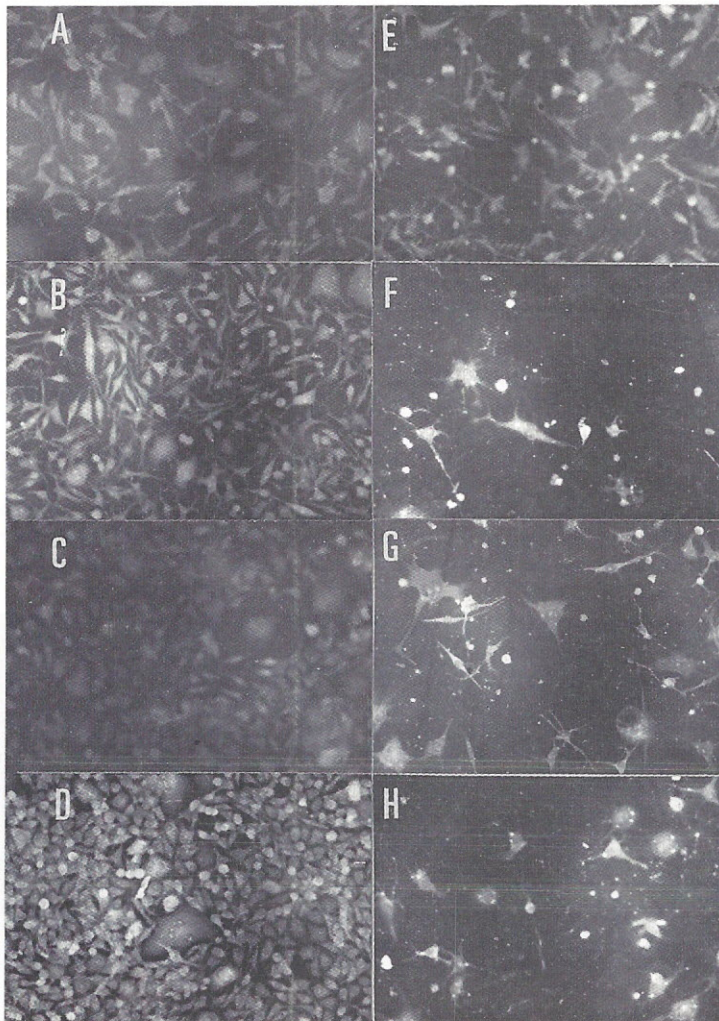


FIGURE 2  
Kinetics of Viral Infection

Seventh passage of rabies virus, ERA strain, in McCoy cell line stained with direct immunofluorescent reaction (FA). A, B, C and D are CONTROL CELLS with 24, 48, 72 and 98 hours. A - uncompleted monolayer; B - semi confluent cells; E, F, G and H - INFECTED CELLS with rabies virus with 24, 48, 72 and 98 hours (titre =  $10^{8.0}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml)

Table I shows morphologic alterations. The cytopathic effect (CPE) with one to four plus (+ to +++) was observed in these cells until the 7<sup>th</sup> day of observation, after the inoculation of ERA strain of rabies virus, and until the 6<sup>th</sup> subsequent passage.

It was observed that the CPE began in the first 48 hours (second day) after virus inoculation and became more evident (++) in the first passage, only on the 5<sup>th</sup> day of observation and increased on the 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days. In the 3<sup>rd</sup> passage it was verified that CPE was evident (++) on the 4<sup>th</sup> day after inoculation. In the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> subsequent passages the CPE was evident on the second day after virus inoculation. Cultures showed CPE (++) already improved to 3 or 4 plus, with about 75% to 100% of the cells altered. The altered morphology by CPE was observed on the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> days of observation. It is important to note that in all these passages the controls of normal cells didn't show any alteration of CPE or toxic degeneration, as it can be observed in figure 1C.

The cytopathic effect is described in figures 1, 2 and 4.

According to obtained evidences it can be assumed that the McCoy cellular system shows high sensivity to the replication of rabies virus. It can also be assumed that the virus replication in these cells is followed by morphologic alteration, which is easily observed in optic microscopy.

The first kinetics results show the immunofluorescence antibody reaction (FA) as can be seen in figure 2 and the respective controls, with 24, 48, 72 and 96 hours after virus inoculation. In figure 2, A, B, C and D are control cells and E, F, G and H are infected ones. Cellular alteration was clear and could easily be seen. The samples showed improved CPE. The titre of each sample harvest in these intervals is shown in figure 3, where data was plotted

showing the increase of the virus titre 96 hours after virus inoculation.

It was observed that in the first 12 hours after the virus inoculation a decrease of the size of McCoy cells occurs when compared to the peak of infection (in 48 hours after virus inoculation). It was observed that the cells' size seemed to increase when compared to the respective control, as can be confirmed in figure 1, suggesting that the cellular permeability increases until the cellular lise.

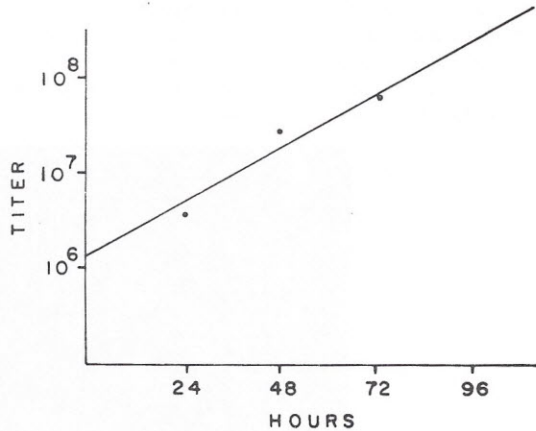


FIGURE 3  
Plot of the titre obtained (log of dilution) from the each point of the kinetics.

As observed in figure 3, the titre of the virus replication in this passage was  $10^{8.0}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml. Figure 4 shows a photomicrography (optic microscopy) of an immunofluorescence reaction of the McCoy cells with the rabies virus (ERA strain) and the respective control cells.

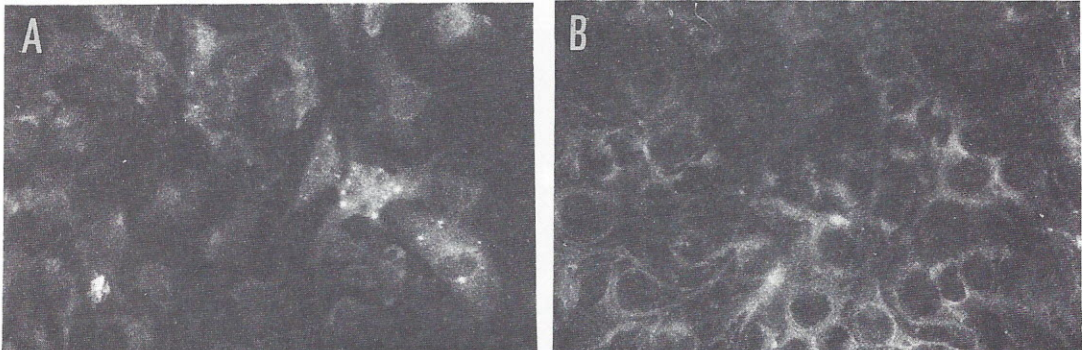


FIGURE 4  
Photomicrography of McCoy Cells Infected with Rabies Virus.

ERA strain (A) and control cell (B), stained by immunofluorescence reaction, with immersion oil and objective 100x. The infected cell develops a star-like aspect (fig. 4A) and seems to be large than the control cells, not infected (fig. 4B).

The second kinetics results show the peak of inhibition of protein cells' synthesis (% of control)

that occurs 48 hours after virus inoculation, as shown in figure 5.

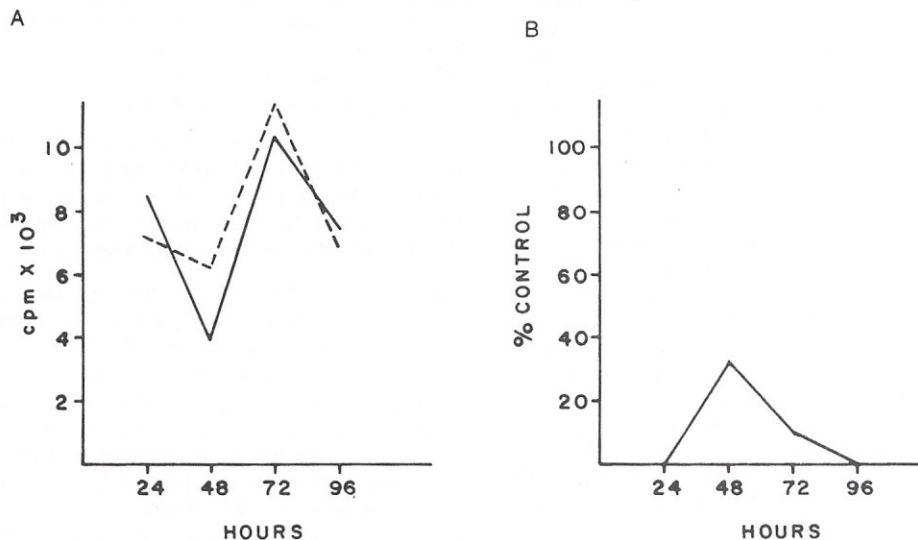


FIGURE 5  
Kinetics of Inhibition of Protein cell's Synthesis.

Using radioactive label (Leu-<sup>35</sup>S). A - cpm counting (---) infected cells and (—) control cells. B - The % of control, showing the inhibition of protein of cellular synthesis.

Figure 1 shows three photomicrographies in optic microscopy of McCoy cells infected with rabies virus, ERA strain (1A and 1B) and the control (1C), Observe the clear CPE in the cells caused by rabies virus.

The 7<sup>th</sup> passage of the ERA virus in McCoy cells was inoculated again, in mice brains, when the ani-

mals showed signs of infection (paralytic symptoms). The brains were harvested and included in glutaraldehyde 2% and processed for electron microscopy. In figure 6 it is possible to observe infected neurons by numerous particles with typical rabies virus morphology (Rabdovirus).

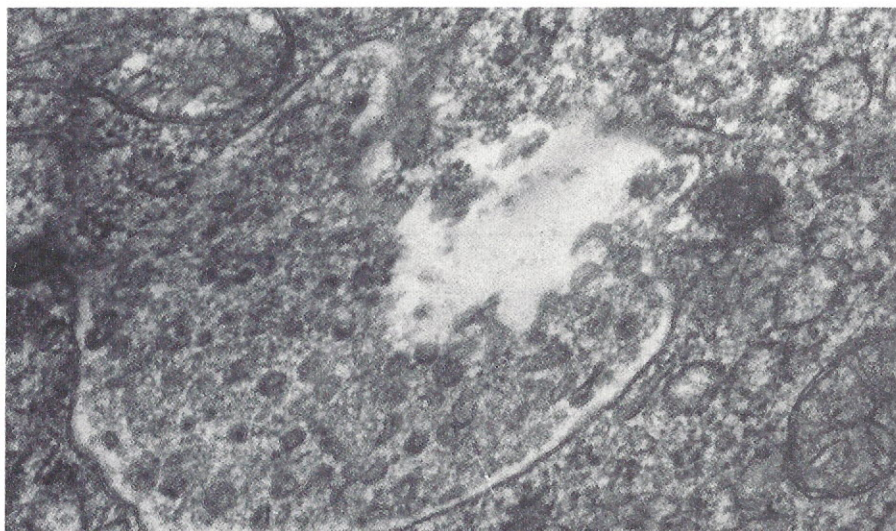


FIGURE 6

Electron Micrograph of a Section from an Infected Brain Mice Inoculated with the 7<sup>th</sup> Passage of Rabies Virus on the McCoy Cell Line.

DISCUSSION

There is no doubt about the affirmation and demonstration that the continuous McCoy cell line, when inoculated with rabies virus "vaccine" or "street virus" shows cytopathic effects in normal conditions of tissue culture, not described until the present moment, in the specialized literature. Although many works have showed the persistent or chronic infection<sup>9,10</sup>, the occurrence of CPE in cells, such as in WI-38 was only obtained around the 17<sup>th</sup> seried passages.<sup>22</sup> On the other hand, the results of Kawai *et al.*<sup>14</sup> in 1982, where it was assumed that CPE was obtained, cannot be compared with the results presented here because those authors used artificial and different conditions, such as the elevation of temperature incubation of the used system from 34-36°C to 39-40°C. Yet, it was mentioned that a decrease of CPE could be obtained when defective interferent particles virus (DI) were inoculated in the used culture. Wiktor *et alii*<sup>22</sup> preferred to attribute the absence of CPE to the production of endogen interferon. It is interesting to note that Fernandes, 1959<sup>6,7</sup>, working with McCoy cell line with bluetongue virus, assumed that these cells were very sensitive. When irradiated by ultra violet radiation (UV), the cell became a giant cell during the infection. This doesn't occur with human amnion cells, which are more sensitive to the bluetongue virus in normal conditions, yet less sensitive than McCoy cells after UV radiation.

In this work there is no interest so as to confirm these matters because the infection by rabies virus causes visible and constant CPE in this cellular system, as well as in primary isolation from cephaloraquidian liquid (CRL) of a suspected patient.

The results proved that the McCoy cell, initially after the inoculation suffered a decrease in its size,

which later increased during the development of the infection. This fact was observed and described in relation to the mass production of poliovirus by Dunnenbacke *et al.*<sup>5</sup> The observation of the increase of McCoy cell size may be related to high titre production and higher sensitivity to rabies virus in this cells.

Atanasiu *et al.*<sup>4</sup> made studies with three different kinds of cell lines: VERO, HAK, BHK-21. They obtained good results in virus replication as well as good titres and showed that established cell lines could be an efficient method to obtain purified rabies virus.

Due to the high sensivity of this cellular system with easy observation of CPE and the easy obtainment of end point, it can be used in titration of rabies virus, as a substitute for the classic inoculation in mice brains. Although our experience with isolation of rabies virus from biological material has been only from human CRL, it can be suggested that these cells could be an alternative process for inoculation and rapid diagnosis of this infection. So, to perform the neutralization proof in these cells using hiperimmune serum of human use produced by Instituto Vital Brazil to identify the isolated virus, the possibility to perform reactions of titration or neutralization antibody assay against this infection, either in humans or animals, is enlarged.

Aknowledgements

The author is grateful to Miss Evelyn Oliver Sarmento, M.V., for the supply and animal care of out-bred Swiss-Webster mice used in this experiments, to Mr. Sergio Vianna from Instituto Biológico, who was responsible for the photographs and to Mr. Luis Florencio de Salles Gomes for his comments and revision of the text.

TABLE I  
Viral Titre

Passages of ERA strain in McCoy cells line	Titre in LD <sub>50</sub> /0.30 ml mice brain inoculation
ORIGINAL VACCINE*	10 <sup>4.5</sup>
1 <sup>st</sup> passage	10 <sup>4.6</sup>
2 <sup>nd</sup> passage	n.d.**
3 <sup>rd</sup> passage	10 <sup>5.17</sup>
4 <sup>th</sup> passage	n.d.**
5 <sup>th</sup> passage	10 <sup>6.0</sup>
6 <sup>th</sup> passage	10 <sup>6.21</sup>
7 <sup>th</sup> passage	10 <sup>8.0</sup>

\* BIO-RABDO-VET vaccine of veterinarian use (ERA strain in pig kidney cells).

\*\* Not determined

TABLE 2  
Cytopathic Effect Observed in McCoy Cell Line

Passages of ERA strain in McCoy cell line	Days after incubation						
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>	6 <sup>th</sup>	7 <sup>th</sup>
1 <sup>st</sup> passage	-	+	+	+	+	+++	++++
2 <sup>nd</sup> passage	-	+	+	+	+	+++	++++
3 <sup>rd</sup> passage	-	+	+	+	+	++++	
4 <sup>th</sup> passage	-	+	+	+	+	+++	
5 <sup>th</sup> passage	-	+	+	+++	++++		
6 <sup>th</sup> passage	-	+	+++	+++	++++		

System: successive passages of rabies virus, ERA strain, in McCoy Cell line.

RIALA6/721

NOGUEIRA, Y.L. - Vírus da raiva em linhagem celular McCoy: Parte I - Efeito citopático e replicação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 9-16, 1992.

RESUMO: O efeito citopático provocado pelo vírus da raiva não é de fácil detecção, embora a linhagem celular McCoy tenha mostrado elevada sensibilidade a esse vírus. O título aumentou a cada passagem, a cepa ERA alcançou titulação superior a  $10^{8,0}$  DL 50%/0,03 ml após oito passagens sucessivas. A cinética de infecção mostrou que, 48 horas após a inoculação, as células atingem o pico de infecção e a síntese de proteínas celulares é inibida. Os dados são reproduzíveis, sugerindo que essa linhagem possa ser empregada para fins de diagnóstico e para produção de massa viral.

DESCRITORES: *Linhagem celular McCoy. Efeito citopático (ECP). Vírus rábico. Cepa ERA. Produção de massa viral.*

#### REFERENCES

1. AMERICAN type Culture Collection - Catalogue of Cells Lines & Hybridoms. 5th ed. Rockville, Md., ATCC, 1985. p. 162.
2. ATANASIU, P.; LEPINE, P. & DRAGONS, P. - Étude Cinétique du Virus Rabique en Culture de Tissus à l'Aide des Anticorps Fluorescents des Coupes Ultra-Fines. *Ann. Inst. Pasteur T* 105: 813 - 824, 1963.
3. ATANASIU, P.; TSIANG, H. & GAMET, A. - Nouveau Vaccin Antirabique Humain de Culture Cellulaire Primaire. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 125 B : 419 - 432, 1974.
4. ATANASIU, P.; PERRIN, P.; SEGRE, L. & MANGANAS, O. - Étude Comparative de Vaccins Rabiques Inactivés Obtenus à l'Aide de Cellules Hétérologues Diploides et Polyploides (HAK, BHK et Vero). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 58: 401 - 421, 1981.
5. DUNNEBACKE, T. H. & REAUME, M. B. - Correlation of the Yield of Poliovirus with the Size of Isolated Tissue Cultures Cells. *Virology* 6: 8 - 13, 1958.
6. FERNANDES, M. V. - Irradiation of cells in tissue culture VII - Studies on the Susceptibility to Bluetongue Virus on Radiation Induced Giant Cells *in vitro*. *Z. Zellforsch.* 50: 433 - 443, 1959.
7. FERNANDES, M. V. - Isolation and Propagation of Bluetongue Virus in Tissue Culture. *Amer. J. vet. Res.* pp. 398 - 408, 1959.
8. FERNANDES, M. V.; WIKTOR, T. J. & KOPROWSKI, H. - Endosymbiotic Relationship Between Animal Viruses and Host Cells. *J. exp. Med.* 120: 1099 - 1115, 1964.
9. FRIEDMAN, R. M. & RAMSEUR, J. M. - Mechanisms of Persistent Infections by Cytopathic Viruses in Tissue Culture. *Arch. Virol.* 60: 83 - 103, 1979.
10. HONDA, Y.; KAWAI, A. & MATSUMOTO, S. - Persistent Infection of Rabies Virus (HEP - Flury Strain) in Human Neuroblastoma Cells Capable of Producing Interferon. *J. gen. Virol.* 66: 957 - 967, 1985.
11. HOLLAND, J. J.; VILLARREAL, L. P.; WELCH, R. M.; OLDSTONE, M. B. A.; KOHNE, LAZZARINI, R. & SCOLNIK, E. - Long-term Persistent Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Infection of Cell "in vitro". *J. gen. Virol.* 33: 193-211, 1976.
12. KAWAI, A.; MATSUMOTO, S. & TANABE, K. - Characterization of Rabies Viruses Recovered from Persistently Infected BHK Cells. *Virology* 67: 520 - 533, 1975.
13. KAWAI, A. & MATSUMOTO, S. - Interfering and Non-interfering Defective Particles Generated by Rabies Small Plaque Variant Virus. *Virology* 76: 60 - 71, 1977.

14. KAWAI, A. & MATSUMOTO, S. - A Sensitive Bioassay for Detecting Defective Interfering Particles of Rabies Virus. *Virology* 122: 98 - 108, 1982.
15. KISSLING, R. E. - Growth of Rabies Virus in Non-Nervous Tissue Culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98: 223 - 225, 1958.
16. REED-MUENCH - Methods for Calculation of End Point. In KAPLAN, M. & KOPROWSKI, H. Ed. - Laboratory Techniques in Rabies, 3rd. ed., Geneva WHO, 1973, pp. 348 - 354 (Monograph Series).
17. NOGUEIRA, Y. L. - Cytopathic Effect on Tissue Culture caused by Rabies Virus. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON IMPACT OF VIRAL DISEASES ON DEVELOPMENT OF LATIN AMERICA COUNTRIES AND CARIBBEAN REGION, 1st. Abstracts. Rio de Janeiro, Brazil, 1982. Oswaldo Cruz Foundation, pp. 113.
18. NOGUEIRA, Y. L. - Replication and Purification of Rabies Virus in McCoy Cell Line. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF VIROLOGY, 7th. Edmonton, Canada, 1987. Abstracts. Edmonton, Canada, 1987, pp. 324.
19. MONTAGNON, B. J.; FANGET, B. & VINCET FALQUET, J. C. - Industrial Scale Production of Inactivated Poliovirus Vaccine Prepared by Culture of VERO Cells on Microcarrier. *Rev. Infect. Dis.* 6: S341 - S244, 1984.
20. VILLARREAL, L. P. & HOLLAND, J. J. - RNA Synthesis in BHK-21 Cells Persistently Infected with Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus. *J. gen. Virol.* 33: 213 - 224, 1976.
21. WAAGNER, E. K. & RIZMAN, B. - Ribonucleic acid synthesis in cell infected with herpes simplex virus. I. Pattern of RNA synthesis in productively infected cells. *J. Virol.* 4, 36-46.
22. WIKTOR, T. J.; FERNANDES, M. V. & KOPROWSKI, H. - Cultivation of Rabies Virus in Human Diploid Cell Strain WI-38. *J. Immunol.* 93: 353 - 366, 1964.
23. WIKTOR, T. J. & CLARK, H. F. - Chronic Rabies Virus Infection of Cell Culture. *Infect. Immun.* 6: 988 - 995, 1972.
24. YOUNGNER, J. S. & PREBLE, O. T. - Viral Persistence: Evolution of Viral Population. In: FRAENKEL-CONRAT, H. & WAGNER, R. R. - Comprehensive Virology. New York, Plenum Press, 1980. V. 18, pp. 73 - 125.

Recebido para publicação em 10 de agosto de 1991.

## NÍVEIS DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM GORDURA DE FRANGO, 1988 - 1991\*

Heloisa H. C. BARRETTO \*\*  
Odete N. K. INOMATA \*\*  
Vera R. R. LEMES \*\*

Riala 6/735

BARRETTO, H.H.C. e col. — Níveis de pesticidas organoclorados em gordura de frango 1988-1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2): 97-100, 1992.

**RESUMO:** Centro e treze amostras de gordura de frango obtidas em frigoríficos localizados nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Paraná foram analisadas no período de 1988 a 1991, quanto aos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados.

Foram detectados HCH total em 46,9%, HCB em 3,5%, Dieldrin em 43,3% e DDT total em 26,5% e as medianas diminuíram ou permaneceram constantes no período citado.

Os níveis encontrados estão abaixo do estabelecido pelas normas do Ministério da Agricultura e do *Codex Alimentarius*, exceto em duas amostras analisadas em 1988 e uma em 1991 que tiveram valores de Dieldrin acima do limite.

**DESCRIPTORIOS:** *Gordura de frango. Monitoramento de resíduos de pesticidas organoclorados. Resíduos. Determinação.*

### INTRODUÇÃO

Os pesticidas organoclorados manufaturados há muitos anos, ideais para o controle das pragas, hoje estão proibidos em muitos países por sua persistência e depósito no tecido adiposo<sup>8</sup>.

Como são dificilmente degradáveis, podem, por efeito cumulativo, atingir níveis elevados no ambiente e então serem concentrados pelos sistemas biológicos. Desta maneira acabam entrando nas cadeias alimentares onde se acumulam<sup>1</sup>. Existem poucos dados toxicológicos sobre intoxicação crônica em humanos, mas em aves foi demonstrado que há uma alteração do metabolismo do cálcio, fazendo com que os ovos fiquem com a casca fina e quebradiça afetando, a fertilidade. Além disso, os pesticidas organoclorados são indutores de enzimas microsossomais hepáticas, alterando assim o metabolismo dos hormônios esteroidais<sup>7</sup>.

Diante da crescente preocupação internacional pela contaminação do meio ambiente e a demanda cada vez maior de informações sobre a maneira de combatê-la, a Organização das Nações Unidas criou dentro do seu

Programa Ambiental (UNEP) o Global Environment Monitoring System (GEMS) estabelecendo um programa de monitoramento do ar (GEMS/Air), da água (GEMS/Water) e dos Alimentos (GEMS/Food). O GEMS/Food é realizado em conjunto com a FAO (Organização para a Agricultura e Alimentos) e a WHO (Organização Mundial da Saúde) e reúne dados obtidos nos países participantes, permitindo avaliar as tendências globais da contaminação de alimentos. Entre seus objetivos está colocada a colaboração com os governos em seus esforços para desenvolver programas nacionais de vigilância da contaminação dos alimentos e promover a integração de seus resultados no sistema global. Entre os contaminantes estudados os pesticidas foram considerados prioritários, por serem bastante empregados.

Por outro lado, órgãos governamentais de diferentes países têm mostrado um grande interesse na orientação de uso e também no controle dos resíduos, principalmente dos organoclorados em alimentos de consumo humano, pois, embora várias legislações proibam o uso destes pesticidas, a pesquisa dos resíduos deve ser mantida em razão da sua persistência.

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

No caso de alimentos, além da preocupação com o consumo, há problemas na comercialização dos mesmos. Já em 1965 Sutherland<sup>10</sup>, analisando a importância e o efeito da comercialização de produtos alimentícios mostrou a posição de alguns países importadores no que se refere à regulamentação e análise de resíduos de pesticidas.

Os exportadores passaram a solicitar sistematicamente análise de seus produtos a fim de atender às exigências quanto aos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados dos mercados compradores.

Com o aumento do consumo e exportação de carne de frango, e com as restrições quanto ao uso de pesticidas organoclorados, foram analisadas amostras de gordura de frango para exportação provenientes dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina no período de 1988 a 1991.

Os dados obtidos foram enviados ao programa GEMS/Food.

## MATERIAL E MÉTODO

### 1. Amostras

Gorduras de frangos embalados em papel laminado, adequadamente identificadas, foram enviadas congeladas ao laboratório no período de 1988 a 1991, assim distribuídas: 25 em 1988, 36 em 1989, 22 em 1990 e 30 em 1991, num total de 113 amostras.

### 2. Método

Fundir a 60°C cerca de 200 g da amostra homogeneizada e filtrar ainda quente sobre 20g de sulfato de sódio anidro.

Pesar 2,0 g de gordura em bquer de 10 ml e transferir com n-hexano para um balão volumétrico de 25 ml. Completar o volume.

Transferir 15 g de sílica gel (ativada durante oito horas a 130°C) desativada com 10% de água para coluna

cromatográfica de vidro de 20 mm de diâmetro interno, batendo nas laterais para perfeito empacotamento da sílica. Colocar 1 g de sulfato de sódio anidro granulado no topo da coluna. Passar uma alíquota de 5 ml correspondente a 0,4 g de gordura através da coluna cromatográfica eluindo com 200 ml da mistura: diclorometano: n-hexano (1:4). Concentrar em rotavapor a 45°C e adicionar aproximadamente 5 ml de n-hexano ao extrato concentrado e concentrar novamente. Transferir para proveta ou tubo graduado de 5 ml e completar a 3 ml. Injetar 5 µl no cromatógrafo a gás.

Fazer branco dos solventes e outros reagentes utilizados e recuperação para os pesticidas organoclorados estudados 2.

### 3. Análises cromatográfica

Identificar e quantificar os pesticidas em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons e coluna cromatográfica empacotada com 1,5% de OV17 + 1,95% de OV210 em Chromosorb WHP nas seguintes condições: temperatura do detector: 260°C; temperatura do injetor: 240°C; temperatura da Coluna: 200°C; gás de arraste: nitrogênio, 40 ml/min.

Ajustar a sensibilidade do aparelho de modo a obter uma deflexão de 60% da escala do registrador com 20 pg de aldrin.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram calculados na gordura e sem correção para as recuperações obtidas, que foram da ordem de 80 a 95%.

A tabela 1 mostra as porcentagens dos diferentes princípios ativos encontrados e as tabelas 2 e 3 reúnem os dados da mediana, nonagésimo percentil e valores mínimos e máximos, obtidos nas 113 amostras de gordura de frango analisadas durante os anos de 1988 a 1991.

TABELA 1  
Porcentagem de amostras de gordura de frango contendo HCB, HCH total, DDT total, Dieldrin no período de 1988-1991

ano	n.º de amostras	HCB	HCH total	DDT total	Dieldrin
1988	25	0	96	84	56
1989	36	3	30	50	8
1990	22	18	18	32	32
1991	30	0	43	0	27

TABELA 2  
Mediana, 90º percentil, valores mínimos e máximos de HCB e Dieldrin em gordura de frango no período de 1988-1991 em µg/kg(ppb)

ano	n.º de amostras	HCB				Dieldrin			
		mediana	90º percentil	mínimo	máximo	mediana	90º percentil	mínimo	máximo
1988	25	< 1	< 1	< 1	< 1	4	2	< 1	1450
1989	36	< 1	< 1	< 1	10	< 1	< 1	< 1	13
1990	22	< 1	10	< 1	50	< 1	< 1	< 1	90
1991	30	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	70	< 1	300



TABELA 3  
Mediana, 90º, percentil, valores mínimos e máximos de HCH Total e DDT Total em gordura de frango no período de 1980-1991 em µg/kg(ppb)

ano	n.º de amostras	HCH total				DDT total			
		mediana	90º percentil	mínimo	máximo	mediana	90º percentil	mínimo	máximo
1988	25	14	63	< 1	118	14	84	< 1	200
1989	36	< 1	29	< 1	70	< 1	70	< 1	155
1990	22	< 1	10	< 1	10	< 1	40	< 1	220
1991	30	< 1	100	< 1	160	< 1	70	< 1	300

Foram detectados isômeros alfa, beta e gama HCH, reportados como HCH total e os isômeros (o-p') e p-p' DDT e metabólitos p-p' DDE e p-p' DDD expressos como DDT total sendo que o p-p' DDE foi encontrado com maior frequência, 36,3% das amostras analisadas.

Os níveis de gama HCH e DDT total em gordura de frango estão bem abaixo dos estabelecidos como máximos pelo *Codex Alimentarius* que é de 0,7 mg/kg para gama HCH e 5,0 mg/kg para DDT total na gordura de carcaça de frango<sup>5</sup> e indicam uma pequena contaminação.

Dos resultados encontrados, somente três amostras tiveram valores de Dieldrin, 1,45 mg/kg e 1,14 mg/kg em 1988 e 0,30 mg/kg em 1991, acima do limite estabelecido para resíduos de compostos de uso veterinário e pesticida do Ministério da Agricultura 4 e do *Codex Alimentarius*<sup>5</sup> que é de 0,2 mg/kg (ppm) para gordura de carcaça de frango.

Análises realizadas em maravalha ou cama das aves, usadas nas granjas, mostrou ser esta a maior

fonte de contaminação com resultados altos para aldrin<sup>11</sup>. Este pesticida é largamente usado para conservação de madeira<sup>12</sup>, de onde é tirada a maravalha. No organismo animal o aldrin é convertido a dieldrin que é o seu análogo epóxido<sup>9</sup>. Provavelmente seja esta a explicação para o aparecimento deste pesticida nas amostras estudadas.

Além disto, estas tabelas mostram que os valores das medianas dos diferentes pesticidas encontrados permaneceram constantes para HCB e diminuíram para HCH total, DDT total e dieldrin com o passar dos anos.

Para avaliação da curva de distribuição entre número de amostras e os valores encontrados foi calculado o nonagésimo percentil que significa o nível abaixo do qual 90% das amostras estão distribuídas<sup>6</sup>. Comparando os valores encontrados durante os anos de 1988 a 1991 no Brasil com os dados dos Estados Unidos e Hungria no período de 1986 a 1988<sup>6</sup> conforme a figura 1, verifica-se que os valores no Brasil estão abaixo dos desses países para HCB. Entretanto, para HCH total e dieldrin estão praticamente equivalentes ou maiores, conforme figuras 2, 3 e 4.

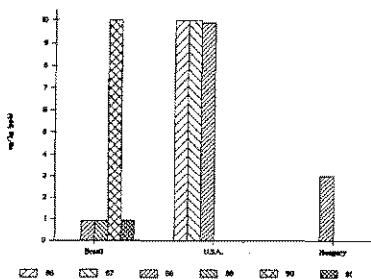


FIGURA 1-Comparação dos dados do 90º percentil de HCB em gordura de frango no Brasil (1988-91) com os dos USA (1986-88) e da Hungria (1988). (Programa de Monitoramento JOINT FAO/UNEP/WHO).

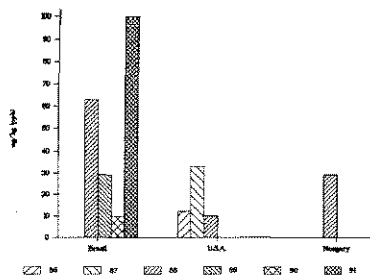


FIGURA 2-Comparação dos dados do 90º percentil de HCH total em gordura de frango no Brasil (1988-91) com os dos USA (1986-88) e da Hungria (1988). (Programa de Monitoramento JOINT FAO/UNEP/WHO).

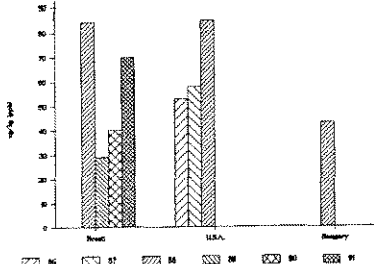


FIGURA 3-Comparação dos dados do 90º percentil de DDT total em gordura de frango no Brasil (1988-91) com os dos USA (1986-88) e da Hungria (1988). (Programa de Monitoramento JOINT FAO/UNEP/WHO).

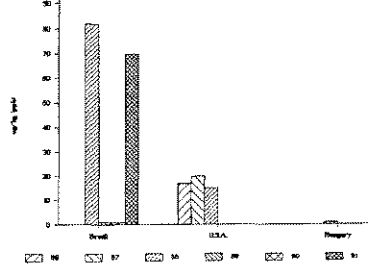


FIGURA 4-Comparação dos dados do 90º percentil de Dieldrin em gordura de frango no Brasil (1988-91) com os dos USA (1986-88) e da Hungria (1988). (Programa de Monitoramento JOINT FAO/UNEP/WHO).

CONCLUSÃO

Este estudo indica que baixos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados podem ocorrer apesar de sua proibição de uso destes pesticidas no Brasil<sup>3</sup>. Os valores encontrados estão decrescendo com o decorrer dos anos, mostrando que as medidas tomadas pelo governo estão dando resultados positivos.

Como se tratam de amostras destinadas à exportação, será necessário dar continuidade à pesquisa em amostras comercializadas em nosso país. A partir disto será possível saber se os cuidados tomados com frangos destinados ao comércio interno estão nas mesmas condições que os frangos exportados.

RIALA 6/735

BARRETTO, H.H.C. *et al.* — Levels of organochlorine pesticide residues in chicken fat 1988-1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*,

ABSTRACT: One hundred and thirteen samples of chicken fat from Minas Gerais, São Paulo, Paraná and Santa Catarina states were monitored for organochlorine pesticide residues during 1988-1991 years.

Levels of total HCH were detected in 46,9%, HCB in 3,5%, Dieldrin in 43,3% and total DDT in 26,5% of the samples.

Results were lower than permitted levels according to Agriculture Ministry Norms and *Codex Alimentarius*, except for three samples with dieldrin.

The medians of HCB, total HCH, Dieldrin and total DDT had a decreasing trend or remained stable during that period.

DESCRIPTORS: *Chicken fat. Monitoring of organochlorine pesticide residues. Residues. Determination.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, W.F. — Acúmulo de inseticidas no homem e sua significação epidemiológica. *Biológico*, 40:171-83, 1974.
2. BARRETO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K. & LEMES, V.R.R. — Estudo comparativo de métodos para determinação de pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2): 69-74, 1991.
3. BRASIL, Leis, decretos, etc. — Portaria n. 329 de 02/09/85 do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 03/09/85. Seção I, p. 12941.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Programa de controle de resíduos biológicos em carnes. Brasília, 1991.
5. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, *Codex maximum limits for pesticide residues*. 2nd ed. Rome, FAO/WHO, 1986, vol. 13 (FAO/WHO Food Standards Programme).
6. JOINT FAO/UNEP/WHO FOOD CONTAMINATION MONITORING PROGRAMME. Summary of 1986-1988. Monitoring Data, Geneva, WHO, 1991. (WHO/HPP/FOS/91.4).
7. KUPFER, D. & BULGER, W.H. — Estrogenia properties of DDT and it's analogues. In: Machlan J. (ed.) — *Estrogens in the environment*. New York, Elsevier, 1980. p. 239-263.
8. KUTZ, F.W.; YOBBS, A.R. & STRASSMAN, S.C. — Racial stratification of organochlorine insecticide residues in human adipose tissue. *J. occup. Med.* 19:619-22, 1977.
9. MATSUMURA, F. — Toxicology of insecticides. Metabolism of insecticides by animals and plants. New York, Plenum Press, 1975. p. 165.
10. SUTHERLAND, G.L. — Residue analytical limit of detectability *Residue Reviews*, 10: 85-96, 1965.
11. WILLRICH, F.C. & FLOR, G.L. — Determinação de resíduos de aldrin em maravalha na avicultura Rio Grande do Sul 1989-1991. In: Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas, 15<sup>o</sup>, São Paulo, 1991. São Paulo, GARP, 1991. p. 78-83. (Relatório).
12. WORTHING, C.R. — *The Pesticide Manual*. London, Crydon, 7<sup>th</sup> ed. British Crop Protection Council, 1983.

Recebido para publicação em 1<sup>o</sup> de agosto de 1991.