



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 53

NÚMERO 1/2

JANEIRO/DEZEMBRO 1993



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 – 1992, 1-52

1993, 53(1/2): 1-84

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, AGRINDEZ, 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

LENI HELENA CALIXTO SOUZA DIAS
Diretora Geral do Instituto Adolfo Lutz

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 SAKUNA

KINUE IRINO

PAULO TIGLEA

EDITORA LETRAS & LETRAS

DIRETOR EDITORIAL

Carlos José Linardi

SUPERVISÃO GRÁFICA

Waldenes Ferreira Japyassú Filho

DIAGRAMAÇÃO

Telma L. Vidal

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

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

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

Página de rosto

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

Texto

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

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

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

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

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

TABELAS – Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelo respectivo título, que deverá indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não deverão ser repetidos em gráficos, a não ser em casos especiais. Na montagem das tabelas, seguir as normas brasileiras para apresentação tabular (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – Normas de apresentação tabular, Rio de Janeiro, IBGE, 1979, 22 p.).

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

- quando, pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;
- Z quando o dado for rigorosamente zero;
- ... quando não se dispuser do dado;
- 0,0 quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.;
- X quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

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

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

Os gráficos, mapas, desenhos deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal, com letras e números escritos com normógrafo.

As fotografias deverão ser nítidas e de bom contraste. No caso de diapositivos, estes deverão ser apresentados e não fotografias dos mesmos.

RESUMOS – Serão apresentados um em português, antecedendo o texto, outro em inglês (encabeçado pelo título do artigo), no final, antes das referências bibliográficas. Não deverão exceder 200 palavras. O estilo será claro e conciso, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos observados e os elementos novos essenciais à conclusão. Serão redigidos pelo próprio autor ou com a colaboração deste, observando-se recomendações da UNESCO (*Bol. UNESCO Bibl.*23:72-7, 1969). A fim de facilitar a indexação, o resumo deverá conter:

Descritores – Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo. Os três principais *descritores* serão escritos em primeiro lugar, por ordem de importância. Recomenda-se para a escolha dos descritores usar o vocabulário próprio do campo especializado.

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

No texto – Serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, e escritas em versal; assim, para um autor... TAUNAY³¹ verificou...; para dois autores... LEME & CARRILHO¹⁹, pesquisando...; para mais de dois autores: No trabalho de TSUNODA *et alii*⁶; ou ainda... segundo vários autores^{1,3,7,8}.

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

Para artigos periódicos

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

Ex.:

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

Para livros

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

Ex.:

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

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Adolfo Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
2. A publicação de artigos na *Revista* está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Este original só será aceito quando tiver o visto da Comissão de Redação.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de nota prévia, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator-secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 30 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator-secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre Direitos Autorais.

DA DISTRIBUIÇÃO

A *Revista do Instituto Adolfo Lutz* é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta com periódicos nacionais ou estrangeiros.

 Rev. Inst. Adolfo Lutz, 53(1/2):01-84, JAN./DEZ./ 1993.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos

- 738 Caracterização Histológica das Folhas e dos Frutos de *Rubus rosaefolius* Smith (*amora-do-mato*).
Histological characterization of the leaves and fruits of *Rubus rosaefolius* Smith.
JORGE, L.L.F. E Col. 1-4
- 739 Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona em Alimentos para Consumo Animal no Sul do Brasil – Parte II.
Aflatoxin, Ochratoxin A and Zearalenone in Animal Feedstuffs in South Brazil. Part. II.
BALDISSERA, M.A. E Col. 5-10
- 740 Determinação de Macronutrientes em Alimentos Normalmente Consumidos pela População Brasileira.
Determination of macronutrient and energy content levels in common Brazilian foods.
MARCHINI, J.S. E COL. 11-16
- 741 Avaliação dos Laudos Analíticos das Amostras de Alguns Tipos de Queijos Recebidos pelo Instituto
Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, 1992.
The Quality of Cheeses analysed in Adolfo Lutz Institute, Ribeirão Preto, Brazil, 1992.
LAICINI, Z.M. E Col. 17-20
- 742 Avaliação do Teor de Colesterol como Parâmetro de Controle de Qualidade para Massas com Ovos.
Evaluation of the Cholesterol Concentration as Quality Control Parameter for Egg Noodles.
BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 21-26
- 743 Avaliação de um Método Simples e Econômico para a Metilação de Ácidos Graxos com Lipídios de
Diversas Espécies de Peixes.
Evaluation of a simple and Inexpensive Method for the Methylation of Fatty Acid With Lipids of
Various Fish Species.
MAIA, E.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 27-35
- 744 Detecção da Presença de Corticosteróides em Preparações Farmacêuticas Alternativas Utilizadas em
Tratamento de Asma Brônquica e Bronquites.
Corticosteroids, detection of, alternative medicine in bronchitis and Asthma.
AURICCHIO, M.T. E Col. 37-40
- 745 Determinação de Valores-Alvo para Uso no Controle de Qualidade de Analisadores Hematológicos.
Determination of Target Values for Use in Quality Control of Hematology Analysers.
MUNHOZ, M.A.G. E Col. 41-47
- 746 Resíduos de Endosulfan em Tubérculos e Frutos.
Residues from Endosulfan on Fruit and Tubers.
LEMES, V.R.R. E Col. 49-54
- 747 Ação "In Vitro" de Diferentes Drogas, Sobre o *Mycobacterium Kansasii*.
Mycobacterium Kansasii, drug susceptibility tests.
SATO, D.N. E Col. 55-58

748	Incidência do Gênero <i>Haemophilus</i> nas Conjuntivites Purulentas em Crianças na Região de Campinas, SP. Incidence of the genus <i>Haemophilus</i> in Purulent Conjunctivitis in Children in the Region of Campinas, SP. RAKIN, M. E Col	59-62
749	Crescimento e Manutenção de Linhagem Celular <i>Aedes Albopictus</i> Clone C6/36 em Diferentes Meios. Growth and Maintenance of <i>Aedes Albopictus</i> Cell Line, Clone C6/36, in Different Media. BARBOSA, M.L. E Col	63-70
750	Freqüência de Anemia em Idosos. The Anaemia Frequency Among Elderly. CANGERANA, F.A. E Col.	71-75
751	Quantificação do Aspartame por Cromatografia Líquida de alta Resolução (CLAR) em Pós para o Preparo de Sobremesas. Determination of Aspartame in Dry Mix to Prepare Desserts. ABREU, R.W. E Col.....	77-80
752	Investigação e Isolamento de <i>Leishmania</i> : Criopreservação de Amostras de Biópsias de Lesões Cutâneas na Leishmaniose Tegumentar Experimental. Investigation and Isolation of <i>Leishmania</i> : Cryopreservation of samples of Biopsies From Skin Lesions in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. ARAUJO, M.F.L. E Col.....	81-84

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DAS FOLHAS E DOS FRUTOS DE *Rubus rosaefolius* Smith (amora-do-mato)*

Luzia Ilza Ferreira JORGE**
Blanca Elena Ortega MARKMAN**

RIALA6/738

JORGE, L. I. F. ; MARKMAN, B.E.D. – Caracterização histológica das folhas e dos frutos de *Rubus rosaefolius* Smith (amora do mato). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2): 1-4, 1993.

RESUMO: Folhas e frutos de *Rubus rosaefolius* Smith foram estudadas anatomicamente com o objetivo de fornecer subsídios para a identificação da espécie. As folhas são compostas e os folíolos têm margens duplamente denteadas. Apresentam como anexos epidérmicos: um tricoma tector unicelular de aproximadamente 400 µm de comprimento, e dois tipos de tricomas glandulares, um de cabeça esférica e outro de cabeça lenticular, sendo ambos pluricelulares. Drusas ocorrem mais abundantemente nas folhas do que nos frutos. As sépalas têm farta cobertura pilosa sobre a epiderme superior. Os frutos não contêm amido.

DESCRIPTORIOS: *Rubus rosaefolius* Smith, amora-do-mato, amora vermelha, folhas e frutos, caracterização histológica.

INTRODUÇÃO

A família *Rosaceae*, representada por frutos requintados e apreciadíssimos como as pêras, ameixas, pêssegos, cerejas, marmelos, damascos e morangos,³ tem poucos representantes nativos de nossa flora⁷.

Entre nós, são muito populares as rosáceas do gênero *Rubus*, conhecidas comumente como amoras-do-mato, e compreendendo três espécies: *Rubus rosaefolius* Smith; *Rubus brasiliensis* Mart. e *Rubus urticaefolius* Sairet¹².

Rubus rosaefolius Smith é arbusto escandente de panículas de flores brancas e frutos vermelhos, ocos por dentro⁸. Os ramos têm pêlos glandulares, são aculeados, têm folhas compostas de 2 a 6 pares de folíolos oval-lanceolados, duplamente denteados⁸. Os frutos são comestíveis e anti-diarréicos^{5, 8, 12}.

Estudos químicos realizados com espécies européias e australianas de *Rubus* revelaram que algumas plantas desse gênero contêm proteínas^{1, 4}, sais minerais¹⁰, taninos e vitamina C^{5, 7, 9}. As

amoras pretas estudadas por YOON & WROLSTAD¹¹ são ricas em saponinas. Observamos uma relativa escassez de estudos toxicológicos sobre esses vegetais.

MATERIAL E MÉTODO

Folhas e frutos de *Rubus rosaefolius* Smith foram coletadas no campus da Cidade Universitária, junto ao estacionamento do Instituto de Biociências.

As infrutescências foram divididas em epicarpo (parte externa, de coloração bordô) e mesocarpo (parte interna, de coloração branca). Separadamente foram trituradas com a espátula e o material pastoso assim obtido foi montado entre lâmina e lamínula em água e em solução de lugol.

As sépalas e as folhas foram estudadas através de cortes obtidos à mão livre, com auxílio de lâmina.

As estruturas anatômicas foram interpretadas e representadas sob as ampliações do microscópio óptico Leitz, com auxílio de câmara clara, lâmina micrométrica e corantes histológicos.

* Realizado na seção de Microscopia Alimentar, Instituto Adolfo Lutz, Capital, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz

RESULTADOS

Folha

As folhas de *Rubus rosaefolius* Smith são compostas e os folíolos têm as margens duplamente denteadas (Fig. 1-A). Observadas ao estereomicroscópio, as nervuras mostram pilosidade concentrada sobre as mesmas.

A epiderme superior é constituída de células de contorno poligonal, com paredes quase retas. É freqüente a presença de pêlos tectores unicelulares de paredes paralelas, base reta e ápice ligeiramente afunilados, relativamente longos (Fig. 1-B).

A epiderme inferior, guarnecida de estômatos anomocíticos, é constituída de células de contorno sinuoso, relativamente menores que as células da epiderme superior (Fig. 1-C).

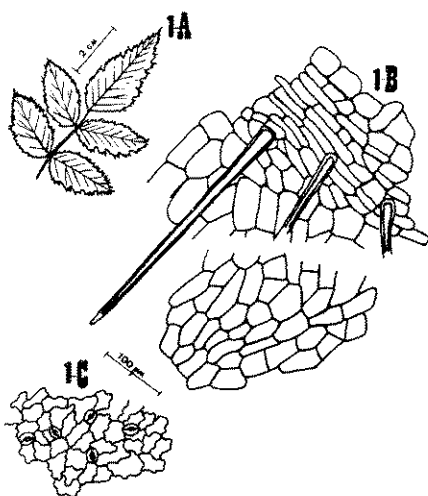


FIGURA 1

Rubus rosaefolius Smith – Folha

1-A – Folha composta – aspecto geral

1-B – Epiderme superior destacando os tricomas tectores (vista facial)

1-C – Epiderme inferior destacando os estômatos anomocíticos (vista facial)

O corte transversal ao nível do limbo foliar revela mesofilo com estrutura dorsiventral e células epidérmicas de dimensões diferenciadas (as células da epiderme superior são maiores que as da epiderme inferior), alongadas ora no sentido periclinal, ora no sentido anticlinal. Há um tipo de tricoma tector unicelular (com aproximadamente 400 µm de comprimento) e dois tipos de tricomas glandulares: um de cabeça arredondada e outro de cabeça com formato lenticular. Ambos são pluricelulares do pedicelo à extremidade capitada. Idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio são freqüentes no parênquima clorofiliano foliar (Fig. 2-B).

A representação esquemática da nervura central (Fig. 2-A) mostra feixe vascular bicoloral com o floema envolvendo totalmente o xilema, parênquima fundamental abundante e colênquima discreto de ambos os lados. As drusas que ocorrem em torno do

feixe vascular são relativamente maiores do que aquelas localizadas na região floemática (Fig. 2-A).

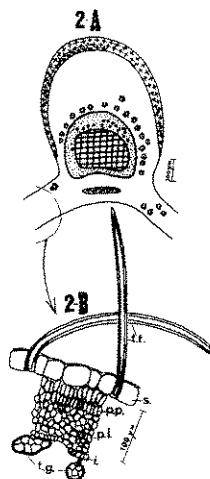
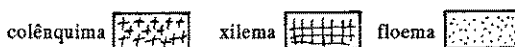


FIGURA 2

Rubus rosaefolius Smith – Folha

2-A – Desenho esquemático da nervura central destacando drusas de duas dimensões



2-B – Corte transversal do limbo foliar

t.t.= tricoma tector; s= epiderme superior; i= epiderme inferior; t.g.= tricoma glandular; p.p.= parênquima paliçádico; p.l.= parênquima lacunoso; d= drusa.

Sépala

Ambas as epidermes das sépalas são constituídas de células alongadas radialmente se observadas em corte transversal, e tangencialmente alongadas quando observadas de face (Fig. 3-A e Fig. 3-B). A epiderme superior das sépalas é fartamente revestida de tricomas tectores curtos (cerca de 50 µm de comprimento), com paredes paralelas e ápice arredondado, lembrando o aspecto de fungos filariformes. Observada de face, essa epiderme apresenta-se recoberta por um emaranhado de tricomas tectores de paredes paralelas, o que confere ao conjunto o aspecto geral de "micélio de fungos filamentosos", chegando mesmo a impedir a visualização das células epidérmicas.

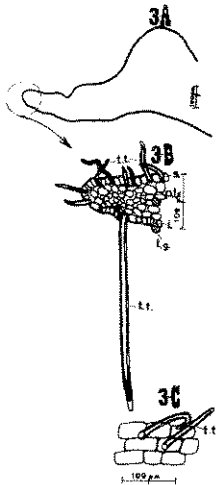


FIGURA 3

Rubus rosaefolius Smith - Sépala

3-A - Contorno da nervura central (fragmento)

3-B - Corte transversal ao nível do bordo da sépala

s= epiderme superior; i= epiderme inferior;

p.l.=parênquima lacunoso; t.t.= tricoma tector; t.g.= tricoma glandular.

3-C - Epiderme superior (vista facial)

Contrastantemente, as células da epiderme inferior das sépala conservam as mesmas características das células da epiderme inferior da folha. Nela ocorrem estômatos anomocíticos e tricomas tectores e glandulares quali e quantitativamente idênticos aos tricomas foliares.

O mesofilo das sépala é do tipo homogêneo lacunoso e os feixes vasculares são colaterais mesmo ao nível das nervuras de maior porte. É freqüente a ocorrência de drusas no parênquima fundamental das sépala.

Fruto

O epicarpo é constituído de células de paredes retas relativamente menores que as células dos envoltórios da semente (Fig. 4-B e Fig. 4-C). O mesocarpo, com aspecto de massa esbranquiçada, é constituído de células parenquimáticas volumosas, arredondadas e/ou alongadas, de paredes muito delgadas. Nessa região ocorrem vasos espiralados e pontoados, sempre estreitos e miúdos. Não há amido.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As drusas são mais abundantes nas folhas do que nos frutos. Nas primeiras elas ocorrem em fileiras em torno dos feixes vasculares; nos frutos elas ocorrem esparsamente, contidas em idioblastos do mesocarpo. De acordo com METCALFE & CHALK⁶ a presença

desses cristais de oxalato de cálcio é freqüente em *Rosaceae*.

De modo geral, *Rubus rosaefolius* Smith obedece aos padrões estruturais da família a que pertence: pêlos tectores simples e unicelulares, pêlos glandulares pedunculados e capitados, mesofilo dorsiventral e estômatos anomocíticos restritos à epiderme inferior⁵.

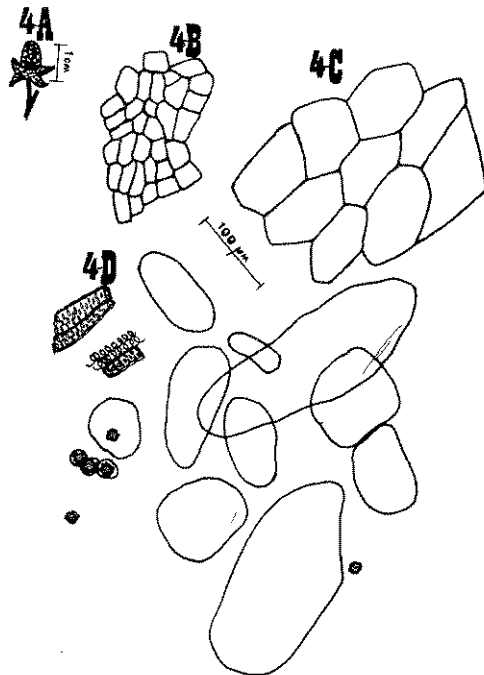


FIGURA 4

Rubus rosaefolius Smith - Fruto

4-A - Fruto - aspecto geral

4-B - Epicarpo (vista frontal)

4-C - Epiderme dos envoltórios da semente

4-D - Células do mesocarpo, vasos e drusas.

São notáveis em *Rubus rosaefolius* Smith a intensa pilosidade da face superior das sépala (com aspecto de micélio de fungos filamentosos) e as avantajadas dimensões das células da epiderme superior da folha quando observadas em corte transversal.

AGRADECIMENTO

À Dra. Lúcia Rossi do Instituto de Botânica (SP-Capital), pela identificação da espécie *Rubus rosaefolius* Smith.

JORGE, L.I.F.; MARKMAN, B.E.D. – Histological characterization of the leaves and fruits of *Rubus rosaefolius* Smith. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 53(1/2): 1-4, 1993.

ABSTRACT: Leaves and fruits of *Rubus rosaefolius* Smith were anatomically studied to supply subsidies to the identification of the plant. The leaves are compounds and their folioles have dentated borders. They present as epidermic annexes: one simple hair with 400 μm of length approximately, and two types of glandular hairs: one with spheric head and another with lenticular hair; pluricellulars both of them. Druses are more abundant in leaves than in fruits. The sepals have ample hairy coverage on the upper epidermis. The fruits do not have starch.

DESCRIPTORS: *Rubus rosaefolius* Smith, redberry, wild berry, leaves and fruits, histological characterization.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – AUGUSTIN, B. – A contribution to the knowledge of the chemical composition of the leaves of *Rubus*. *Botanikal közlemenyek*, 15:94-6, 1916.
- 2 – FOO, L. Y.; PORTER, L. J. – The structure of tannins of some edible fruits. *J. Sci. Food Agric.*, 32(7):711-6, 1981.
- 3 – HOEHNE, F. C. – *Frutas indígenas*. São Paulo, Secretária da Agricultura, Indústria e Comércio, 1946. p. 66-9.
- 4 – JAMES, K. W. – Analysis of indigenous Australian foods. *Technol. Aust.*, 35(7):342-3, 1983.
- 5 – KHÜSTOV, L.; DANEVA, N. & VELCHEV, V. – Study of the chemical composition and taste characteristics of interspecific hybrids in the genus *Rubus* L. *Gradinar. Lozar. Nauka*, 16(1): 3-13, 1979.
- 6 – METCALFE, C. R. & CHALK, L. – *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press, 1950. v.1, p.539-55.
- 7 – NOVRUZOV, E. N. & SHANSIZADE, L.A. – Chemical composition of fruits of some *Rubus* species of the flora of Azerbaidzhan. *Rastif. Resur.*, 21(3):343-6, 1985. Apud *Chem. Abstr. Columbus*, 104:167, 131w, 1986.
- 8 – PENNA, M. – *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3.ed. Rio de Janeiro, Kosmos, 1946. p. 340.
- 9 – SOUTHWELL, I. A. – The constituents of *Rubus rosifolius*. The structure of rosifoliol, a biogenetically significant sesquiterpenoid. *Aust. J. Chem.*, 31(11):2527-38, 1978. Apud *Chem. Abstr.*, *Columbus*, 90:104.145a.
- 10 – TORRE, L.C. & BARRIT, B.H. – Quantitative evaluation of *Rubus* fruit anthocyanin pigments. *J. Food Sci.*, 42(2):488-90, 1977.
- 11 – WUCHERPGENNIG, K. & HSUEH-ERR, C. – Behavior of mineral components in fruit juices. *Fluess. Obst.*, 50(1):15-22, 1983.
- 12 – YOON, K.R. & WROLSTAD, R. D. – Investigation of Harioon blackberry, strawberry and plum fruit for the presence of saponins. *J. Agric. Food Chem.*, 32(3):691-3, 1984.
- 13 – ZURLO, C. & BRANDÃO, M. – *As Ervas comestíveis*. Rio de Janeiro, Globo, 1989. p. 21-4.

Recebido para publicação em 18 de agosto de 1992.

AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARELENONA EM ALIMENTOS PARA CONSUMO ANIMAL NO SUL DO BRASIL – PARTE II

Maria Antonieta BALDISSERA*
Janio M. SANTURIO*
Samira H. CANTO**
Patricia H. PRANKE**
Carlos Alberto A. ALMEIDA***
Cleusa SCHIMIDT****

RIALA6/739

BALDISSERA, M.A.; SANTURIO, J.M.; CANTO, S.H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C.A.A.;
SCHIMIDT, C. – Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearelenona em alimentos para consumo
animal no sul do Brasil – Parte II – *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2): 5-10, 1993.

RESUMO: Os metabólitos tóxicos Aflatoxinas (AFL) B1, B2, G1 e G2, são produzidos por linhagens de fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, Ocratoxina A (OCT) produzida por *A. ochraceus* e várias espécies de *Penicillium* e a Zearelenona (ZEA) pelo *Fusarium graminearum*.

Estas micotoxinas foram pesquisadas em 519 amostras de diferentes substratos constituídos especialmente de milho e ração balanceada, além de outros produtos utilizados na alimentação animal como arroz, sorgo, farelo de trigo e colza, provenientes do Brasil e uma amostra da Argentina durante o período compreendido entre os anos de 1987-1991.

Foi empregado o método SOARES & RODRIGUES-AMAYA para extração e quantificação das micotoxinas, com limites de detecção de 4, 5, 60 p.p.b. para Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearelenona, respectivamente.

Em 68,59% das amostras não foram detectadas estas micotoxinas, mas 24,86% das amostras positivas estavam contaminadas por Aflatoxinas, 1,73% por Ocratoxina A e 4,82% das amostras estavam contaminadas por Zearelenona. O nível máximo de contaminação por Aflatoxinas foi de 1906 p.p.b., de 745 p.p.b. por Ocratoxina A e de 4982 p.p.b. por Zearelenona.

Frente aos resultados obtidos, sugere-se o monitoramento constante destas micotoxinas, principalmente Aflatoxinas, por parte da indústria e a atenção dos produtores de aves e suínos, pois estas micotoxinas comprometem a saúde animal e, por consequência, o desempenho produtivo destes animais.

UNITERMOS: Micotoxinas, Aflotoxinas, Ocratoxina A, Zearelenona, cromatografia em camada delgada.

* Professores DACT e DMVP – Universidade Federal de Santa Maria – Campus – CEP: 97119-900

** Farmacêuticos-Bioquímicos – Bolsistas do CNPq (Bolsa de Aperfeiçoamento)

*** Farmacêutico Bioquímico

**** Bolsista de Iniciação Científica – FAPERGS

INTRODUÇÃO

As micotoxinas constituem-se em um grupo de compostos tóxicos produzidos por linhagens fúngicas que crescem sob condições favoráveis em uma grande variedade de substratos, principalmente grãos¹³.

Afetam com frequência cereais e sementes oleaginosas durante a colheita, armazenamento e industrialização³.

A presença de micotoxinas em produtos alimentícios depende do crescimento de espécies fúngicas específicas e de fatores como umidade e temperatura^{7,17}.

Os metabólitos tóxicos Aflatoxinas (AFL) B1, B2, G1, G2, são produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, Ocratoxina A (OCT) produzidos por *A. ochraceus* e várias espécies de *Penicillium* e Zearalenona (ZEA) pelo fungo *Fusarium graminearum*⁴.

As principais linhagens fúngicas que produzem AFL, necessitam de determinadas condições para seu desenvolvimento, como umidade relativa do ar entre 80 e 90% e temperatura ambiental superior a 20°C^{8,9}. Sendo o Brasil um país de clima tropical, apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento destas micotoxinas.

A AFL B1 é a mais encontrada e também a mais tóxica. Provoca profundas alterações orgânicas traduzidas por hemorragias através da inibição dos fatores II e VII da coagulação sanguínea e lesões no hepatócito; a ingestão de baixas quantidades por longo período determina baixa conversão alimentar nos animais, imunodepressão e câncer hepático. Os rebanhos que consomem grãos contaminados são os mais afetados, principalmente aves e suínos^{11,7}.

A Ocratoxina A provoca lesões extensas nos túbulos renais, especialmente em suínos, impedindo a reabsorção de água pelo organismo^{5,16}.

A Zearalenona possui efeito estrogênico, principalmente em suínos, podendo produzir edema, profapso de vulva, abortos e crescimento das mamas nos machos. Esta toxina é somente produzida em épocas temperadas ou frias, entre 12 e 14°C, semelhantes às encontradas na região sul do país^{4,10}.

Devido à toxicidade destas micotoxinas foram analisados durante cinco anos (1987-1991), alimentos destinados ao consumo animal, através da cromatografia em camada delgada frente as AFL, OCT e ZEA.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 519 amostras de diferentes substratos constituídos principalmente de milho e

ração balanceada, além de outros produtos utilizados na alimentação animal, como arroz, sorgo, farelo de trigo e colza (gráfico 1), provenientes de várias regiões do Brasil e da Argentina (Figura 1), remetidas para o Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no período compreendido entre os anos de 1987 a 1991.

Amostras pesando aproximadamente 1 kg foram coletadas em diferentes pontos do lote de grãos ou ração a serem avaliados. No laboratório foram triturados, homogenizados e retirada uma subamostra de 50g para a determinação das micotoxinas.

A metodologia empregada para a extração é a preconizada por SOARES e RODRIGUES-AMAYA¹⁵, a identificação e quantificação foram realizadas através de cromatografia em camada delgada (CCD)^{1,17}.

TABELA 1

Tipo de alimentos para consumo animal analisados no período de 1987 a 1991.

AMOSTRAS	ANO					TOTAL	%
	1987	1988	1989	1990	1991		
Milho	35	48	42	47	66	238	45,86
Ração balanceada	12	23	35	35	61	166	31,98
Outros alimentos*	06	20	30	09	50	115	22,16
TOTAL	53	91	107	91	177	519	100,00

* : arroz, sorgo, trigo, colza, soja, etc.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para AFL, OCT e ZEA detectados em 163 amostras positivas distribuídas nos anos de 1987 a 1991 são mostradas na Tabela 2, onde N. D. (não detectado) expressa valores inferiores ao limite de detecção em CCD para AFL de 4 ppb, OCT de 5 ppb e para ZEA de 60 ppb.

TABELA 2

Distribuição de Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona detectadas em 163 amostras analisadas no período de 1987 a 1991.

AMOSTRAS	ANO					TOTAL	%
	1987	1988	1989	1990	1991		
Aflatoxinas	15	10	08	17	79	129	79,14
Ocratoxina A	N.D.*	02	07	N.D.	N.D.	09	5,52
Zearalenona	N.D.	08	10	02	05	25	15,34
TOTAL	15	20	25	19	84	163	100,00
%	9,2	12,27	15,34	11,66	51,53		100,00

* N.D.: Não Detectado

ENTRAM GRÁFICO E FIGURA 1

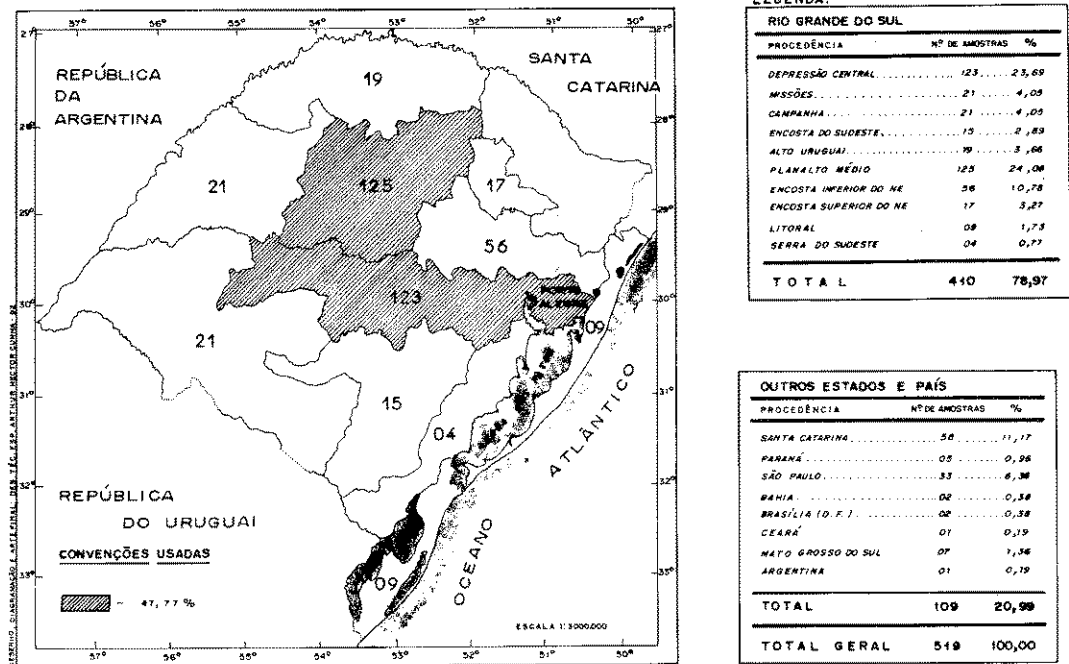


FIGURA 1 - Distribuição segundo a procedência, número de amostras e percentual de amostras analisadas: 1987 - 1991.

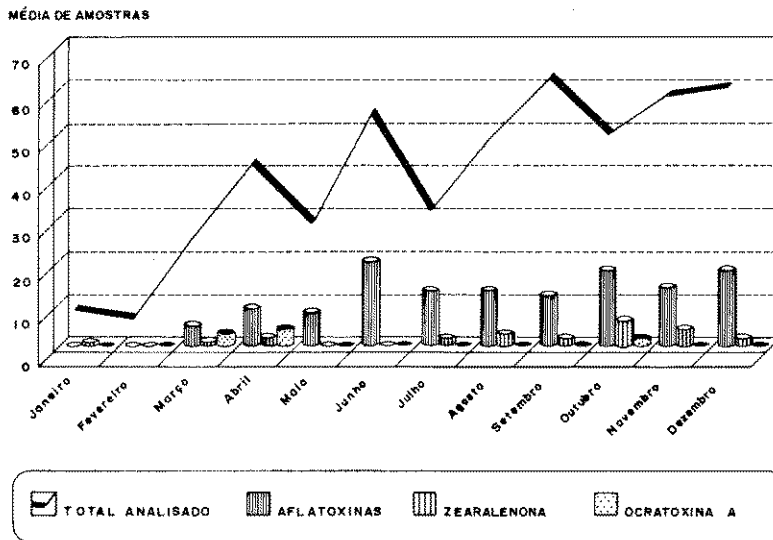


GRÁFICO 1 - Sazonalidade das amostras de alimentos para consumo animal, detectadas com Aflatoxinas, Zearalenona e Ocratoxina A entre 1987 a 1991.

Estes resultados expressam uma positividade de 31,40% frente a estas micotoxinas nos alimentos analisados. As AFL B1, B2, G1 e G2 representam 79,14% (Figura 2) das amostras positivas comprovando, assim, uma predominância desta micotoxina e representando 24,85% do total das amostras analisadas, superando expectativas desta contaminação em outros países como EUA, onde a contaminação chega a apenas 5 a 10% em rações para consumo animal¹⁸.

Isto permite considerar a aflatoxicose como um dos problemas que pode afetar a produção animal.

Nas Tabelas 3 e 4, observa-se a incidência de AFL, OCT e ZEA, utilizando-se como parâmetros os níveis toleráveis no Brasil², bem como valores mínimos e máximos encontrados.

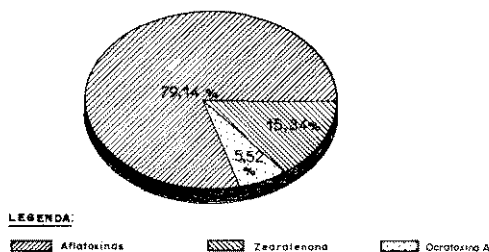


FIGURA 2 - Distribuição das amostras positivas de Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona detectadas no laboratório de micotoxinas da UFSM de 1987-91

FIGURA 2

- Distribuição das amostras positivas de Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona detectadas no laboratório de micotoxinas da UFSM de 1987-91

Os níveis de AFL encontrados foram de até 1906 ppb, em amostras do Rio Grande do Sul, enquanto SABINO *et alii*¹¹ encontraram níveis de até 3200 ppb em amostras de milho procedente da região sul do

país; já SANTOS *et alii*¹² ao analisar milho contaminado em Minas Gerais, revelaram níveis de AFL de 1985 ppb, o que provocou três surtos de aflatoxicose em suínos.

As amostras positivas para OCT alcançaram percentual de 5,52% frente às demais micotoxinas analisadas, sendo que sete amostras provenientes do estado de São Paulo, apresentaram concentrações de até 645 ppb. Esta contaminação ocorreu em resíduos de farelo de bolacha que foi adicionado como veículo ao concentrado para alimentação de suínos. O desenvolvimento desta micotoxina por linhagens de *Aspergillus ochraceus* ocorre especialmente com umidades de 17% no grão e temperatura de 24°C, condições estas que facilmente acontecem na região Sudeste. Já no Rio Grande do Sul, a contaminação de duas amostras talvez esteja correlacionada ao gênero *Penicillium* que, de acordo com a WHO¹⁶, necessita de clima frio para produção de OCT.

Os níveis de ZEA em uma amostra de milho no Rio Grande do Sul alcançaram 4982 ppb, provavelmente devido às condições climáticas do estado, onde a temperatura é baixa no inverno e a umidade ambiental é alta, favorecendo a formação desta micotoxina durante o cultivo e principalmente no armazenamento de grãos. O Rio Grande do Sul é a região brasileira com maior risco de contaminação por ZEA, pois esta micotoxina, para ser produzida precisa de alta umidade e de alternância de dias quentes com noites frias⁶. Estas condições climáticas ocorrem durante quase todo o ano neste estado. SABINO *et alii*¹⁰ ao analisarem ZEA nas regiões Sul e Sudeste encontraram 5% de amostras positivas, enquanto SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹⁵, na região de Campinas, SP, obtiveram resultados negativos para esta micotoxina. No entanto, em 410 amostras analisadas no Rio Grande do Sul (Tabela 3), foram detectadas 6,1% das amostras contaminadas por ZEA.

Quanto à sazonalidade das micotoxinas (Gráfico 1), observa-se que as AFL ocorreram durante quase todos os meses do ano, com variações mínimas de

TABELA 3

Incidência de Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona em Alimentos Analisados pelo Laboratório de Micotoxina da UFSM de 1987 a 1991.

PROCEDÊNCIA	TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS		Nº AMOSTRAS POSITIVAS AFLATOXINAS				Nº AMOSTRAS POSITIVAS ZEARALENONA				Nº AMOSTRAS POSITIVAS OCRATOXINA A			
	Nº	%	< 30 PPB		≥ 30 PPB		< 200PPB		≥ 200PPB		< 50 PPB		≥ 50 PPB	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
RIO GRANDE DO SUL	410	79	75	58,1335	27,13	3	12	22	88	2	22,2	ND*	-	
OUTRAS REGIÕES	109	21	18	13,9401	0,8	ND**	-	ND**	-	1	11,1	6	66,7	

*Valores inferiores a 5 ppb Nº: Número de amostras

** Valores inferiores a 60 ppb%: Percentagem de amostras

TABELA 4

Valores máximo e mínimo de Aflatoxina, Zearalenona e Ocratoxina a Encontrados em 519 amostras. UFSM (1987 a 1991).

MICOTOXINA	PROCEDÊNCIA	VALOR MÍNIMO (ppb)	VALOR MÁXIMO (ppb)
Aflatoxinas	RS *	4	1906
	Outras regiões	5	31,9
Zearalenona	RS	100	4982
	Outras regiões	N.D.**	N.D.
Ocratoxina A	RS	14	21
	Outras regiões	50	745

* Rio Grande do Sul** : N.D.= Não detectado

positividade. Já a ZEA ocorreu, principalmente de julho a dezembro, em amostras provenientes do RS, confirmando que o clima do estado é o fator preponderante para o seu desenvolvimento.

Devido ao pequeno número de amostras contaminadas com OCT não foi possível determinar épocas do ano de maior ou menor incidência.

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que a presença de micotoxinas em alimentos para o consumo animal analisados no Laboratório de

Micotoxinas - UFSM, mostraram um elevado índice de contaminação desses agentes tóxicos.

Em vista dos resultados encontrados, torna-se necessário uma ativa vigilância de alimentos destinados ao consumo animal, pois muitas vezes, a má qualidade destes poderá determinar prejuízos ao produtor rural.

RIALA6/739

BALDISSERA, M.A.; SANTURIO, J.M.; CANTO, S.H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C.A.A.; SCHIMIDT, C. - Aflatoxin, Ochratoxin a and Zearalenone in Animal Feedstuffs in South Brazil. Part. II. - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2): 5-10, 1993.

ABSTRACT: The toxic metabolites of aflatoxins are produced by fungi strains *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* Ochratoxin a (OCT) produced by *A. ochraceus* and different species of penicillium and the Zearalenone (ZEA) by the *Fusarium graminearum*. The mycotoxins were tested in 519 samples. The samples used were mainly corn, feedstuffs, rice, sorghum, wheat flour and colza. The samples were collected during the year of 1987-1991 one being from Argentina and all others from Brazil. The method used was the one described by SOARES & RODRIGUES-AMAYA for extraction and quantification of mycotoxins with the limits of detection being 4, 5, 60 ppb for Aflatoxin, Ochratoxin A and Zearalenone, respectively. In 68,59% of the samples no mycotoxins were detected. However 24,68% of the samples were positive for Aflatoxins, 1,73% for Ochratoxin A and 4,82% were contaminated by Zearalenone. The maximum level of Aflatoxin was 1906 ppb; 745 ppb for Ochratoxin A and 4982 ppb for Zearalenone.

These results indicate the necessity of a constant surveillance of mycotoxins, mainly aflatoxins by the industry. The producers of chickens and swine should be aware that mycotoxins are bad for animal health and also for productivity.

Uniterms: Mycotoxins, Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, Thin-layer chromatography

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALDISSERA, M. A.; SILVA, J.B.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A. A Multidetecção de Aflatoxina A e Zearalenona por cromatografia em camada delgada - *C. Rev. Soc. Bras. Toxicol.*, 2 (2):45-53, 1989.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 34/76, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial, Brasília*, 19 jan., 1977. Seção I. pt. I. p. 710. Fixa padrões de tolerância para as Aflatoxinas em alimentos.
3. EPPLEY, R.M. Screening Method for Zearalenone, Aflatoxin and Ochratoxin: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51(1): 74-8, 1968.
4. MALMANN, C.A. *Influência da administração de Zearalenona em duas fases de gestação sobre o desenvolvimento reprodutivo de porcas*. Tese de Mestrado, Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Medicina Veterinária. 1990, 53 p.
5. MERWE, K.J. Van Der; STEYN, P. S.; FOURIEL, L. Micotoxins. Part II. The constitution of Ochratoxin A, B e C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* with. *J. Chem. Soc.*, London, p. 7083-88, 1965.
6. MIROCHA, C.J. & CHRISTENSEN, C.M. The estrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium Mycotoxins*. Ed. I.F.H. Purchase, Amsterdam, 1974, pp. 129-148, 202 p.
7. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *Cráterios de salud ambiental 11: Micotoxinas*. 1983, 131 p.
8. PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. Pesquisa e dosagem de Aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 20/30:65-71, 1969/1970.
9. RIBEIRO NETO, L.V. Aflatoxinas e Câncer Hepático, *Ciência e Cultura*, 33(8): 1051-3, 1980.
10. SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O. & GARCIA, R.V. Natural occurrence of Aflatoxins and Zearalenone in maize in Brazil, Part II. *Food Additives and Contaminants*, 6(3): 327-31, 1989.
11. SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H. & GIANNATTASIO, C.M.P. Ocorrência de Aflatoxina B1 em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1 e 2): 81-5, 1988.
12. SANTOS, J.L.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVA, J.C.P. & FARIA, J.E. Aflatoxicose em suínos, ocorrência de surtos na Zona da Mata de Minas Gerais. *Arg. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 38(2):167-72, 1986.
13. SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; SILVA, J.B. & BRONDANI, E.R. Detecção de aflatoxinas em rações para consumo animal: Resultados de 1987. *Rev. Centro de Ciências Rurais*. 18(2):169-75, 1989.
14. STOLOFF, L. *Environmental Carcinogens Selected Methods of Analysis*. Lyon, IARC Publications nº 44, cap. 3, 33-62, 1982, 455 p.
15. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ AMAYA, D.B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone and Sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73(1):22-6, 1989.
16. WHO - Environmental Health Criteria 105: *Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichotecenes, Ergot*. Geneve, World Health Organization, 1990, 263 p.
17. WHO - Environmental Health Criteria 11: *Mycotoxins*. Geneve, World Health Organization, 1979, 127 p.
18. WOOD, G.E. Aflatoxins in domestic and imported foods and feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(4): 543-48, 1989.

Recebido para publicação em 04 de dezembro de 1992.

DETERMINAÇÃO DE MACRONUTRIENTES EM ALIMENTOS NORMALMENTE CONSUMIDOS PELA POPULAÇÃO BRASILEIRA^{1, 2, 3}

J. Sérgio MARCHINI
Lúcia H. VITALI
Alceu JORDÃO Jr.
Margareth M. P. RODRIGUES
J.E. DUTRA DE OLIVEIRA

RIALA6/740

MARCHINI, J. S.; VITALI, L.H.; JORDÃO Jr., A.; RODRIGUES, M. M. P.; OLIVEIRA, J.E.D.
de, - Determinação de macronutrientes em alimentos normalmente consumidos pela
população brasileira^{1, 2, 3}. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2): 11-16, 1993.

RESUMO: Em nosso meio, o planejamento de dietas e o cálculo dos diferentes nutrientes é, em geral, feito com o uso de tabelas internacionais de composição de alimentos. Além deste fato, as tabelas disponíveis no Brasil são comumente compiladas e/ou traduzidas de tabelas oriundas do exterior. Desta maneira, os resultados obtidos ou a composição da dieta nem sempre correspondem à realidade local. Considerando a necessidade de se conhecer a composição em macronutrientes dos alimentos normalmente consumida pela população brasileira, o presente trabalho teve por objetivo determinar: o teor calórico (calorimetria direta), de nitrogênio, o extrato etéreo, cinzas, umidade e de hidratos de carbono (por diferença) dos seguintes alimentos: açúcar refinado, alface, arroz polido, banana, batata-inglesa, café em pó, café infusão, carne bovina, cenoura, chuchu, farinha de mandioca, farinha de trigo, feijão, feijão preto, fubá, laranja, mandioca, mandiocinha salsa, leite em pó, leite pasteurizado, óleo de soja, ovo de galinha, pão e tomate. Os resultados foram discutidos e comparados com os de tabelas internacionais. Recomenda-se o uso dos valores obtidos no presente trabalho quando for necessário determinar a composição de alimentos de uso no Brasil.

DESCRITORES: Calorimetria direta, proteína, cinzas, lipídios, hidratos de carbono, umidade, tabela de composição de alimentos.

INTRODUÇÃO

Dados sobre a composição dos alimentos são importantes em saúde pública, entre outros motivos, para^{12, 20, 21}: a) realização de balanço alimentar com objetivo de avaliar a ingestão alimentar em programas de merenda escolar; b) avaliação indireta do estado nutricional de grupos populacionais ou do seu nível de risco; c) planejamento de programas que

visam fornecer ou suplementar a dieta de grupos populacionais específicos, como idosos, pré-escolares, diabéticos, obesos, etc.; d) indústria de alimentos; e) educação alimentar; f) terapêutica nutricional.

Rotineiramente, a adequação quantitativa da ingestão de macronutrientes é feita com uso de tabelas de composição de alimentos. No Brasil os estudos epidemiológicos que necessitam dessa adequação,

- 1 Disciplina de Nutrologia do Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP 14049-900 Ribeirão Preto, SP. Fax (016) 633-1144
- 2 Trabalho parcialmente apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. São Paulo, 1992.
- 3 Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq, processo # 302624/82-1.

tanto retrospectivos como prospectivos, tanto populacionais como clínicos, fazem uso de tabelas internacionais^{6, 14, 23} recomendadas pela FAO (Food and Agriculture Organization); OMS (Organização Mundial de Saúde) e N.R.S. (The National Research Council - National Academy of Sciences U.S.A.). As tabelas freqüentemente utilizadas no Brasil são as apresentadas na tabela 1. Na elaboração dessas tabelas foram utilizados alimentos dos locais de origem das mesmas, com características regionais que, provavelmente, são diferentes daquelas encontradas no Brasil, o que comumente pode ser um fator de erro no cálculo de nossas dietas. Esse fato se deve à existência de diferenças com relação às condições climáticas, solo^{1, 24}, adubação⁷, armazenamento, processamento, conservação¹⁹, tipos e espécies das matrizes, dentre outras possíveis variáveis entre uma região e outra.

Os dados nacionais são, em geral, escassos e desatualizados^{11, 12, 21}. As tabelas brasileiras, além de incompletas em termos de nutrientes são, freqüentemente, pouco confiáveis por falta de descrição de procedimentos analíticos ou pelo uso de técnicas inadequadas¹². Este problema também é relatado em outros países da América Latina³. A título de exemplo, dois problemas comuns são freqüentes: 1) para determinar a composição de um alimento é comum o uso de duas ou mais tabelas diferentes, mesmo quando se quer saber sobre proteínas, energia, hidratos de carbono e lipídios. 2) Para se determinar o teor total de um nutriente específico, por exemplo proteína, em uma mistura de alimentos, é novamente comum o uso de duas ou mais tabelas. Assim sendo, a título de ilustração, ao se comparar o valor calórico do leite em pó pela tabela do ENDEF¹³ encontra-se 502 kcal/100 g, enquanto na tabela INCAP²⁵ encontra-se 349 kcal/100g. A mandioca na tabela INCAP²⁵ oferece 148 kcal/100 g e na "Composition of Food"²³ 352 kcal/100 g.

A determinação de macronutrientes na vasta gama de alimentos brasileiros é uma tarefa que abrange proporções gigantescas e foge ao escopo desse trabalho. No entanto, a população brasileira, apesar de se encontrar distribuída numa larga extensão territorial apresenta uma certa uniformidade quanto aos principais alimentos ingeridos. Assim, por exemplo, o arroz e o feijão, com raras exceções, fazem parte da dieta da maioria do povo brasileiro^{5, 12, 13, 18, 22}. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo determinar a composição em macronutrientes de um grupo de alimentos rotineiramente consumidos pela população brasileira. Foram determinados o teor de proteína, o teor de gordura, umidade e cinza, hidratos de carbono (por diferença) e o teor energético dos alimentos por meio de calorimetria direta.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de alimentos

Os alimentos foram adquiridos no comércio local, pequenos armazéns, da periferia de Ribeirão Preto, SP, no período de julho a outubro de 1992. Foram analisadas duas amostras de cada alimento e cada amostra foi feita em triplicata. Os alimentos analisados encontravam-se em seu estado *in natura*.

Foram avaliados os seguintes alimentos: açúcar refinado; alface (*Lactuca sativa* L.); arroz polido (*Oryza sativa* L.); banana (*Musa cavendishi* Lam); batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.); café torrado e moído (*Coffea arabica* L.); café infusão; diferentes amostras de carne bovina (*Bos taurus*); cenoura (*Daucus carota* L.) chuchu (*Sechium edule* Swartz); farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz); farinha de trigo (*Triticum vulgare*); feijão (*Phaseolus vulgaris* L.); feijão preto (*Phaseolus compressus niger* M.); fubá de milho (*Zea mays*); laranja (*Citrus aurantium* Rino); mandioca (*Manihot esculenta* Crantz); mandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroff); leite em pó (industrializado); leite pasteurizado tipo "C"; óleo de soja (*Glycine max*, L.); ovo de galinha; pão francês e tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Determinação da fração nitrogenada

O nitrogênio foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl. Esse método determina o nitrogênio total contido na amostra⁸. A partir da determinação do nitrogênio total, calculou-se a quantidade de proteína da amostra através do uso de um fator de conversão específico para cada alimento². Todo nitrogênio encontrado nos diferentes alimentos foi considerado protéico, não sendo pois, considerada a presença de outras substâncias nitrogenadas.

Determinação da umidade

A umidade foi determinada por meio de secagem, utilizando estufa a 100-110°C até peso constante¹⁵.

Determinação da fração cinza

As cinzas foram determinadas pela incineração do alimento a 500-550°C em forno mufla, obtendo-se assim o resíduo mineral fixo¹⁵.

Determinação da fração extrato etéreo

A determinação do extrato etéreo foi realizada através de uma extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet usando como solvente o éter de petróleo¹⁵.

Determinação dos hidratos de carbono

Os hidratos de carbono foram determinados por diferença das frações protéicas, lipídica, cinza e umidade¹⁵.

Calorimetria direta

O valor energético dos alimentos foi determinado por meio de calorimetria direta¹⁶, usando o aparelho "1261 Automatic Isoperibol Bomb Calorimeter" e

expresso em termos de kilocalorias ou kilojoule (1 kcal = 4,1868 Kj).

RESULTADOS

Os alimentos foram subdivididos em dois grupos para facilitar a visualização dos resultados. A tabela 2 apresenta os alimentos de origem animal e a tabela 3 os de origem vegetal. Todas as determinações que apresentaram um coeficiente de variação superior a 10% foram repetidas. As tabelas apresentam a média aritmética das duas triplicatas feitas para cada um dos itens.

TABELA 1

Fontes de dados sobre a composição de alimentos em uso comum no Brasil*.

TABELA	ANO DE PUBLICAÇÃO
Valor vitamínico de alimentos brasileiros ^{4,10}	1954
Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF) ¹³	1977
Composição Química de Alimentos, G.V.E. Franco ⁹	1982
Teor de Na/K - FMUSP ¹⁷	1945-50
Composición de Alimentos para Uso en América Latina. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá ²⁵	1961
Composition of Foods. United States Department of Agriculture ²³	1963
Amino Acid Contents of Foods and Biological Data on Proteins. Food and Agriculture Organization of the United Nations ²	1970

* Modificado de Lojolo e Vannucchi¹⁷

TABELA 2

Composição e teor calórico de alimentos de origem animal.

	PROTEÍNA (G%)	EXTRATO ETÉREO (g%)	HIDRATOS DE CARBONO (g%)	CINZA (g%)	UMIDADE (g%)	CALORIAS (kcal%)
Leite em pó industrializado	26,19	21,68	43,46	3,57	5,10	505
Leite pasteurizado tipo "C"	3,14	*	*	0,67	88,08	62
Carne bovina, coxão mole	26,57	2,57	0,16	0,70	70,00	152
Carne bovina, alcatra	26,80	2,36	2,04	0,70	68,10	153
Carne bovina, lagarto	24,58	3,63	1,18	0,71	69,90	158
Carne bovina, peixinho	21,10	3,22	2,19	0,69	72,80	133
Ovo de galinha	14,81	12,77	3,99	1,33	67,10	185

* Não determinado.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Segundo Bressani³ as tabelas de composição de alimentos podem ser consideradas como uma riqueza nacional pois têm usos múltiplos em alimentação e nutrição, na terapia nutricional e na saúde de um modo geral. Além de serem associadas à agricultura e ao planejamento alimentar populacional, são necessárias em atividades associadas com a indústria alimentar e,

por fim, são também úteis no desenvolvimento social e econômico de um país.

Os resultados encontrados neste trabalho diferem, em média, entre 10 e 20% dos valores encontrados nas tabelas internacionais e nas compiladas no Brasil. No entanto, uma dificuldade séria encontrada diz respeito à correta identificação do item analisado. Nem sempre é possível fazer a comparação correta. No caso da carne bovina foram analisadas diferentes

TABELA 3

Composição e teor calórico de alimentos de origem vegetal.

	PROTEÍNA (g%)	EXTRATO ETÉREO (g%)	HIDRATOS DE CARBONO (g%)	CINZA (g%)	UMIDADE (g%)	CALORIAS (kcal%)
Açúcar refinado	0,00	0,00	99,02	0,58	0,40	393
Alface, folha lisa	1,23	0,18	2,19	0,77	95,63	16
Arroz polido cru	4,97	1,66	82,04	0,41	10,92	329
Banana	1,39	0,40	18,78	0,83	78,60	87
Batata-inglesa	2,00	0,29	19,37	0,54	77,80	88
Café torrado moído	13,94	8,39	68,26	3,41	6,00	470
Café infusão	0,63	0,83	1,09	0,36	97,09	12
Cenoura	1,54	0,42	12,11	0,98	84,95	61
Chuchu	1,16	0,10	5,67	0,32	92,75	29
Farinha de mandioca	2,23	0,73	93,06	0,30	3,68	399
Farinha de trigo	12,45	1,23	74,16	0,36	11,80	335
Feijão	19,53	1,77	60,89	4,41	13,40	331
Feijão preto	21,39	1,48	58,80	3,70	14,63	369
Fubá	7,47	3,90	76,54	0,79	11,30	338
Laranja, suco	0,84	0,22	8,31	0,29	90,35	41
Mandioca	1,38	0,52	38,49	0,54	59,07	168
Mandioquinha salsa	1,03	0,35	27,86	0,86	69,90	115
Óleo de soja	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	952
Pão francês	12,58	1,15	66,51	1,56	18,20	310
Tomate	1,21	0,40	3,78	0,48	94,15	27

* Todo nitrogênio do café foi considerado o de outras fontes como a cafeína.

amostras. Segmentos diferentes de animais podem resultar em teores de nutrientes diferentes. Este fato é importante pois, a utilização de tabelas com termos diferentes daqueles corretos pode resultar em erros, muitas vezes grosseiros.

No presente trabalho a medida da energia produzida pela combustão direta do alimento na bomba calorimétrica, ao contrário da utilização de fatores constantes de conversão para proteína, gordura e hidratos de carbono, confere maior credibilidade aos resultados. Este procedimento é menos sujeito a erros, principalmente quando se considera que podem existir variações dos fatores e/ou na composição de proteínas, lipídios e hidratos

de carbono dos alimentos. Os valores 4 kcal/g, 9 kcal/g e 4 kcal/g, comumente utilizados como fatores de conversão alimento/energia, representam uma aproximação respectivamente para proteínas, lipídios e hidratos de carbono, média obtida em diferentes alimentos.

Os presentes resultados visam estimular estudos atualizados sobre a composição regional dos nossos alimentos e mostrar a importância da determinação direta da energia produzida pela combustão do alimento. Estes dados precisam ser estendidos a outros alimentos, à alimentação e à dietoterapia para garantirem maior confiabilidade em estudos nutricionais.

RIALA6/740

MARCHINI, J. S.; VITALI, L.H.; JORDÃO Jr., A.; RODRIGUES, M. M. P.; OLIVEIRA, J.E.D. de, - Determination of macronutrient and energy content levels in common Brazilian foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):11-16, 1993.

ABSTRACT: The macronutrient and energy content of common Brazilian foods was estimated by determining the contents of crude fat, protein, ash, water, total carbohydrate by difference and total energy content by direct calorimetry.

DESCRIPTORS: Direct calorimetry, protein, ash, lipids, carbohydrates, food water, food composition table.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACEVEDO, E. & BRESSANI, R. - Contenido de fibra dietética y digestibilidad del nitrógeno en alimentos centroamericanos: Guatemala. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 40:439-451, 1990.
2. AMINO ACID CONTENTS of Foods and Biological Data on Proteins. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nation. FAO Nutritional Studies nº 24. 1970.
3. BRESSANI, R. - Latinfoods. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 34: 476-500, 1989.
4. CRAMER, E.R.; CARVALHO, M. C. & SALGADO, D.V. - Valor vitamínico de alimentos brasileiros. Coleção Estudos e Pesquisa Alimentar. Rio de Janeiro. SASP, 1954, 166 p.
5. DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. & DUTRA DE OLIVEIRA, M.H.S. - "Bóias-Frias": uma realidade brasileira - Publicação do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Academia de Ciências do Estado de São Paulo - 1981, 187 p.
6. DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; SANTOS, A. C & WILSON, E. D. - *Nutrição Básica*. Editora Sarvier. São Paulo pg 249-269, 1982. 273 p.
7. EKHOLM, P.; YLINEN, M.; KOIVISTOINEN, P. & VARO, P. - Effects of general soil fertilization with sodium selenate in Finland on the selenium content of meat and fish. *J. Agricul. Food Chem.*, 38: 695-698, 1990.
8. FLECK, A. & MUNRO, H.N. - Determination of organic nitrogen in biological materials. *Clin. Chim. Acta*, 2: 2-12, 1965.
9. FRANCO, G.V.E. - *Nutrição. Texto Básico e Tabela de Composição Química de Alimentos*. 6ª edição São Paulo. Livraria Atheneu, 1982, 229 p.
10. FRANCO, G.V.E. - *Tabela do Teor Vitamínico dos Alimentos*. Biblioteca Brasileira de Nutrição, SASP - Rio de Janeiro. p. 131.
11. FRANCO, G.V.E. - *Tabela de Composição Química de Alimentos*. Biblioteca Brasileira de Nutrição, SASP. 3ª edição. Rio de Janeiro. Serviço de Alimentação da Previdência Social. 194 p.
12. FREDERICO, N. T.; MARCHINI, J. S. & DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. - Alimentação e Avaliação do estado nutricional de trabalhadores migrantes safristas na região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). *Rev. Saúde Púb.*, São Paulo, 18:375-381, 1984.
13. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - Secretaria de Planejamento da Presidência da República. Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF): *Tabela de Composição de Alimentos*, v.3, publicações especiais t.1. Rio de Janeiro, 1977, 201 p.
14. HAYTOWITZ, D.B. - A brief history of the U.S. Department of Agriculture's Nutrient Data Bank. *Arch Latinoamer. Nutr.*, 40: 9-21, 1990.
15. Instituto Adolfo Lutz. SÃO PAULO *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Terceira ed. São Paulo, 1985, v. 1, 533 p.
16. JESSUP, R.S. - *Precise measurement of heat of combustion with a bomb calorimeter*. U.S. Bureau of Standards monograph no. 7. U.S. Government Printing Office, Washington D.C. 1970.
17. LAJOLO, F.M. & VANNUCCHI, H. - Tabelas de composição de nutrientes em alimentos: situação no Brasil e necessidades. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 37: 702-713, 1987.
18. LATORRACA, M.Q.; MEIRELLES, S. M. P. & MARCHINI, J.S. - Indicadores das condições nutricionais na região pólo noroeste v. Desnutrição protéica-energética e parasitoses intestinais em um grupo de crianças de 3 a 72 meses de idade da cidade de Mirassol D'Oeste, Mato Grosso, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 30:192-196, 1988.
19. MARFO, E.K.; SIMPSON, B.K.; IDOWU, J.S. & OKE, O.L. - Effects of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea, and soybean. *J. Agricul. Food Chem.*, 38: 1580-1585, 1990.
20. SPEEK, A.J.; SPEEK- SAICHUA, S. & SCHREURS W.H.P. - Determination of macronutrient and micronutrient levels in Thai foods: an evaluation of the Thai food composition table. *Food Chem.*, 40: 251-262, 1991.

21. VANNUCCHI, H.; MENEZES, E.W.; CAMPANA, A.O. & LAJOLO, F.M. - Aplicações das recomendações nutricionais adaptadas à população brasileira. *Cad. Nutr.*, 2: 3-155, 1990.
22. VIACAVAL, F.; POPPE DE FIGUEIREDO, C. M. & OLIVEIRA, W.A. - *A Desnutrição no Brasil. Uma análise do Estudo Nacional da Despesa Familiar. (FIBGE 74/75) para o nordeste, estado de São Paulo e estado do Rio de Janeiro.* Editora Vozes-Petrópolis, 1983, 199 p.
23. WATT, B.K. & MERRIL, A.L. - *Composition of Foods: Raw, Processed, Prepared.* United States Department of Agriculture. Washington, D.C. USDA. Handbook no. 8, 1963, p. 189.
24. WEBER, C.W.; GENTRY, H.S.; KOHLHEPP, E.A. & McCROHAN, P.R. - The nutritional and chemical evaluation of chia seeds. *Ecol. Food Nutr.*, 26: 119-125, 1991.
25. WU LEUNG; WOOD-TSUEN & FLORES, M. - *Tabla de composición de alimentos para uso en América Latina.* Comité Interdepartamental de Nutrición para la Defensa Nacional, Instituto Nacional para Artritis y Enfermedades Metabólicas, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, Maryland, EEUU. y Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala, Centro América, Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, junio 1961. 132 p.

Recebido para publicação em 20 de dezembro de 1992.

AVALIAÇÃO DOS LAUDOS ANALÍTICOS DAS AMOSTRAS DE ALGUNS TIPOS DE QUEIJOS RECEBIDOS PELO INSTITUTO ADOLFO LUTZ DE RIBEIRÃO PRETO*

Zara Miguel LAICINI**
Adriana Foz PARMEZZANI**
Sonia Rodrigues de PAULA**
Nina Turko CARLUCCI**

RIALA6/741

LAICINI, Z.M.; PARMEZZANI, A.F.; PAULA, S.R. de; CARLUCCI, N.T. – Avaliação dos laudos analíticos das amostras de alguns tipos de queijo recebidos pelo Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):17-20, 1993.

RESUMO: Com a finalidade de obter uma avaliação da qualidade dos queijos comercializados em Ribeirão Preto, foi feito um levantamento de análises realizadas no Instituto, de 1989 a 1990.

Foram estudados 61 laudos de análise de queijos tipo: Mussarela, Minas Frescal, Prato e Requeijão.

Destes, 6 apresentaram-se fraudados, 10 apresentaram-se de acordo com os padrões legais e 45 em desacordo com os padrões legais, sendo que 13 eram do tipo Minas Frescal dos quais 1 (7,70%) estava de acordo e 12 (92,30%) estavam em desacordo.

Das 9 amostras de queijos tipo Mussarela, só 2 (22,22%) estavam de acordo e 7 (77,78%) em desacordo.

Das 25 amostras de queijos tipo Prato, só 1 (4,00%) estava de acordo e 24 (96,00%) em desacordo.

Das 8 amostras de Requeijão cremoso, 6 (75%) estavam de acordo e 2 (25%) em desacordo.

Portanto, dos 55 laudos estudados, com exceção das fraudes, apenas 10 (18,18%) se apresentavam de acordo com as normas legais.

UNTERMOS: Laudos Analíticos, Qualidade Queijo, Padrões legais Queijo.

INTRODUÇÃO

O queijo é um dos alimentos fermentados mais antigos conhecidos pelo homem. Vários séculos antes de Cristo, na região do Mediterrâneo, egípcios e gregos já dominavam sua produção, que foi aprimorada pelos romanos que a difundiram nas regiões por eles conquistadas.

Segundo o Código Sanitário N.T.A. 11^{3,7}, queijo é o produto fresco ou maturado, obtido pela separação do soro, após a coagulação natural ou artificial do leite integral, total ou parcialmente desnatado, através de processos tecnológicos adequados, enriquecido ou não de creme de leite e outras substâncias permitidas.

A fabricação do queijo consiste na concentração dos elementos insolúveis do leite. Através do uso de sais,

* Realizado nas Seções de Bromatologia, Química e Bacteriologia Alimentar do Laboratório I de Ribeirão Preto – Instituto Adolfo Lutz.

** Do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto.

ácidos, aquecimento, microorganismos ou enzimas, gera a precipitação do coágulo, que é cortado, dessorado, cozido (ou não), modelado, salgado, prensado (ou não) e maturado.

Conforme suas características, os queijos são classificados em três categorias básicas de acordo com a porcentagem de gordura no extrato seco total, o sabor e a consistência.

Este trabalho foi realizado com a finalidade de obter uma avaliação sobre a qualidade dos queijos comercializados em Ribeirão Preto. Para tanto foi feito um levantamento das análises realizadas no I.A.L. – R.P., de 1989 a 1990. A amostragem abrangeu as análises fiscais apreendidas pela Vigilância Sanitária e a Polícia, além das análises de orientação feitas por solicitação das agroindústrias da região.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de queijos tipo Requeijão, Minas Frescal, Mussarela e Prato, procedentes de várias localidades. Estas amostras foram apreendidas no comércio ou enviadas por usinas, transportadas em recipientes isotérmicos até o laboratório e mantidas sob refrigeração até o início das análises. Foram estudadas 55 amostras, submetidas à avaliação dos caracteres organolépticos e a exames físicos, químicos e microbiológicos.

Primeiramente, foram realizadas as determinações microbiológicas empregadas rotineiramente no laboratório, segundo metodologia recomendada pela A.P.H.A.^{1,2} e F.D.A.³. Entre as inúmeras técnicas utilizadas enfatizamos a contagem padrão em placas, pela semeadura em profundidade em ágar padrão adicionado de 0,05% de cloreto de trifêniltetrazólio.

As bactérias coliformes foram quantificadas pela técnica do número mais provável (N.M.P.) em meio de bile – verde brilhante.

Para a contagem de bolores e leveduras, utilizou-se semeadura em profundidade de ágar – dextrose – batata – antibiótico, incubados em temperatura ambiente.

A determinação de *Staphylococcus aureus* foi realizada em semeadura em superfície em placas de ágar Baird-Parker.

Bacillus cereus foi determinado por semeadura em superfícies de ágar – manitol – gema de ovo – polimixina.

A determinação de *Clostridium Sulfito Redutores* foi realizada através de semeadura em profundidade, em condições de anaerobiose em ágar sulfito – polimixina – sulfadiazina.

A determinação de *Salmonella* foi feita por pré-enriquecimento em água peptonada – tamponada seguida de semeadura superficial em ágar MacConkey e verde brilhante, enriquecimento seletivo em Caldo Selenito e Caldo Tetracionato, seguido de plaqueamento em ágar SS e B.G., com

isolamento das colônias suspeitas e identificação das mesmas.

As determinações físicas e químicas foram realizadas pelos métodos descritos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁶, tendo sido efetuadas as seguintes determinações: teor de gordura, substâncias voláteis, amido e corantes, além da realização do exame microscópico e dos caracteres organolépticos das amostras.

Este conjunto de dados possibilitou verificar se cada tipo de queijo se encontrava dentro dos parâmetros normais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis laudos de análises fiscais, das 60 amostras apreendidas pela Polícia, revelaram tratar-se de fraudes grosseiras, que consistiam de produtos feitos a partir de um mingau, com formato, aspecto e odor de queijo, que foram considerados separadamente devido ao grande número de amostras.

Das 55 amostras para análises de orientação e fiscal, solicitadas pelas agroindústrias, Vigilância Sanitária e Polícia, apenas 10 estavam de acordo com os padrões legais, sendo que 45 estavam em desacordo, conforme mostra a Tabela 1.

De acordo com estes padrões legais, os queijos Prato e Mussarela, classificados como semiduros, de massa prensada, não podem ter menos de 40% e 28% de lipídios, respectivamente.

Os tipos Minas Frescal e Requeijão são classificados como queijos moles, apresentando o Minas Frescal de massa crua no mínimo 40% de lipídios e o Requeijão, obtido pela fusão da massa com creme, no mínimo 30% de lipídios.

Nesse estudo, com exceção de um queijo Prato que apresentou teor de lipídios inferior a 35%, todos os demais em desacordo o foram por transgredir as normas higiênico-sanitárias, dentre as quais é citado com grande frequência o artigo 41 do Decreto-lei federal nº 986 de 21/10/69, e o Decreto estadual de nº 12.486 de 20/10/78 (N.T.A. 11)⁷. Em três amostras de queijo foram isolados *Staphylococcus aureus* e apenas um apresentou sujidades ao microscópio.

Em nenhum deles (exceto as fraudes) foi encontrada a presença de amido ou de corantes.

O principal motivo da realização deste trabalho foi a lembrança de que o queijo é um alimento produzido a partir da fermentação do leite através de inóculos de microorganismos que nas condições de industrialização dificilmente poderiam ser compostos de cepas absolutamente puras, geralmente consistindo de um "pool" de microorganismos fermentadores, expostos às condições ambientais mas que sob condições higiênicas de manipulação, devem ser absolutamente inócuos.

Muito embora a amostragem estudada neste trabalho seja composta por menos de 100 elementos, por se tratar de uma amostra aleatória, pode-se a partir daí, esboçar uma inferência suficientemente

abrangente do universo populacional (de queijos comercializados nesta região) do qual a mesma foi retirada.

Assim sendo, parece pertinente pensar em algumas modificações no número de microorganismos saprófitos permitidos por grama destes produtos, principalmente leveduras que dificilmente poderiam deixar de fazer parte de massa dos queijos, a menos que se usasse na fabricação dos mesmos substâncias desinfetantes muito mais nocivas a saúde do que os contaminantes saprófitos usuais, excluindo deste raciocínio os germes patogênicos.

Lembramos que queijos contaminados por radioatividade ou por substâncias biocidas dificilmente apresentariam qualquer tipo de contaminação por microorganismos.

CONCLUSÃO

Das 60 peças fraudadas que originaram os seis laudos analíticos e das 55 análises de orientação estudadas, apenas 10 (18,18%) foram consideradas próprias para o consumo e 45 (81,82%) não se enquadraram nos padrões, o que nos levou a inferir ser insatisfatória a qualidade dos queijos analisados no I.A.L. – R.P., nesse período de tempo.

Com base nos dados deste trabalho, que se apoiou em normas legais em vigor desde 1969, somos levados a concluir que a produção, manipulação e estocagem destes produtos apresenta condições higiênico-sanitárias insatisfatórias que eventualmente podem causar problemas à saúde do consumidor.

Portanto, além de sugerir alguns estudos no sentido de tornar mais atualizadas as normas legais sobre queijos, esse trabalho demonstra a necessidade

de uma constante fiscalização nos entrepostos de venda ao consumidor, para a melhoria da qualidade destes produtos.

TABELA 1

Porcentagem de amostras de queijos de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes, analisadas no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, no período de 1989 a 1990.

TIPO DE QUEIJO	AMOSTRAS AMOSTRAS DE ACORDO		AMOSTRAS EM DESACORDO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
MINAS FRESCAL	1	7,70	12	92,30	13	23,64
MUSSARELA	2	22,22	7	77,78	9	16,36
PRATO	1	4,00	24	96,00	25	45,45
REQUEIJÃO	6	75,00	2	25,00	8	14,55
TOTAL	10	18,18	45	81,82	55	100,00

AGRADECIMENTOS

Expressamos nossos agradecimentos a todos os funcionários das seções envolvidas neste trabalho e em especial às Sras. *Elizabeth Bevilacqua e Anastácia Issa Doregon*, que fizeram a pré-datilografia.

RIALA6/741

LAICINI, Z.M.; PARMEZZANI, A.F.; PAULA, S.R. de; CARLUCCI, N.T. – The quality of cheeses analysed in Adolfo Lutz Institute, Ribeirão Preto, Brazil, 1992. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2): 17-20, 1993.

ABSTRACT: With the purpose of estimate the quality of the cheeses commercialized in Ribeirão Preto, were analysed the laboratorial results from the period of 1989-1990, in this Institute.

Were studied 61 cheeses analysis of the Kinds: "Minas" Fresh, Mozzarella, Swiss Type and Cream cheese.

From these, 6 were related to frauds, 10 were approved and 45 condemned, among these, 13 were type "Minas" Fresh for what only one (7,70%) was approved.

From 9 samples of Mozzarella cheeses, only 2 (22,22%) were approved.

From 25 samples of Swiss Type, only 1 (4,0%) was approved and 24 (96,0%) were condemned.

By other way, from 8 samples of Cream Cheeses, 6 (75,0%) were APROVED or the majotity.

Then, from the 55 samples studied, with exception of the frauds, only 10 (18,18%) were approved, so we concluded not to be satisfactory the quality of cheeses in this period of time.

DESCRIPTORS: Cheeses, Frauds, Quality and Standards.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Standard methods for the examination of dairy products. 12th ed. WASHINGTON, D. C., APHA, 1960.
- 2 - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Technical Committee on Microbiological Methods For Foods - Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2ª edição - M.L. Speck Ed. WASHINGTON, D. C., APHA, 1976.
- 3 - BRASIL, Leis, Decretos - Regulamentos de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - Decreto 30.691 de 29/Mar/52, BRASÍLIA; Ministério da Agricultura, D.O.U. de 30/Mar/52 p. 169-183.
- 4 - F.D.A. - Food and Drug Administration - Bacteriological Analytical Manual - 5th ed., American Official Analytical Chemists Ed. 1978.
- 5 - ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R. & AZEVEDO, J. L. - *Tratado de Microbiologia* - vol. I, Manole Ed., 1991 - p. 167-176.
- 6 - SÃO PAULO, Instituto Adolfo Lutz - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - vol. I: Métodos Físicos e Químicos para Análise de Alimentos. 3ª ed. São Paulo, 1985 p. 231-234.
- 7 - SÃO PAULO, Leis e Decretos - Código Sanitário de 1978 - Decreto estadual nº 12.342, D.O.U. de 27/09/78 p. 173/181.

Recebido para publicação em 17 de dezembro de 1992.

AVALIAÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL COMO PARÂMETRO DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA MASSAS COM OVOS*

Neura BRAGAGNOLO**
Délia B. RODRIGUEZ-AMAYA**

RIALA6/742

BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação do teor de colesterol como parâmetro de controle de qualidade para massas com ovos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):21-26, 1993.

RESUMO: O teor de colesterol tem servido como índice da quantidade de ovos em massas com ovos. A resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde (CNNPA-MS) estabelece três ovos por kg de massa, correspondendo a 0,450 g de colesterol por kg de massa. O método seguido pelos laboratórios de fiscalização é o colorimétrico do Instituto Adolfo Lutz (IAL). No presente trabalho, foi realizada uma avaliação comparativa de dois métodos colorimétricos, o do IAL (que utiliza ácido acético, anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado) e o de BOHAC *et alii* (que emprega ácido acético saturado com sulfato ferroso e ácido sulfúrico concentrado), e um método que envolve cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar o teor de colesterol em massas com ovos. Para o último método foi utilizada uma coluna C₁₈, fase móvel acetoneitríliia-isopropanol (75:25) e detector de conjunto de díodos, a quantificação foi feita por padronização externa. Os métodos colorimétricos superestimaram os valores de colesterol e, conseqüentemente, a quantidade de ovos adicionada às massas. Já o método por CLAE revelou que as cinco amostras de massas analisadas continham quantidades de ovos abaixo do mínimo exigido pela legislação vigente.

DESCRITORES: massa com ovos, colesterol, método colorimétrico, controle de qualidade, CLAE.

INTRODUÇÃO

O teor de colesterol tem sido utilizado como parâmetro de qualidade no controle de massas com ovos. A resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde (CNNPA-MS)³ e comunicado 37/80 da Divisão Nacional de Alimentos do Ministério da Saúde (DINAL-MS) de 16 de dezembro de 1980 estabelecem que "massas com ovos" devem conter no mínimo três ovos por kg de massa, correspondendo a 0,450 g de colesterol por kg de massa. Embora a

fonte de informação não tenha sido citada, este valor aparentemente foi calculado considerando que cada ovo contém 150 mg de colesterol. O método oficial, usado pelos laboratórios de fiscalização, é o colorimétrico do Instituto Adolfo Lutz⁵ (IAL), que gera muita controvérsia, uma vez que não é específico para o colesterol, mas para qualquer esterol presente. Outras substâncias que tenham o núcleo do esterol também podem ser quantificadas, superestimando desta forma a concentração de colesterol. Entre os diferentes métodos para massas com ovos, os dois mais recentes envolvem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁴ e cromatografia gasosa (CG)⁶.

* Parte da dissertação de Mestrado da 1ª autora realizada junto ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

** Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, UNICAMP, Caixa Postal 6121, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brasil.

No presente trabalho, foi realizada uma avaliação comparativa de dois métodos colorimétricos, o de IAL⁵ (que utiliza ácido acético, anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado) e o de Bohac *et alii*¹ (que envolve ácido acético saturado com sulfato ferroso e ácido sulfúrico concentrado) e um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), estabelecido no nosso laboratório, para determinar os teores de colesterol em massas com ovos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As amostras foram adquiridas, ao acaso, em diferentes quitandas e supermercados de Campinas, em novembro de 1991.

Analisaram-se cinco amostras de massas com ovos de marcas diferentes. As massas foram trituradas em um moinho até a obtenção de um pó que passasse por um tamis de 40 *mesh*.

Na tentativa de reconfirmar a confiabilidade dos dados, foi preparada uma massa caseira com 3 ovos, 1 kg de farinha e 200 ml de água. Após secagem em estufa a 100°C por uma hora a amostra foi triturada como as anteriores.

MÉTODOS

Os procedimentos dos métodos avaliados estão apresentados esquematicamente nas Figuras 1, 2, e 3.

A medida da absorbância foi feita em um espectrofotômetro Perkin-Elmer lambda 6, computadorizado.

A curva padrão utilizada para o método do IAL⁵ foi de 0 a 100 mg/l, com colesterol purificado ("Sigma", EUA), demonstrando linearidade na faixa das amostras analisadas.

O método de Bohac *et alii*¹, utilizado para determinação de colesterol em carnes, foi adaptado às condições do laboratório por Bragagnolo & Rodriguez-Amaya² e usado como um método alternativo. A curva padrão foi feita de 0 a 900 µg.

Para o método por CLAE, a extração dos lipídios foi semelhante à do método colorimétrico do IAL⁵. A saponificação foi realizada de acordo com Bohac *et alii*¹.

Foi utilizado um cromatógrafo marca Varian, com injetor de válvula rotatória adaptado com amostrador 10 µl, "Solvent Delivery System" modelo 9010, detector de conjunto de diodos (190-367 nm), modelo 9065 Polichrom computadorizado acoplado a integrador modelo 4400 e registrador Hewlett-Packard modelo 2225 D+. A coluna utilizada foi Spherisorb ODS-1, 5 µm, 150 x 4,6 mm (Alltech Associates, EUA), precedida por coluna C₁₈ de guarda Micropak MCH-10, 10 µm, de 30 x 4,6mm. A fase móvel foi acetonitrila-isopropanol (75:25) num fluxo de 1,2 ml/min com pressão de 73 atm. Todos os solventes

usados foram de grau cromatográfico, filtrados (0,45 µm) e degaseificados antes do uso. Aliquotas do extrato de massa com ovos foram evaporados sob N₂, redissolvidas em 1 ml de fase móvel e filtradas (0,45 µm) antes da injeção. O pico do colesterol foi monitorado a 205 nm.

Para a escolha da fase móvel testou-se previamente as seguintes misturas de solventes: acetonitrila-metanol (50:50 e 60:40), hexano-isopropanol (99:1) e acetonitrila-isopropanol (50:50, 60:40, 65:35; 70:30; 75:25 e 80:20).

A identificação do colesterol foi realizada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorbância (Figuras 4 e 5) obtidos pelo detector conjunto de diodos do padrão, da amostra, e ainda por co-cromatografia (*spiking*). Para a quantificação, utilizou-se o método de padronização externa. Os níveis utilizados para a curva padrão foram de 5 a 40 µg/injeção (10 µl).

FIGURA 1

Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo IAL⁵.

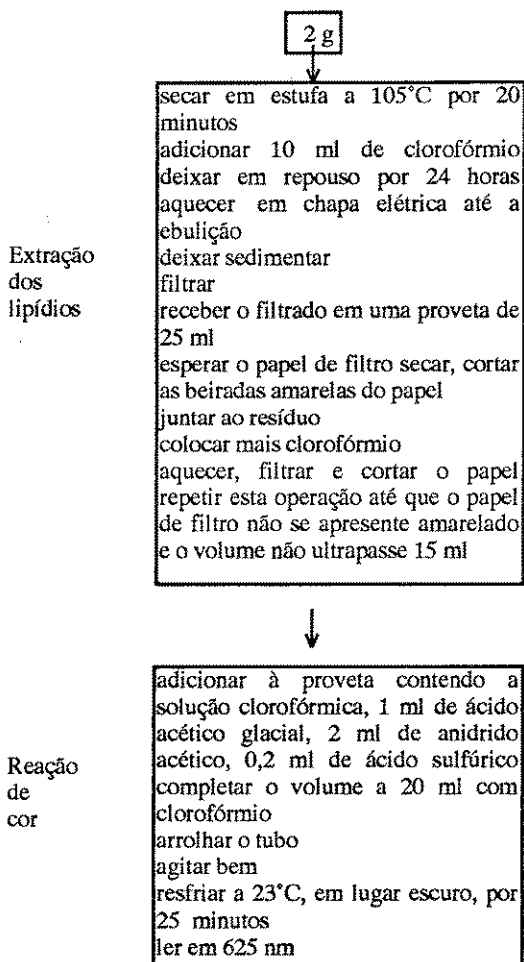


FIGURA 2

Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos, segundo Bohac *et alii*¹.

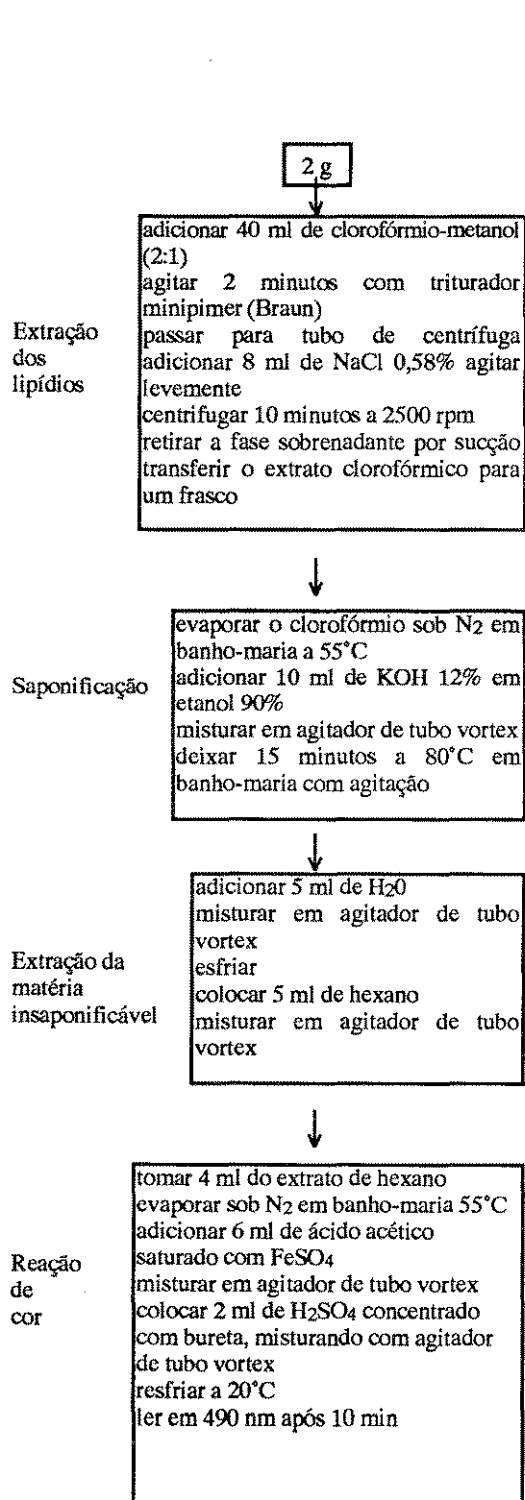
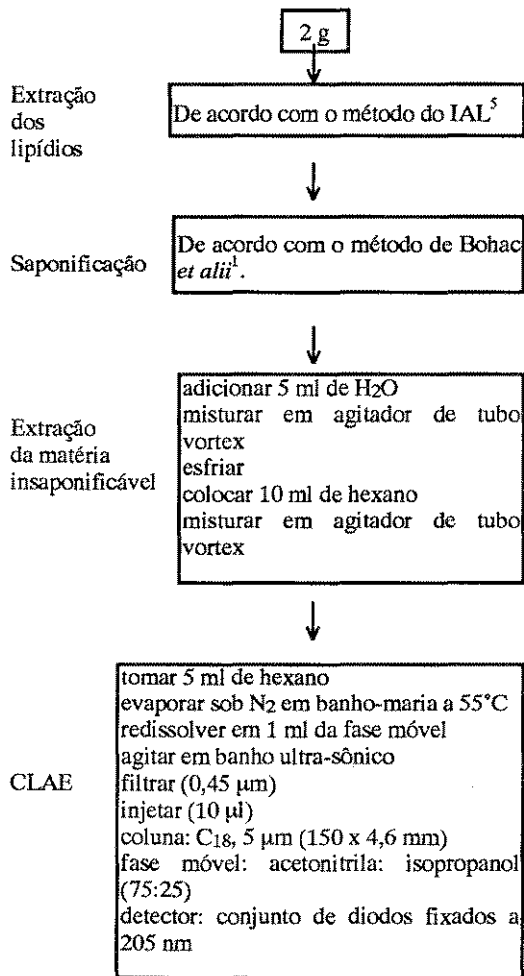


FIGURA 3

Fluxograma para determinação de colesterol em massas com ovos por CLAE.



Um teste de recuperação foi feito adicionando-se quantidades conhecidas de colesterol (0,2 e 0,4 mg) ao extrato de clorofórmio.

Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças entre os três métodos, foi realizada análise de variância de um fator ("one way"), com auxílio do Software MICROSTAT. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

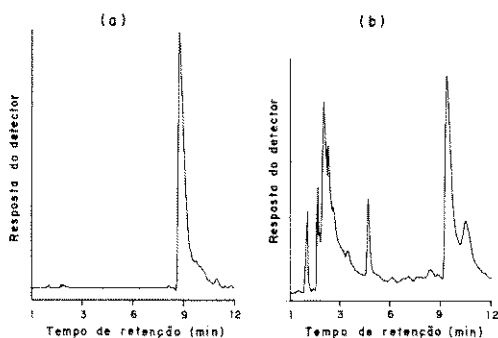


FIGURA 4

Cromatogramas característicos do padrão colesterol (a) e de uma amostra de massa com ovos (b). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1,5 μm (150 x 4,6 mm), fase móvel, acetonitrila: isopropanol (75:25), fluxo, 1,2 ml/minutos, detector, conjunto de diodos fixados a 205 nm.

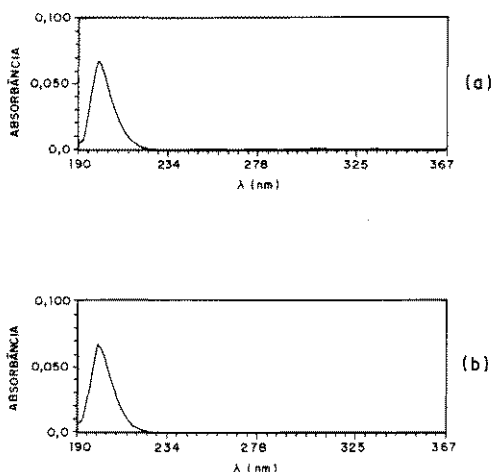


FIGURA 5

Espectros de absorvância obtidos pelo detector conjunto de diodos do padrão colesterol (b) e de uma amostra de massa com ovos (a).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do método por CLAE para massas com ovos

Como o método por CLAE foi estabelecido no presente trabalho, avaliou-se a sua confiabilidade.

Embora o método colorimétrico do IAL⁵ não incluísse a etapa de saponificação para massas com ovos, os testes preliminares demonstraram a importância da mesma para remoção dos

interferentes, como mostram os cromatogramas na Figura 6.

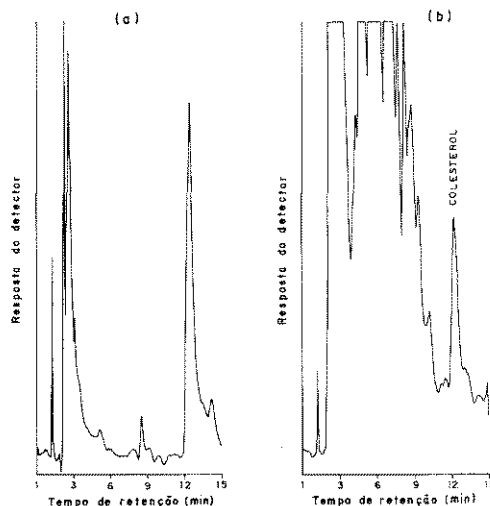


FIGURA 6

Cromatogramas de uma amostra de massa com ovos não saponificada (b) e submetida a saponificação (a). Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 5 μm (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila-metanol (50:50); fluxo, 1,2 ml/minuto; detector conjunto de diodos fixado a 205 nm.

Esta etapa, portanto, foi incluída no método por CLAE.

A recuperação do colesterol no método estabelecido foi excelente, com valores de 97-98% (Tabela 1).

TABELA 1

Recuperação do colesterol em massa com ovos pelo método por CLAE

mg DE COLESTEROL ADICIONADA	n	% RECUPERAÇÃO
0,2	2	98
0,4	2	97

n = número de determinações

A eficiência da extração foi verificada através de duas extrações consecutivas. O valor máximo obtido na segunda extração foi de 0,0159 g de colesterol por kg de massa.

Teores de colesterol em massas com ovos

Os níveis de colesterol em massas com ovos obtidos pelos três métodos, os desvios padrão e os coeficientes de variação encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2
Comparação dos teores de colesterol em massas com ovos (g/kg) obtidos por três métodos

AMOSTRAS*	COLORIMÉTRICOS				CLAE	
	IAL ⁵		Bohac <i>et alii</i> ¹		MÉDIA ± DP	%CV
	MÉDIA ± DP	%CV	MÉDIA ± DP	%CV		
1	0,39 ± 0,04	10,2	0,52 ± 0,01	1,9	0,11 ± 0,01	9,1
2	0,77 ± 0,04	5,2	0,64 ± 0,02	3,1	0,24 ± 0,00	0,0
3	0,76 ± 0,01	1,3	0,70 ± 0,01	1,4	0,18 ± 0,01	5,6
4	0,42 ± 0,03	7,1	0,44 ± 0,01	2,3	0,02 ± 0,00	0,0
5	0,48 ± 0,03	6,2	0,60 ± 0,01	1,7	0,24 ± 0,01	4,2

DP – desvio padrão

CV – coeficiente de variação

* Amostras analisadas em triplicata.

Os coeficientes de variação (%CV), médias de 6,0, 2,1 e 3,8, obtidos para os métodos de IAL⁵, do BOHAC *et alii*¹ e por CLAE, respectivamente, demonstraram uma precisão boa dos três métodos. Em relação aos teores de colesterol, uma avaliação estatística do conjunto dos dados demonstrou que os valores obtidos pelos métodos colorimétricos não diferiram entre si, mas foram significativamente maiores que os obtidos por CLAE. Estes resultados indicam a existência de substâncias interferentes nos métodos colorimétricos. A diferença entre os resultados obtidos pelos métodos colorimétricos e cromatográfico foi especialmente pronunciada com a amostra 4. CLAE acusou um valor baixíssimo, o cromatograma (Figura 7) mostrando um pico bem menor que os das demais amostras.

Pelos resultados obtidos pelo método IAL⁵, duas massas apresentaram colesterol abaixo do mínimo estabelecido. No entanto, utilizando-se o método por CLAE, todas as marcas de massa com ovos analisadas deram valores de colesterol abaixo do mínimo permitido pela legislação vigente, indicando que menos de 3 ovos foram adicionados por quilo de massa.

Considerando a discrepância nos resultados, foi preparada e analisada em triplicata por CLAE uma massa caseira com 3 ovos. A média obtida foi de 0,44 ± 0,01 g/kg, correspondendo ao valor estipulado pelas normas brasileiras, equivalente a 3 ovos adicionados na massa.

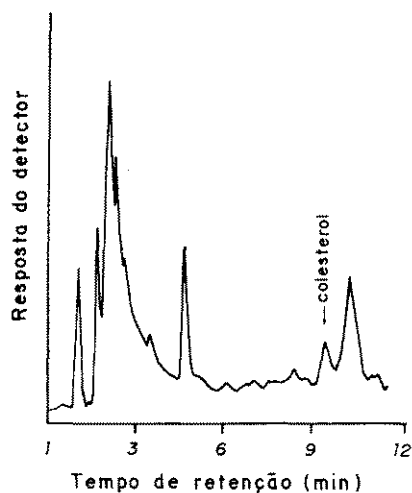


FIGURA 7

Cromatograma da amostra 4 de massa com ovos. Condições cromatográficas: coluna, Spherisorb ODS-1, 5 µm (150 x 4,6 mm); fase móvel, acetonitrila-isopropanol (75:25); fluxo, 1,2 ml/minuto; detector conjunto de díodos fixado a 205 nm.

CONCLUSÃO

O método colorimétrico do IAL⁵ utilizado pelos laboratórios de fiscalização, superestimou o conteúdo de colesterol e, conseqüentemente, a quantidade de ovo nas massas. O outro método colorimétrico, de Bohac *et alii*¹, também superestimou os teores de colesterol.

É evidente, portanto, a necessidade de que a metodologia oficial seja modificada a fim de remover os interferentes antes da reação colorimétrica ou utilizar CLAE, uma técnica confiável, porém, onerosa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo suporte financeiro.

RIALA6/742

BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. - Evaluation of the cholesterol concentration as quality control parameter for egg noodles. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):21-26, 1993.

ABSTRACT: The cholesterol content has served as index of the amount of eggs in egg noodles. Resolution 12/78 of the "Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos", of the Ministry of Health (CNNPA-MS) specifies three eggs per kg of noodles, corresponding to 0.450 g of cholesterol per kg of noodles. The method used by regulatory laboratories is the colorimetric method of the Instituto Adolfo Lutz (IAL). In the present work, a comparative evaluation of two colorimetric methods, those of IAL (which utilizes acetic acid, acetic anhydride and concentrated sulfuric acid) and of Bohac *et alii* (which employs acetic acid saturated with ferrous sulfate and concentrated sulfuric acid), and a method which involves high performance liquid chromatography (HPLC), established in our laboratory, for the determination of cholesterol in egg noodles was carried out. For the latter method, a C₁₈ column, acetonitrile-isopropanol (75:25) as mobile phase and a diode array detector were used, quantitation was carried out by external standardization. The colorimetric methods overestimated the cholesterol levels, consequently, the quantity of eggs added to the noodles. The HPLC method revealed that the five samples of egg noodles analyzed contained eggs at amounts lower than the minimum stipulated by current regulation.

DESCRIPTORS: egg noodles, cholesterol, colorimetric method, quality control, HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOHAC, C.R.; RHEE, K.S.; CROSS, H.R. & ONO, K. - Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. *J. Food Sci.*, 53(6): 1642-4, 1988.
2. BRAGAGNOLO, N. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Teores de colesterol em carnes de frango. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 28(2):122-31, 1992.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. 1, p. 11499-527. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)... corrigida pelo Comunicado nº 37/80 da Divisão Nacional de Normas de Vigilância Sanitária de Alimentos.
4. HURST, W.J.; ALEO, M.D. & MARTIN Jr., R.A. - HPLC determination of the cholesterol content of egg noodles as an indicator of egg solids. *J. Agric. Food Chem.*, 33(5):820-2, 1985.
5. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3ª ed., São Paulo, 1985, v. 1, pg. 57-9.
6. KOVACS, M.I.P. - Determination of cholesterol in pasta products using gas-liquid chromatography. *J. Cereal Sci.*, 11: 291-7, 1990.

Recebido para publicação em 4 de dezembro de 1992.

AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO SIMPLES E ECONÔMICO PARA A METILAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS COM LIPÍDIOS DE DIVERSAS ESPÉCIES DE PEIXES

Everaldo Lima MAIA*
Délia B. RODRIGUEZ-AMAYA*

RIALA6/743

MAIA, E.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. – Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):27-35, 1993.

RESUMO: Existem diversas técnicas disponíveis para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, cada uma tendo vantagens e desvantagens. O método de METCALFE *et alii* utiliza o reagente $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ que é caro e importado, o método de HARTMAN & LAGO emprega reagentes comuns, mas requer mais vidrarias e maiores manipulações. Aproveitando os aspectos vantajosos dos dois métodos citados, foi experimentado um método que proporciona rapidez, simplicidade e baixo custo. Utilizou-se o reagente esterificante de HARTMAN & LAGO e as demais etapas descritas por METCALFE *et alii*, sendo que as reações de hidrólise e esterificação foram realizadas em tubo de ensaio. O método proposto foi comparado com o método de METCALFE *et alii*, utilizando os lipídios musculares de pacu, *Piaractus mesopotamicus* e sardinha, *Sardinella brasiliensis*. Para a separação e quantificação dos ácidos graxos foi utilizada cromatografia gasosa de alta resolução. Não houve diferença significativa ao nível de 5% nas porcentagens de 18 ácidos graxos de pacu. De 36 ácidos graxos de sardinha, uma diferença significativa a nível de 5% foi observada em apenas dois. Mesmo para estes dois ácidos graxos, a diferença não foi significativa a nível de 1%. Portanto, os dois métodos são equivalentes. Estes dois métodos também apresentaram resultados semelhantes para os lipídios de curimatá, tilápia e tambaqui, demonstrando a alta aplicabilidade do método proposto.

DESCRIPTORIOS: metilação, ácidos graxos, peixe, cromatografia gasosa.

INTRODUÇÃO

No exterior, nos últimos anos, os lipídios de peixes têm sido objeto de numerosos estudos, por serem uma fonte rica de ácidos graxos polinsaturados da série ômega-3 (AGP n3)^{3, 13, 15, 21, 28, 29}. Estudos epidemiológicos correlacionam a baixa incidência de doenças cardiovasculares nos esquimós e japoneses, com o consumo destes ácidos graxos provenientes de peixes^{10, 11, 12, 18, 19}. Tentativas de reduzir os riscos às doenças cardiovasculares enfatizam a importância do consumo de peixes ou de seus produtos ricos em AGP n3 e pobres em AGP n6^{8, 16, 22, 27}. Os AGP n3 e óleos de peixes são tão intimamente ligados que os

peixes como um todo são considerados fontes ricas. Na verdade, há uma diferença marcante nos perfis de ácidos graxos entre diferentes espécies de peixes e entre as classes (lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios) e subclasses (triacilgliceróis, lecitina, cefalina, etc.) de lipídios.

Por outro lado, a porção lipídica de alimentos pode estar associada positiva ou negativamente às diversas propriedades dos alimentos como sabor, estabilidade da cor, características emulsificantes e conteúdo calórico. A diferença entre espécies, em relação à composição de ácidos graxos, representa uma das variáveis mais significativas que determinam as características de processamento, palatabilidade e

* Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
C.P. 6121, 13081-970 Campinas, SP, Brasil

estocagem de alimentos como peixes, carnes, frangos, etc. Os ácidos graxos insaturados, especialmente os poliinsaturados, são lábeis à oxidação, um problema sério no processamento e estocagem de alimentos.

No Brasil, o efeito benéfico dos AGP n3 já está sendo divulgado, mas são poucos os trabalhos sobre a composição de ácidos graxos em peixes brasileiros. Este tipo de análise é geralmente conduzido por cromatografia gasosa e, por se tratar de uma composição complexa, com uma coluna capilar. Apenas quatro trabalhos realizados no Brasil foram encontrados na literatura, os quais utilizaram coluna empacotada^{9, 23, 24, 26}. Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA) em óleo de sardinha e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha foram determinados usando uma coluna capilar de sílica fundida Carbowax 20M.

Com o desenvolvimento de instrumentos altamente sofisticados, sensíveis e precisos, as etapas anteriores à medida instrumental tornaram-se os passos mais passíveis de erros, portanto, limitantes na obtenção de dados exatos. Erros cometidos nestes passos preliminares não são corrigidos na etapa instrumental por mais moderno e sofisticado que seja o instrumento.

A determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa é uma análise largamente realizada em várias áreas da ciência. Ácidos graxos de cadeia curta podem ser injetados diretamente no cromatógrafo. Ácidos graxos de cadeia longa, no entanto, não são suficientemente voláteis para uma análise direta, necessitando a sua transformação em ésteres. Duas fontes de erros devem ser evitadas nesta derivação: (1) a conversão incompleta dos ácidos graxos (ligados ou livres) aos ésteres desejados, e (2) alterações da estrutura durante a liberação e esterilização dos ácidos graxos.

Existem vários métodos para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, cada um tendo vantagens e desvantagens. Envolvem uma transesterificação ou uma hidrólise (saponificação) da amostra, seguida de esterificação dos ácidos graxos livres. O método de Metcalfe *et alii*²⁵, amplamente utilizado internacionalmente, envolve a hidrólise com hidróxido de sódio e a metilação dos ácidos graxos liberados com BF₃-MeOH. A análise é simples, rápida e realizada em tubo de ensaio. O reagente BF₃-MeOH, porém, é caro (importado), tóxico e tem uma vida útil curta. Quando envelhecido, pode causar danos à produção de artefatos. Como alternativa, a metilação pode ser efetuada com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico metanólico. No Brasil, foi introduzido em 1973 o método de Hartman & Lago¹⁴ que emprega reagentes comuns, como uma solução de cloreto de amônio, ácido sulfúrico e metanol para esterificação. Requer, no entanto, mais vidrarias (inclusive condensador de água) e maiores manipulações. Aproveitando os aspectos vantajosos dos dois métodos citados, foi experimentado neste trabalho um método que

proporciona rapidez, simplicidade e baixo custo. Utilizou-se o reagente esterificante de Hartman & Lago e as demais etapas descritas por Metcalfe *et alii*, sendo que as reações de hidrólise e esterificação foram, diferentemente de Hartman & Lago realizadas em tubos de ensaio, permitindo assim a análise simultânea de um grande número de amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sardinha e curimatá foram adquiridas no Frigorífico Tavares (Campinas, SP). Amostras de pacu, tilápia e tambaqui foram coletadas de tanques de criação no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura (CEPTA, Pirassununga, SP). Uma outra amostra de tambaqui (alevinos), utilizada para comparar o método proposto e o de Hartman & Lago¹⁴, foi obtida de um cultivo intensivo na Universidade Estadual de Campinas.

Para cada amostra, uma polpa de peixe (uma pasta de tecidos musculares contendo fragmentos de espinhas intramusculares e isenta de pele) foi preparada em moedor de carne de marca Britânia (contendo um disco com furos de aproximadamente 4 mm de diâmetro) a partir de filés sem pele de 6 a 10 exemplares.

Empregou-se o método de Bligh & Dyer⁷ para a extração dos lipídios totais da polpa de pescado, levando-se em conta as proporções recomendadas entre os solventes metanol, clorofórmio e água tissular.

O extrato de lipídios totais foi fracionado em lipídios neutros e fosfolipídios por cromatografia em coluna, num tubo cromatográfico de vidro de 30 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro interno, contendo sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) como adsorvente, de acordo com especificações de Johnston *et alii*¹⁷. O adsorvente foi submetido a um pré-tratamento que consistiu numa lavagem com metanol e depois com clorofórmio, agitando-o por uma hora para cada solvente com agitador magnético. Os solventes foram removidos sob filtração com trompa d'água e o adsorvente foi colocado em dessecador a vácuo até apresentar-se com aspecto bem seco. Vinte e cinco gramas do adsorvente pré-tratado foram misturadas com 60 ml de clorofórmio e colocadas na coluna. Depois do empacotamento, uma camada de 1 cm de sulfato de sódio anidro foi colocada no topo e a altura total do leito foi de aproximadamente 12 cm. Após aplicação da amostra na coluna, utilizou-se a seguinte seqüência de eluição para separação das classes de lipídios: 1) Fração I (lipídios neutros) – eluída com 200 ml de 20% de acetona em CHCl₃ e 2) Fração II (fosfolipídios) – eluída com 200 ml de metanol.

As amostras de lipídios totais, lípidos neutros e fosfolipídios foram saponificadas e os ácidos graxos metilados pelo método de Metcalf *et alii*²⁵, usando trifluoreto de boro em metanol (BF₃-MeOH) como reagente esterificante, ou pelo método proposto no qual o BF₃-MeOH foi substituído por

NH₄Cl-H₂SO₄-MeOH. O procedimento encontra-se esquematizado na Figura 1.

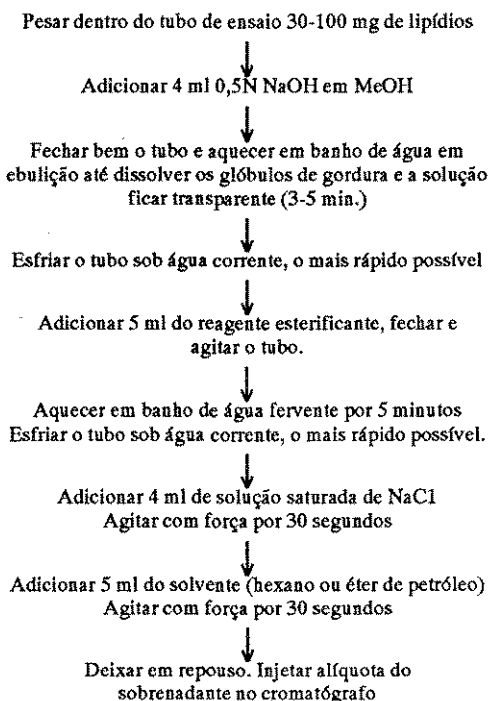


FIGURA 1

Procedimento para a metilação dos ácidos graxos.

O (BF₃-MeOH) (Merck, Alemanha) foi usado como reagente. Para preparar o reagente NH₄Cl-H₂SO₄-MeOH, 10 g de NH₄Cl foram adicionados a 300 ml de MeOH, seguido por 15 ml de H₂SO₄ concentrado, adicionado em pequenas porções com agitação¹⁴.

A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo Varian, modelo 3300, equipado com detector de ionização de chama, injetor do tipo "split/splitless", coluna capilar de sílica fundida (50 cm de comprimento x 0,22 mm de diâmetro interno) (WCOT, SGE, Austrália), contendo polietileno glicol (Carbowax 20M) e integrador processador INTRALAB 4290. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do detector, 280°C, temperatura do injetor, 250°C, temperatura da coluna, 200°C por 42 min., programada a 2°C/min. até 210°C, gás de arraste, hidrogênio com fluxo de 0,8 ml/min, gás "make-up", nitrogênio a 30 ml/min., técnica de injeção, "split" (com razão de "split" de 100:1).

A identificação dos ácidos graxos realizou-se de acordo com os seguintes procedimentos: 1) comparação do tempo de retenção não corrigido e corrigido de ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras e de padrões, 2) técnica de co-eluição de padrões e amostras, 3) comparação com óleos de origem marinha (PUFA-1) e de origem animal (PUFA-2) da

Supelco (EUA), 4) comparação com óleo de fígado de bacalhau (Sigma, EUA), 5) fatores de separação^{14, 20}, 6) comparação da ordem de eluição em coluna capilar SE-54 (apolar) e Carbowax 20M (polar), 7) comprimento equivalente da cadeia (ECL), 8) método gráfico no qual os logaritmos dos tempos de retenção e ECL são plotados contra o número de átomos de carbono dos ácidos graxos², 9) espectrometria de massa por impacto eletrônico a 70 eV, utilizando um cromatógrafo gasoso - espectrômetro de massa Shimadzu QP 2000 A.

Os resultados da comparação de métodos de metilação para os ácidos graxos dos lipídios totais de pacu e sardinha foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo procedimento de modelos lineares gerais, aleatorizado (um fator, dois níveis e três repetições), usando-se o pacote estatístico SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método proposto foi comparado com o de Metcalfe *et alii*²⁵, utilizando lipídios totais musculares de pacu e sardinha, cujas composições de ácidos graxos são diferentes (Tabela 1).

Os cromatogramas obtidos pelos dois métodos não mostraram nenhuma diferença perceptível, tanto para o pacu, como para a sardinha, que apresentaram, respectivamente, um total de 66 e 61 picos. Desses totais apenas os componentes com teores $\leq 0,1\%$ estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença significativa, a nível de 5%, nas percentagens de 18 ácidos graxos de pacu submetidos à análise estatística. De 36 ácidos graxos de sardinha, apenas em dois ácidos graxos (i-17:0 e 16:2n7) obteve-se uma diferença significativa, a nível de 5%. Mesmo para estes dois ácidos graxos, a diferença não foi significativa a nível de 1%. Portanto, os dois métodos foram considerados equivalentes.

O método proposto teve desvios padrões em geral um pouco maiores do que o método de Metcalfe *et alii*²⁵. De acordo com AOAC⁵, a diferença entre os resultados para os ácidos graxos principais (> 5%), obtidos no mesmo dia, pelo mesmo operador e com a mesma amostra, não deve diferir por mais de 3% relativo e valor absoluto de 1%. Para o pacu os desvios, mesmo para o método proposto, ficaram dentro destas especificações. Para a sardinha, nenhum desvio absoluto foi superior a 1%, mas os desvios relativos foram superiores a 3% para 14:0 (6%), 20:5n3 (4%) e 22:6n3 (5%). No entanto, no decorrer do trabalho, as duplicatas obtidas por este método ficaram dentro das exigências da AOAC.

Os dois métodos também foram aplicados às frações lipídios neutros e fosfolipídios de pacu e de outras espécies (curimatá, tilápia e tambaqui) Tabelas 2 a 5. Os resultados revelaram-se muito semelhantes, demonstrando a ampla aplicabilidade do método proposto.

TABELA 1

Composição percentual* de ácidos graxos de lipídios totais de pacu, *Piaractus mesopotamicus* e sardinha, *Sardinella brasiliensis*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido graxo	Pacu		Sardinha	
	Método A	Método B	Método A	Método B
11:0	-----	-----	0,07±0,01	0,07±0,01
12:0	-----	-----	0,25±0,01	0,25±0,03
14:0	4,03±0,22	3,69±0,23	7,60±0,09	7,69±0,47
14:1n5	0,45±0,02	0,42±0,04	-----	-----
i-15:0	-----	-----	0,09±0,00	0,10±0,01
15:0	0,18±0,01	0,17±0,01	0,40±0,01	0,39±0,02
i-16:0	-----	-----	0,05±0,00	0,05±0,01
16:0DMA	0,20±0,01	0,21±0,01	-----	-----
16:0	26,33±0,43	25,54±0,31	20,60±0,22	20,90±0,59
16:1n7	9,12±0,15	9,12±0,13	8,75±0,03	8,92±0,30
i-17:0	-----	-----	0,38±0,02**	0,44±0,02**
16:2n7	-----	-----	0,43±0,02**	0,48±0,02**
16:2n4	-----	-----	1,29±0,02	1,26±0,03
17:0	0,19±0,01	0,20±0,02	0,42±0,02	0,45±0,01
17:1n11	-----	-----	1,37±0,10	1,38±0,05
17:1n9	0,19±0,01	0,20±0,02	-----	-----
i-18:0	-----	-----	0,11±0,01	0,11±0,02
16:4n3	-----	-----	2,25±0,07	2,17±0,12
18:0	8,19±0,16	8,03±0,20	3,94±0,02	3,93±0,07
18:1n9+n7	38,16±0,54	39,65±1,06	11,26±0,06	11,37±0,10
18:1n4	-----	-----	0,40±0,06	0,39±0,01
18:2n6	9,55±0,13	9,40±0,05	0,83±0,05	0,79±0,01
18:2n4	-----	-----	0,30±0,06	0,25±0,01
18:3n6	0,10±0,02	0,11±0,04	0,26±0,12	0,18±0,04
19:1n11	-----	-----	0,09±0,01	0,08±0,02
18:3n3	0,5±0,03	0,48±0,02	0,63±0,01	0,60±0,07
18:4n3	-----	-----	2,52±0,04	2,47±0,06
19:2n6	-----	-----	0,36±0,01	0,35±0,01
20:0	-----	-----	0,28±0,01	0,26±0,02
20:1n9	0,66±0,03	0,70±0,05	1,54±0,05	1,43±0,09
20:2n9	0,19±0,03	0,18±0,04	0,46±0,01	0,45±0,03
20:2n6	-----	-----	-----	-----
+	0,61±0,09	0,64±0,03	0,09±0,01	0,08±0,01
20:3n9	-----	-----	-----	-----
20:4n6	0,86±0,03	0,76±0,09	1,49±0,04	1,51±0,05
20:4n3	-----	-----	0,86±0,09	0,79±0,06
20:5n3	-----	-----	17,77±0,11	17,67±0,70
22:1n11	-----	-----	0,86±0,06	0,76±0,14
22:5n6	-----	-----	0,22±0,01	0,22±0,02
22:5n3	-----	-----	1,68±0,04	1,68±0,10
22:6n3	0,47±0,01	0,50±0,11	10,28±0,08	10,09±0,53

* Os valores são médias e desvios padrão de determinações em triplicatas para cada método.

** Significativamente diferentes ao nível de 5%, porém sem diferença significativa ao nível de 1%. Os teores dos demais ácidos graxos não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5%.

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; i – iso; DMA – dimetilacetal.

TABELA 2

Composição percentual de ácidos graxos de lípidios neutros e fosfolípidios de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido graxo	Lípidios neutros		Fosfolípidios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
14:0	3,9	4,1	0,8	0,6
14:1n5	0,5	0,4	----	----
15:0	0,2	0,2	----	----
15:1n9	----	----	0,6	0,4
16:0DMA	----	----	6,4	6,2
16:0	26,9	27,0	23,1	20,5
16:1n7	9,2	9,1	2,5	2,3
17:0	0,2	0,2	----	----
17:1n9	0,2	0,2	----	----
18:0DMA	----	----	1,4	1,3
18:1DMA	----	----	0,9	0,9
18:0	8,2	8,1	10,0	9,4
18:1n9+n7	40,1	40,1	16,5	19,7
18:2n6	9,6	9,6	8,9	8,7
18:3n3	0,5	0,5	----	----
20:1n9	0,6	0,5	----	----
20:3n6	----	----	2,8	2,9
20:4n6	----	----	10,6	11,0
22:5n6	----	----	5,2	6,1
22:6n3	----	----	8,5	9,8

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; DMA – dimetilacetal.

TABELA 3

Composição percentual de ácidos graxos de lípidios neutros e fosfolípidios de Curimatá, *Prochilodus scrofa*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lípidios Neutros		Fosfolípidios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
12:0	0,3	0,3	-	-
XI	0,1	0,1	-	-
13:0	0,5	0,5	-	-
i-14:0	0,4	0,4	-	-
14:0	5,5	5,4	0,7	0,7
14:1n7	0,1	0,1	-	-
14:1n5	0,1	0,1	-	-
i-15:0	1,8	1,8	-	-
ai-15:0	0,7	0,7	-	-
X2	0,2	0,2	-	-
15:0	2,9	2,9	1,2	1,2
15:1n9	0,2	0,2	0,4	0,4
15:1n7	0,2	0,2	-	-
i-16:0	0,8	0,8	-	-
16:0DMA	-	-	3,0	3,1
16:0	22,1	22,0	24,3	24,6
16:1n7	15,0	14,9	3,7	3,7
16:1n5	1,2	1,2	0,8	0,8
i-17:0	1,6	1,6	0,4	0,5
ai-17:0	1,0	1,0	0,5	0,6
17:0	1,9	1,9	1,2	1,1
17:1n9	1,6	1,6	0,4	0,5
i-18:0	0,7	0,7	-	-
18:0DMA	-	-	1,1	1,1
17:2n5	0,4	0,4	-	-
18:0	5,1	5,2	7,5	7,4
18:1n9+n7	13,7	13,7	8,4	8,3
18:2n6	2,9	2,8	2,2	2,2
18:3n6	0,4	0,3	-	-
19:0	0,4	0,3	-	-
19:1n11	0,5	0,4	-	-
18:3n3	4,6	4,3	2,2	1,9
18:4n3	1,0	1,0	-	-
20:0	0,5	0,5	-	-
20:1n9	1,7	1,9	-	-
20:2n6+20:3n9	0,6	0,6	-	-
20:3n6	0,5	0,6	-	-
20:4n6	2,4	2,5	12,2	12,3
20:3n3	0,6	0,7	-	-
20:4n3	1,5	1,5	-	-
20:5n3	2,2	2,4	6,5	6,8
22:5n6	-	-	6,0	6,4
22:5n3	-	-	2,6	3,1
22:6n3	2,0	2,2	14,3	13,0

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*, Método B – Método proposto, X – não identificado; i – Iso, ai – anteiso, DMA – dimetilacetil.

TABELA 4

Composição percentual de ácidos graxos de lipídios neutros e fosfolipídios de tilápia, *Oreochromis niloticus*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lipídios Neutros		Fosfolipídios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
12:0	0,1	0,1	-	-
14:0	5,6	5,9	1,0	1,0
i-15:0	0,3	0,3	-	-
15:0	0,3	0,3	0,2	0,2
16:0DMA	-	-	2,5	2,6
16:0	28,6	29,0	29,2	27,8
16:1n7	7,3	7,7	1,8	1,9
i-17:0	0,1	0,1	-	-
ai-17:0	0,1	0,1	-	-
17:0	0,2	0,2	0,2	0,2
17:n9	0,2	0,2	0,2	0,2
18:0DMA	-	-	0,9	0,9
18:1DMA	-	-	1,2	1,5
18:0	5,6	5,5	9,4	8,6
18:1n11	0,1	0,2	-	-
18:1n9+n7	31,2	31,1	17,0	16,4
18:1n5	0,1	0,1	-	-
18:1n4	0,2	0,2	-	-
18:2n6	12,9	13,1	14,5	14,0
18:3n6	0,6	0,6	0,3	0,3
18:3n3	0,6	0,6	0,2	0,2
20:0	0,2	0,2	-	-
20:1n9	1,9	1,4	0,3	0,5
20:2n6+20:3n9	1,0	0,7	1,5	1,6
20:3n6	0,6	0,6	2,0	2,2
20:4n6	0,7	0,6	7,4	7,8
22:4n6	0,6	0,5	-	-
22:5n6	0,4	0,4	4,9	5,6
22:5n3	-	-	0,4	0,7
22:6n3	0,5	0,3	4,9	5,8

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; i – iso, ai – anteiso, DMA – dimetilacetil.

TABELA 5

Composição percentual de ácidos graxos de lipídios neutros e fosfolipídios de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lipídios Neutros		Fosfolipídios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
14:0	1,5	1,7	-	-
14:n5	0,1	0,1	-	-
15:0	0,1	0,1	-	-
16:0DMA	-	-	5,4	5,9
16:0	29,6	30,4	19,9	21,6
16:1n7	6,3	6,6	1,7	2,4
17:0	0,2	0,1	-	-
17:1n9	-	-	1,3	1,3
18:0	10,7	10,4	13,9	11,7
18:1n9+n7	40,5	39,9	21,9	22,1
18:2n6	8,5	8,5	10,4	10,8
18:3n3	0,6	0,5	-	-
20:1n9	1,3	1,2	-	-
20:3n6	0,4	0,3	3,7	3,3
20:4n6	0,2	0,2	8,8	8,9
22:5n6	-	-	3,0	3,1
22:6n3	-	-	10,0	8,9

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; DMA – dimetilacetil.

TABELA 6

Composição percentual de ácidos graxos de lipídios totais de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lipídios Totais	
	Método A	Método C
14:0	1,3	1,2
15:0	0,2	0,2
16:0DMA	0,5	0,6
6,0	29,3	29,1
16:1n7	5,9	5,2
17:0	0,2	0,2
18:0 DMF	0,2	0,3
18:0	8,2	8,9
18:1n9+N7	30,6	31,4
18:2n6	16,7	16,0
18:3n6	0,2	0,2
18:3n3	0,8	0,7
20:1n9	0,8	1,0
20:2n6+20:3n9	0,8	0,8
20:3n6	0,9	0,9
20:4n6	1,4	1,3
22:5n6	0,6	0,6
22:6n3	1,2	1,2

abreviaturas: Método B – Método proposto, Método C – Método de Hartman & Lago; DMA – dimetilacetato.

Este método foi também comparado com o de HARTMAN e LAGO¹⁴ em uma amostra de tambaqui (Tabela 6), demonstrando a equivalência dos dois métodos.

CONCLUSÕES

O reagente BF₃-MeOH pode ser substituído por NH₄C1-H₂SO₄MeOH no método de METACALFE *et alii*, sem comprometer a confiabilidade dos resultados. O método proposto demonstrou o mesmo desempenho que o de Metcalfe *et alii* com lipídios de diversas espécies de peixes, amostras reconhecidamente complexas. Portanto, além de simplicidade, rapidez e baixo custo, este método apresenta ampla aplicabilidade.

AGRADECIMENTOS

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

RIALA6/743

MAIA, E.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. – Evaluation of a simple and inexpensive method for the methylation of fatty acid with lipids of various fish species. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):27-35, 1993.

ABSTRACT: Different techniques are available for the preparation of fatty acid methyl esters, each having advantages and disadvantages. The method of METACALFE *et alii* utilizes the reagent BF₃-MeOH which is expensive and imported that of HARTMAN and LAGO employs common reagents but requires great amount of glassware and manipulations. Putting together the beneficial features of the two methods mentioned, a new method that provides speed, simplicity and low cost was evaluated. The methylating reagent of HARTMAN and LAGO and the rest of the procedure of METACALFE *et alii* were used, all the stages being carried out in a test tube. This method was compared with that of METACALFE *et alii*, utilizing the muscle lipid of *Piaractus mesopotamicus* and *Sardinella brasiliensis*. Separation and quantitation of the fatty acids were accomplished by high resolution gas chromatography. No significant differences were observed at 5% level in the percentages of 18 fatty acids of *P. mesopotamicus*. Of 36 fatty acids of *S. brasiliensis*, only two showed significant difference at 5% level. Even with this two fatty acids, the difference was not significant at 1% level. The two methods were therefore shown to be equivalent. These two methods also gave similar results with lipids of *Prochilodus scrofa*, *Oreochromis niloticus* and *Colossoma macropomum*, demonstrating the wide applicability of the proposed method.

DESCRIPTORS: methylation, fatty acids, fish, gas chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKMAN, R.G. - An analysis of separation factors applicable in the gas-liquid chromatography of unsaturated fatty acid methyl esters on a polyester substrate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40:564-67, 1963.
2. ACKMAN, R.G. - Structural correlation of unsaturated fatty acid esters through graphical comparison of gas-liquid chromatographic retention times on a polyester substrate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40:558-64, 1963.
3. ACKMAN, R.G. - Nutritional composition of fats in seafoods. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 13:161-241, 1989.
4. ACKMAN, R.G. & BURGHER, R.D. A proposed basis for the systematic identification of unsaturated fatty acid esters through gas-liquid chromatography on polyester substrates. *J. Chromatog.*, 11:185-94, 1963.
5. A.O.A.C. - *Official methods of analysis*, 15th ed., p. 964-65. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1990.
6. BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. de, TAVARES, M. & AUED-PIMENTEL, S. - Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e decosa-hexaenóico (DHA) em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplemento à base de sardinha. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2):75-81, 1991.
7. BLIGH, E.G. & DYER, W.J. - A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911-17, 1959.
8. BURR, M.L. - Fish and the cardiovascular system. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 13:291-316, 1989.
9. CASTELO, F.P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. & STRONG III, F.C. - Aproveitamento e características da gordura cavitária do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. *Acta Amazonica*, 10:557-76, 1980.
10. DYERBERG, J. Platelet vessel wall interaction: influence of diet. *Phil. Trans. Royal Soc. London*, B294:373, 1981.
11. DYERBERG, J. & BANG, H.O. - Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*, ii:433-35, 1979.
12. DYERBERG, J.; BANG, H.O.; STOFFERSEN, E.; MARCADA, S. & VANE, J.R. - Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet*, ii: 117-19, 1978.
13. GIBSON, R.A. - Australian fish - An excellent source of both arachidonic acid and w3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 18: 743-52, 1983.
14. HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. - Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Prac.*, 22:475-6, 94, 1973.
15. HEARN, T.L.; SGOUTAS, S.A.; HEARN, J.A. & SGOUTAS, D.S. - Polyunsaturated fatty acids and fat in fish flesh for selecting species for health benefits. *J. Food Sci.*, 52:1209-11, 1987.
16. HEROLD, P.M. & KINSELLA, J.E. - Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: A comparison of findings from animal and human feeding trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43:566-98, 1986.
17. JOHNSTON, J.J.; GHANBARI, H.A.; WHEELER, W.B. & KIRK, J.R. - Characterization of shrimp lipids. *J. Food Sci.*, 48:33-35, 1983.
18. JORGENSEN, K.A. & DYERBERG, J. Platelets and atherosclerosis. *Adv. Nutr. Res.*, 5:57, 1983.
19. KAGAWA, Y., NISHIZAWA, M. & SUZUKI, M. - Eicosenoic acid of serum of Japanese islanders with low cardiovascular disease. *J. Nutr. Sci.*, 24:441, 1982.
20. KATES, M. - Techniques of lipidology, p. 269-610. North Holland/American Elsevier Publ. Co., 1972.
21. KINSELLA, J.E. - Dietary fat and prostaglandins: Possible beneficial relationships between food processing and public health. *Food Technol.*, 35:89-98, 1981.
22. KINSELLA, J.E. - Food components with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Technol.*, 40:89-97, 1986.
23. MACEDO VIEGAS, E.M.; BARRERA-ARELLANO, D. & CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. - Effect of diets with palm oil and soybean oil deodorizer distillate on tambaqui (*Colossoma macropomum*) fatty acid composition. In: BARRERA-ARELLANO, D. & GONÇALVES, L.A.G. (eds.), *Proceedings of the International Meeting on Fats & Oils Technology*, p. 193-96, Campinas, São Paulo, 1991.
24. MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & AMAYA-FÁRFAN, J. - Proximate, fatty acid and amino acid composition of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Food Chem.*, 12:275-86, 1983.
25. METCALFE, L.D.; SCHMITZ, A.A. & PELKA, J.R. - Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 38:514-15, 1966.
26. OGAWA, M. PRICE, R.L., BARROSO, M.A.T. & BESERRA, F.J. - Characteristics of shark liver oils from Northeastern Brazil. *Arq. Cienc. Mar.*, 14:57-60, 1974.
27. SINCLAIR, A.J.; O'DEA, K. & NAUGHTON, J.M. - Elevated levels of arachidonic acid in fish from northern Australian coastal waters. *Lipids*, 18:877-81, 1983.
28. VLIEG, P. & BODY, D.R. - Lipid contents and fatty acid composition of some New Zealand freshwater finfish and marine finfish, shellfish, and roes. *New Zealand J. Mar. Fresh. Res.*, 22:151-62, 1988.
29. WANG, Y.J., MILLER, L.A.; PERREN, M. & ADDIS, P.B. - Omega-3 fatty acids in Lake Superior fish. *J. Food Sci.*, 55:71-73, 76, 1990.

Recebido para publicação em 4 de dezembro de 1992.

DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CORTICOSTERÓIDES EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS ALTERNATIVAS UTILIZADAS EM TRATAMENTO DE ASMA BRÔNQUICA E BRONQUITES.*

Mariangela Tírico AURICCHIO**
Blanca E. Ortega MARKMAN**
Mônica Arcon BATISTIC**

RIALA6/744

AURICCHIO, M.T.; MARKMAN, B.E.O. & BATISTIC, M.A. Detecção da presença de corticosteróides em preparações farmacêuticas alternativas utilizadas em asma brônquica e bronquite. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):37-40, 1993.

RESUMO: Este estudo teve por objetivo a identificação de substâncias corticosteróides em preparações alternativas para tratamento de asma brônquica e bronquite, vendidas em farmácias e comercializadas sem qualquer indicação de sua composição. Em 24,6 por cento do total de 61 amostras analisadas encontraram-se, efetivamente, substâncias corticosteróides.

O método empregado para a identificação de corticosteróides foi cromatografia em camada delgada em função da rapidez da técnica e da alta sensibilidade.

DESCRITORES: Corticosteróides, detecção de, preparações alternativas para bronquite e asma brônquica.

INTRODUÇÃO

O presente estudo teve por objetivo a identificação de substâncias corticosteróides em preparações farmacêuticas alternativas destinadas ao tratamento da asma brônquica e da bronquite, comercializadas sem receita médica, em algumas farmácias da cidade de São Paulo.

Tais preparações não apresentavam fórmula declarada na rotulagem, nem qualquer outra indicação com relação à composição que permitisse o aprofundamento da análise química. As solicitações de análise traziam poucas informações quanto à possível composição, sendo que o segredo de sua identidade pertencia ao fabricante do produto.

Estes "remédios" eram recomendados indiscriminadamente a adultos e crianças pelo comerciante do produto, independente de qualquer avaliação e recomendação médica.

Com o hábito da automedicação tão difundido em nossa população, estas preparações foram sendo indicadas pelos parentes e amigos às pessoas com queixas e relatos de problemas semelhantes.

Algumas vezes, porém, os efeitos colaterais dos corticosteróides eram observados nos usuários que, então, recorreram ao nosso laboratório em função da suspeita quanto à presença deste tipo de substância na preparação.

Segundo definição da Organização Mundial da Saúde de 1975⁷ a asma é uma doença crônica caracterizada por espasmo recorrente, resultante de uma tendência ao desenvolvimento do estreitamento reversível das vias aéreas, em resposta a estímulos de um nível ou intensidade que não induzem tal estreitamento na maioria dos indivíduos; autores definem a asma como uma doença onde ocorre a hiperreatividade brônquica devido a vários estímulos alérgicos ou não alérgicos^{6, 7, 13}.

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

** Da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz.

Apesar dos corticosteróides antagonizarem praticamente todas as etapas da resposta inflamatória na asma,^{2, 4, 10, 11} não são medicamentos com efeito curativo sobre a causa da doença. Seu emprego é indicado em casos de crise aguda de asma brônquica, quando a redução do edema se faz necessária, para que então se possa obter a ação dos outros medicamentos como os agonistas beta-adrenérgicos, broncodilatadores, teofilina e outros.^{1, 3, 4, 5, 6, 9, 15}

Os efeitos colaterais dependem da dose e também da forma de apresentação; devem sempre ser considerados, já que todas as vias de administração levam à absorção sistêmica.

Assim sendo, este estudo questiona a prática fraudulenta de algumas farmácias ao venderem "remédios alternativos", sem fórmula, muitas vezes contendo substâncias terapêuticamente ativas cujo emprego deve ocorrer sob critério e acompanhamento médico^{1, 2, 11, 12, 14} para monitoramento dos efeitos adversos.

Para a detecção dos corticosteróides empregou-se a cromatografia em camada delgada utilizando-se de metodologia proposta em Clarke⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras analisadas foram provenientes de usuários, órgãos da Vigilância Sanitária e Procon.

Foram analisadas 61 amostras de formulações farmacêuticas utilizadas em bronquite e asma brônquica, das quais 56 eram líquidos xaroposos, quatro comprimidos e uma pó.

PROCEDIMENTOS

a) preparo da amostra – uma alíquota de aproximadamente 20 ml foi submetida à extração com três porções de 30 ml de acetato de etila em meio neutro e filtrados por sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em 0,5 ml de acetato de etila e aplicado diretamente sobre a placa.

b) preparo do padrão – a substância de referência utilizada foi a hidrocortisona dissolvida em acetato de etila.

– Fase estacionária: placas de silicagel G60 (20x20).

– Fase móvel: cloreto de metileno: dioxano: água (10:5:5). Agitados, deixados separar e utilizada a camada inferior.

– Desenvolvimento: único, ascendente de 15 cm.

– Para ser evaporado o solvente, aquecer a placa a 105 graus centígrados por cinco minutos.

– Revelador: solução de DPST*. As manchas aparecem na coloração de lilás a roxo.

* Reativo DPST

azul de tetrazólio 5 mg
metanol p.a. 25 ml

Observação: Completar o volume até 50 ml com hidróxido de sódio 2N no momento do uso.

Todas as determinações foram sempre realizadas contra a hidrocortisona como substância de referência, uma vez que o objetivo da detecção era caracterizar a presença de componente de natureza corticosteróide.

RESULTADOS

Os resultados obtidos das análises efetuadas para pesquisa de substâncias corticosteróides nas 61 amostras processadas estão sumarizados na Tabela 1.

TABELA 1

Distribuição da frequência de substâncias corticosteróides em "preparações para bronquite" segundo forma farmacêutica. Seção de Farmacognosia*, 1993.

Corticosteróide	FORMA FARMACÊUTICA							
	Xarope		Comprimido		Pó		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sim	14	25,0	–	–	1	100,0	15	24,6
Não	42	75,0	4	100,0	–	–	46	75,4
Total	56	100,0	4	100,0	1	100,0	61	100,0

* Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Na tabela 2, estão colocados os dados referentes à procedência das solicitações das pesquisas de corticosteróides.

TABELA 2

Distribuição da frequência de amostras analisadas segundo a procedência da solicitação do exame e forma farmacêutica. Seção de Farmacognosia*. 1993.

Procedência	FORMAS FARMACÊUTICAS						Total	
	Xarope		Comprimido		Pó		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Usuário	41	73,2	2	50,0	1	100,0	44	72,1
S.U.S.	15	26,8	-	-	-	-	15	24,6
PROCON	-	-	2	50,0	-	-	2	3,3
TOTAL	56	100,0	4	100,0	1	100,0	61	100,0

* Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

DISCUSSÃO

Segundo os resultados obtidos na tabela 1, verifica-se a presença de corticosteróides em 24,6 por cento das amostras analisadas.

Dentre as formas farmacêuticas apresentadas, os xaropes prevalecem em relação aos pós e comprimidos. Esta forma farmacêutica, que é de manipulação simples, pode ser mais facilmente fraudada, sendo também de melhor aceitação por crianças, onde se verifica uma maior incidência dos problemas brônquicos.

A maioria destas preparações xaroposas apresentou a mesma coloração e aspecto e, segundo informações dos usuários, destinava-se igualmente a adultos e crianças.

Um aspecto interessante a se ressaltar é que raramente os usuários concordaram em informar o local onde adquiriram o produto, dizendo terem comprado numa farmácia "perto de casa"; outras vezes, levavam o medicamento ao médico que por sua vez lhes recomendava encaminhar o remédio para analisar e verificar sua composição.

Conhecendo-se a estratégia terapêutica no tratamento da asma brônquica e com as informações dos usuários a respeito dos efeitos das preparações alternativas, começou-se a pesquisar a presença de corticosteróides nas amostras.

O fato de 24,6 por cento das amostras analisadas terem indicado a presença de corticosteróides, sem que este fosse declarado na fórmula, constitui violação grave da Lei de Vigilância Sanitária e um risco sob o ponto de vista da Saúde Pública, pois a utilização de corticosteróides nos processos asmáticos deve ocorrer dentro do esquema terapêutico delineado pelo médico e exclusivamente sob supervisão deste profissional.

Com relação aos dados mostrados na tabela 2, observou-se que 72,1 por cento das amostras foram procedentes dos próprios usuários independentemente da ação de alguma autoridade de Saúde, enquanto que apenas 24,6 por cento das amostras foram encaminhadas por organismos do S.U.S.. Este fato demonstra que as autoridades de Saúde deveriam permanecer alertas e fornecer condições para que a Vigilância Sanitária pudesse atuar segundo programas racionais de monitoramento avaliando continuamente a qualidade, a propaganda e a maneira como estes "medicamentos alternativos" são comercializados.

CONCLUSÃO

A idéia de que os medicamentos alternativos possibilitam a cura indiscriminada de doenças (e muitas vezes várias doenças ao mesmo tempo) representa um retrocesso na terapêutica convencional, já que a ciência tem fornecido subsídios suficientes para que se tenha sempre em mente a relação risco/benefício, intrínseca aos medicamentos e que sabidamente não são livres de efeitos colaterais.

Programas de informação sobre uso e riscos de preparações alternativas deveriam ser contemplados com a atuação das autoridades de Saúde, ao mesmo tempo que a propaganda em veículos de comunicação, como rádio e televisão, deve ser rapidamente regulamentada.

AURICCHIO, M.T.; MARKMAN, B.E.O. & BATISTIC, M.A. Detecção da presença de corticosteróides em preparações farmacêuticas alternativas utilizadas em tratamento de asma brônquica e bronquites. – *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):37-40, 1993.

ABSTRACT: The main goal in this study was to identify corticosteroid substances in alternative medicines for asthma and chronic bronchitis; Such medicines are sold in some pharmacies in the city of São Paulo without any information about its composition. Corticosteroid substances were found in 24,6 per cent from the total number of analysed samples.

Thin-layer chromatography was adopted to achieve the detection of corticosteroid due to its high sensibility. (around 1 microgramma).

DESCRIPTORS: Corticosteroids, detection of, alternative medicine in bronchitis and asthma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN THORACIC SOCIETY – Standards for the Diagnoses Care of Patients with Chronic Obstrutive Pulmonary Disease (COPD) and Asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136:225-44, 1987.
2. BARNES, P.J. – Asma brônquica – *Revisão terapêutica*. *Pediatria Moderna*, 26(6):408-20, 1991.
3. BRYANT, D.H. – Nebulized Ipratropium Bromide in the Treatment of Acute Asthma. *Chest*, 88(1): 24-9, 1985.
4. CLARKE, E.G.C. – Isolation and Identification of Drugs. Willian Clowes & Sons, London, pg. 56, 1974.
5. GILMAN, A. – Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th Edition, Ed. Pergamon Press, New York, 1990.
6. HAAHTELA, T. et Co. – Comparison of a beta 2 – Agonist, Terbutaline, with an Inhaled Corticosteroid, Budesonide, in newly detected asthma. *The New England Journal of Medicine*, 352(6): 388-92, 1991.
7. MALLOZI, M.C. – Asma Brônquica: Diagnóstico de Casos Atípicos. *Pediatria Moderna*, 25(5):186-90, 1990.
8. MCFADDEN, E.R. Jr., LENNER, K.A.M. and STROHL, K.P. – Postexertionol Airway Rewarming and Thermally Induced Asthma. *J. Clin. Invest.* 78(July):18-25, 1986.
9. MULLARKEY, M. F.; BLUMENSTEIN, B.A., ANDRADE, P., BAILEY, G.A., OLOSON, T. AND WETZEL, C.E. Methotrexate in the treatment of corticosteroid dependent asthma, *The New England Journal of Medicine*. 318(10):603-6, 1988.
10. NASPITZ, C. – Asma Brônquica, *Pediatria Moderna*, 25(5):189-90, 1990.
11. SCALABRIN, D.M.F. – Crise de Asma: Fisiopatologia, Diagnóstico e Tratamento, *Pediatria Moderna*, 25(5): 193-210, 1990.
12. SOLE, D. – Abordagem Terapêutica do "bebê-chiador", *Pediatria Moderna*, 25(5):212-219, 1990.
13. TIETZE, K.J. and SMITH, N.C. – New Directions in the Treatment of Asthma. *American Pharmacy*, 31(12): 64-72, 1991.
14. WANDALSEN, N.F. – Corticosteróides: Conceitos Atuais sobre o seu emprego na asma brônquica. *Pediatria Moderna*, 25(5):220-226, 1990.

Recebido para publicação em 4 de dezembro de 1992.

DETERMINAÇÃO DE VALORES-ALVO PARA USO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE ANALISADORES HEMATOLÓGICOS.*

Marcos Antonio Gonçalves MUNHOZ**
Ryuko Miyamaru YOKOMIZO**
Elena Yoko GUSHIKEN**
Vânia Maria Cação ZAMFIROV**
Inês de Castro ARRUDA**
Fernanda Alves CANGERANA**
Luiz Ítalo NIERO**
Raymundo Soares de AZEVEDO NETO***

RIALA6/745

MUNHOZ, M.A.G.; YOKOMIZO, R.M.; GUSHIKEN, E.Y.; ZAMFIROV, V. M.C.; ARRUDA, I.C.; CANGERANA, F.A.; NIERO, L.I. & AZEVEDO NETO, R.S. - Determinação de valores-alvo para uso no controle de qualidade de analisadores hematológicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2): 41-47, 1993.

RESUMO: Os autores relatam um estudo retrospectivo realizado com valores hematimétricos (hemoglobina, hematócrito e hemácias), índices hematimétricos (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média) e leucócitos, obtidos em 3 anos (1988 a 1990), provenientes de dois analisadores hematológicos semi-automatizados, previamente calibrados com padrões primários e amostra controle, para estabelecimento de valores-alvo (média das médias diárias), que serão utilizados no monitoramento da exatidão desses equipamentos.

Preliminarmente, foram calculadas as médias, as medianas, as modas e as frequências das 1000 primeiras determinações do ano de 1988, para avaliação das distribuições da população estudada.

A seguir, realizou-se estudo estatístico retrospectivo através de microcomputador, analisando-se 613 rotinas, com 392.000 determinações, de 56.000 pacientes de Centros de Saúde do ERSA 2, Município de São Paulo, sendo calculadas as médias aritméticas, os desvios padrão e os coeficientes de variação, e determinadas as medianas e as médias aritméticas máximas e mínimas, de cada ano em separado e nos três anos em conjunto.

Das relações entre os valores hematimétricos, foram obtidas fórmulas empíricas para serem usadas no controle dos analisadores hematológicos.

Os valores-alvo obtidos foram: Hemoglobina 13,4 g/dL, Hematócrito 40,1% Hemácias $4,63 \times 10^6/\text{mm}^3$, Volume corpuscular médio $86,7 \mu^3$, Hemoglobina corpuscular média 29,1 pg, Concentração de hemoglobina corpuscular média 33,5% e Leucócitos $7,91 \times 10^3/\text{mm}^3$.

Os intervalos de referência dos valores-alvo são apresentados com 1 e 2 desvios padrão.

DESCRITORES: Controle de qualidade, valores-alvo, analisadores hematológicos, valores hematimétricos, índices hematimétricos, leucócitos.

* Realizado na Seção de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central e na Disciplina de Informática Médica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO

O monitoramento da exatidão de contadores celulares e hemoglobinômetros pode ser realizado através do estudo estatístico das médias aritméticas dos valores de Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Hemácias (Hem), Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), da rotina diária, em comparação com valores-alvo já determinados. A exatidão dos resultados fornecidos por esses aparelhos é fundamental na complementação dos diagnósticos médicos.

Bull *et al.*^{5, 6}, Gilmer *et al.*^{10, 11}, Rosenfeld *et al.*¹⁸, Koepke & Protector¹⁴, Cembrowski & Westgard⁷, Levy *et al.*¹⁵, Borges *et al.*^{3, 4}, Simmons & Chin¹⁹ e Lotspeich-Steininger *et al.*¹⁶, descrevem em seus trabalhos o emprego de valores-alvo de índices hematimétricos na avaliação do desempenho de equipamentos hematológicos.

O presente trabalho tem como objetivos apresentar e analisar valores-alvo de índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), de valores hematimétricos (Hb, Ht e Hem) e leucócitos (Leuc), obtidos através de um estudo estatístico retrospectivo de dados de três anos de rotinas diárias, para posteriormente aplicá-los em nosso Controle de Qualidade interno.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nos últimos anos calibramos diariamente dois analisadores hematológicos semi-automatizados com padrões comerciais nacionais (CELM), internacionais (Baxter, Coulter), amostras preparadas em nosso laboratório¹³ e uma amostra controle triada da rotina diária, usada na avaliação da reprodutibilidade desses aparelhos¹⁷. Esses equipamentos são constituídos por diluidores automáticos (CELM DA 500), contadores celulares (Sysmex microcell counter CC - 110) e hemoglobinômetros (CELM Hb 520), que utilizam solução diluente (5 litros de água destilada /1 Cellmkit) e solução hemolisante (Cellmlise); e fornecem valores de Hemoglobinas (Hb), Hemácias (Hem) e Leucócitos (Leuc). As amostras de sangue humano venoso analisadas nesses equipamentos foram coletadas em tubos de vidro (sistema a vácuo, 5 ml) contendo anticoagulante EDTA. Os valores dos Hematócritos (Ht) foram obtidos por micrométodo, em capilares de vidro (Perfecta), após centrifugação em microcentrifuga. (MH CELM, 11.500 rpm/ 5 min), sem a correção ($\times 0,97$) proposta por England *et al.*⁸. Os valores dos índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (Hemoglobina corpuscular média) e CHCM (Concentração de hemoglobina corpuscular média), foram calculados posteriormente às análises.

Avaliamos preliminarmente as médias aritméticas, as medianas, as modas e as freqüências das primeiras

1000 determinações (1988) das Hemoglobinas, Hematócritos, Hemácias, índices hematimétricos correspondentes, e dos Leucócitos.

A observação gráfica computadorizada (Lotus 1. 2. 3) das freqüências, e os resultados das três medidas de tendência central de cada determinação não apresentando diferenças significativas entre si, sugeriram que as distribuições estudadas são gaussianas.

Posteriormente, realizamos em microcomputador (XT 238R, ADD - Tec. Ind. Elet.), programa Lotus 1.2.3, um estudo estatístico retrospectivo dos valores de 3 anos (1988-1990), digitando 613 rotinas diárias, contendo 392.000 determinações (Hb, Ht, Hem, VCM, HCM, CHCM e Leuc) provenientes de 56.000 pacientes, atendidos em sua maioria nos Centros de Saúde do Escritório Regional de Saúde - ERSA 2, Município de São Paulo.

Calculamos para cada determinação, a média aritmética (\bar{x}), o desvio padrão (SD), e o coeficiente de variação (CV), de cada ano e dos três anos em conjunto.

Encontramos para cada determinação, a mediana e as médias aritméticas máxima e mínima de cada ano.

Os intervalos de referência com 1.SD e 2.SD foram calculados para todos os valores-alvo. Nossos valores-alvo são apresentados conjuntamente com os valores de autores nacionais e internacionais. Os valores-alvo dos micro-hematócritos, VCM e CHCM não corrigidos e corrigidos ($\times 0,97$, devido à quantidade de plasma retido entre as hemácias), são também apresentados com o objetivo de mostrarmos as variações existentes entre seus valores.

Com os valores das Hemoglobinas, Hematócritos e Hemácias, dos três anos estudados, pudemos calcular fórmulas empíricas para serem usadas no Controle de Qualidade dos analisadores hematológicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dorsey⁸ em 1963, descreveu o uso de média aritmética diária da Hemoglobina corpuscular média, como forma de controle de qualidade para contadores Coulter.

Bull *et al.*⁵ em 1974, realizaram estudos estatísticos sobre as médias aritméticas de índices hematimétricos, provenientes de amostras de sangue total de pacientes hospitalizados, e descreveram um processo formal de cálculo (Algoritmo de Bull), para detectar perdas na calibração de contadores hematológicos. Bull & Hay⁶ em 1985, estudando índices hematimétricos de pacientes hospitalizados na Califórnia, País de Gales e em Tóquio, verificaram não haver diferenças significantes entre esses valores, considerando-os como índices internacionais.

No Brasil, Rosenfeld *et al.*¹⁸ em 1977, Borges *et al.*³ em 1981 e Borges⁴ em 1987, descreveram o uso de valores-alvo de índice hematimétricos no controle de qualidade de contadores hematológicos de múltiplos canais.

Desde 1987 estabelecemos um Programa de Controle de Qualidade, que inclui um monitoramento de baixo custo operacional, da calibração de nossos analisadores hematológicos, através de padrões primários e amostra controle^{13, 17}. Decidimos também, pela obtenção de valores-alvo, que serão usados no Controle de Qualidade de nossos equipamentos hematológicos.

Na tabela 1, observamos as médias aritméticas, as medianas e as modas das primeiras 1000 determinações do ano de 1988, utilizadas na avaliação das distribuições da população estudada. Não encontramos diferenças significativas entre esses três valores de tendência central, sugerindo assim serem gaussianas as distribuições dos valores obtidos nessa população.

TABELA 1

Estudo preliminar dos resultados obtidos com as 1000 primárias determinações das Hb (g/dL), Ht (%), Hem ($\times 10^6/\text{mm}^3$), VCM (μ^3), HCM (pg), CHCM (%) e Leuc ($\times 10^7/\text{mm}^3$), do ano de 1988.

	HB	Ht	Hem	VCM	HCM	CHCM	LEUC
Média	14,0	41,2	4,6	89,2	31,0	33,4	7,6
Mediana	13,8	41,0	4,4	89,0	30,7	35,0	8,1
Moda	14,2	40,0	4,4	91,0	30,8	34,0	7,7

Apresentamos na tabela 2 as médias aritméticas, os desvios padrão, os coeficientes de variação, as medianas, e as médias aritméticas máximas e mínimas das determinações de Hb, Ht, Hem, VCM, HCM, CHCM e Leuc, de cada ano estudado e dos três anos em conjunto.

As médias aritméticas das determinações 1988-1990 são nossos valores-alvo. Com exceção dos leucócitos, todos os coeficientes de variação obtidos através de estudo estatístico ficaram abaixo de 5%.

Os leucócitos apresentaram nos três anos estudados, coeficientes de variação de até 8,29%, mostrando haver uma maior dificuldade em se controlar esta determinação. Isto decorre do fato de que, na rotina diária, alguns exames apresentam leucocitose (processo inflamatórios, infecciosos, etc.) ou leucopenia (estados carenciais, uso de medicamentos, etc.), distanciando demasiadamente os valores dos leucócitos do intervalo de normalidade, acarretando médias mais variáveis, elevados desvios padrão e conseqüentemente altos coeficientes de variação.

Gilmer *et al*¹⁰ em seu trabalho, obtiveram coeficiente de variação de até 6% para os leucócitos.

Não encontramos diferenças significativas entre os valores das médias aritméticas e medianas para cada determinação, sugerindo assim, que as distribuições de todas as determinações estudadas seguiram curvas gaussianas, no decorrer dos três anos.

TABELA 2

Determinações anuais e do conjunto dos três anos, dos valores de Hb (g/dL), Ht (%), Hem ($\times 10^6/\text{mm}^3$), VCM (μ^3), HCM (pg), CHCM (%) e Leuc ($\times 10^7/\text{mm}^3$).

	Hb	Ht	Hem	VCM	HCM	CHCM	Leuc
1988							
\bar{x}	13,1	39,3	4,54	86,5	28,9	33,4	8,16
SD	0,44	0,89	0,08	1,39	0,78	0,67	0,60
CV (%)	3,3	2,2	1,8	1,6	2,6	2,0	7,44
Mediana	13,0	39,2	4,53	86,5	28,8	33,4	8,05
\bar{x} max	14,2	41,5	4,96	89,0	30,6	36,5	10,3
\bar{x} min	11,7	36,6	4,32	80,4	25,7	31,6	6,49
1989							
\bar{x}	13,5	40,5	4,64	87,3	29,2	33,5	7,65
SD	0,66	1,53	0,17	3,53	1,46	0,87	0,56
CV (%)	4,8	3,7	3,8	4,0	4,9	2,6	7,37
Mediana	13,5	40,5	4,63	87,4	29,3	33,5	7,65
\bar{x} max	15,3	46,0	5,31	96,0	33,0	36,3	9,17
\bar{x} min	11,4	36,0	4,00	81,8	24,0	29,4	6,18
1990							
\bar{x}	13,6	40,5	4,69	86,4	29,1	33,7	7,93
SD	0,48	1,23	0,15	2,59	0,94	0,64	0,65
CV (%)	3,5	3,0	3,3	3,0	3,2	1,8	8,29
Mediana	13,6	40,5	4,70	86,3	29,1	33,7	7,87
\bar{x} max	15,2	44,1	5,16	94,9	32,7	35,7	11,2
\bar{x} min	12,3	37,1	4,19	81,3	26,7	31,9	6,55
1988-1990							
\bar{x}	13,4	40,1	4,63	86,7	29,1	33,5	7,91
SD	0,58	1,3	0,15	2,6	1,1	0,7	0,64
CV (%)	4,3	3,4	3,4	3,1	3,8	2,2	8,1
Mediana	13,4	40,1	4,61	87,0	29,2	33,6	7,88
\bar{x} max	15,3	46,0	5,31	96,0	33,0	36,5	11,2
\bar{x} min	11,4	36,0	4,00	80,4	24,0	29,4	6,18

Dos índices hematimétricos estudados nesse período, o CHCM apresentou coeficientes de variação inferiores aos demais; o HCM, único índice proveniente de nossos analisadores hematológicos, apresentou coeficientes de variação superiores aos outros dois índices estudados.

As médias aritméticas diárias das determinações de Hb, Ht, Hem, VCM, HCM, CHCM e Leuc dos três anos estudados são apresentadas respectivamente nos gráficos de 1 a 7.

Nos gráficos observamos que a maioria das médias diárias de todas as determinações, situam-se dentro do intervalo de dois desvios padrão.

As médias aritméticas máximas e mínimas, que ficaram deslocadas dos intervalos de

referência ($\bar{x} \pm 1.SD$ e $2.SD$), foram observadas principalmente em dias com rotinas pequenas ($n < 30$ amostras).

São apresentados na tabela 3, os intervalos de referência (\bar{x} sinal de mais e menos $1.SD$ e $2.SD$) para cada valor-alvo.

TABELA 3

Intervalos de Referências obtidos para cada valor-alvo.

	$\bar{x} \pm 1.SD$	$\bar{x} \pm 2.SD$
Hb (g/dL)	13,4 \pm 0,58	13,4 \pm 1,16
Ht (%)	40,1 \pm 1,36	40,1 \pm 2,72
Hem ($\times 10^6/mm^3$)	4,63 \pm 0,15	4,63 \pm 0,30
VCM (μ^3)	86,7 \pm 2,69	86,7 \pm 5,38
HCM (pg)	29,1 \pm 1,11	29,1 \pm 2,22
CHCM (%)	33,5 \pm 0,74	33,5 \pm 1,48
Leuc ($\times 10^3/mm^3$)	7,91 \pm 0,64	7,91 \pm 1,28

England *et al.*⁹, demonstraram que no micro-hematócrito, cerca de 3% de plasma fica retido entre as hemácias.

Isso produz um falso aumento nos valores do hematócrito e do VCM, e uma falsa diminuição do CHCM. O valor do micro-hematócrito é cerca de 1,5% maior do que os valores dos hematócritos fornecidos por contadores automáticos de células, tipo Coulter S, que fornecem o valor do hematócrito, sem plasma retido. Bull & Hay⁶, na determinação de seus valores-alvo, usaram os valores dos micro-hematócritos sem a correção para o plasma retido, pois pretendiam uma padronização internacional do uso desses índices.

As médias aritméticas e os coeficientes de variação dos valores diários dos micro-hematócritos, não mostraram variações significativas no decorrer dos três anos estudados. Por esse motivo, usaremos o valor-alvo dos micro-hematócritos no monitoramento da exatidão de nossa microcentrifuga.

Na tabela 4, encontramos os valores-alvo dos micro-hematócritos corrigidos ($\times 0,97$) e não corrigidos; e dos índices hematimétricos VCM e CHCM resultantes dessa correção.

TABELA 4

Valores-alvo dos micro-hematócritos (%), VCM (μ^3), e CHCM (%), sem e com correção ($\times 0,97$) para o plasma retido entre as hemácias.

	Não corrigido	Corrigido
Micro-hematócrito (%)	40,1	38,9
Volume corp. médio (μ^3)	86,7	84,0
Conc. hemogl. corp. média (%)	33,5	32,5

Apesar de o VCM e CHCM serem resultantes de valores de aparelhos distintos (analisadores hematológicos e microcentrifuga), esses índices hematimétricos se situaram muito próximos aos valores encontrados por autores nacionais e internacionais que trabalharam com equipamentos hematológicos de múltiplos canais.

Na Tabela 5, apresentamos nossos valores-alvo de índices hematimétricos correlacionando-os com os valores de outros autores.

TABELA 5

Valores-alvo de índices hematimétricos obtidos por diversos autores.

	VCM (μ^3)	HCM (pg)	CHCM (%)
Bull & Hay	89,5	30,5	33,8
Rosenfeld <i>et al.</i>	83,8	ND	33,9
Levy <i>et al.</i>	89,5	30,0	33,5
Borges	84,5	28,0	33,5
Simmons & Chin	88,0	29,3	33,1
Munhoz <i>et al.</i>	86,7	29,1	33,5

ND: Não determinado

Os valores das Hemoglobinas, Hematócritos e Hemácias do intervalo de tempo estudado, relacionados entre si, proporcionaram fórmulas empíricas (tabela 6) muito próximas às fórmulas rotineiramente utilizadas no Controle de Qualidade de analisadores hematológicos¹².

Estas fórmulas serão aplicadas quando usarmos padrões com valores dentro da faixa da normalidade, ou com amostra controle, para monitoramento dos resultados.

TABELA 6

Fórmulas empíricas resultantes, no intervalo de três anos, das relações entre os valores das Hemoglobinas (g/dL), Hematócritos (%) e Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$).

FÓRMULAS EMPÍRICAS ENCONTRADAS	FÓRMULAS DE USO CORRENTE
Hb x 2,98 = Ht	Hb x 3 = Ht
Ht x 11,54 = Hem	Ht x 11 = Hem
Hem x 2,91 = Hb	Hem x 3 = Hb
Hem x 8,67 = Ht	Hem x 9 = Ht

Allison¹, em sua revisão histórica sobre Controle de Qualidade em hematologia, mostra através do tempo a evolução das diversas técnicas e métodos, na tentativa de diminuir ou eliminar erros laboratoriais. Bauer², relata que o uso de médias aritméticas diárias dos valores da Hb, Hem e Ht no Controle de Qualidade, apresenta grandes variações, sendo mais indicado o uso de médias diárias de índices hematimétricos. Em nosso estudo de valores-alvo (tabela 2), não observamos variações significativas entre os coeficientes de variação dos valores e índices hematimétricos diários e anuais.

Em nosso Controle de Qualidade interno utilizamos padrões primários e amostra controle, para calibração e avaliação da reprodutibilidade dos

analisadores hematológicos. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, acrescentaremos a nossa rotina os valores-alvo de índices hematimétricos, de valores hematimétricos e de leucócitos, para aprimoramento do controle de nossos aparelhos.

CONCLUSÃO

A inclusão de valores-alvo no monitoramento da exatidão de analisadores hematológicos, praticamente não acarreta nenhum custo adicional ao Programa de Controle de Qualidade.

É fundamental para a obtenção desses valores que haja uma busca constante da exatidão, com padronização prévia da coleta do material, da metodologia de calibração diária dos analisadores hematológicos, das soluções diluidora e hemolisante e das contagens e dosagens hematimétricas.

Esta metodologia de Controle de Qualidade apresenta melhores resultados com rotinas nas quais o número de amostras é numeroso, preferencialmente acima de 30.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos funcionários da Seção de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central, pela colaboração prestada na realização deste trabalho.

RIALA6/745

MUNHOZ, M.A.G.; YOKOMIZO, R.M.; GUSHIKEN, E.Y.; ZAMFIROV, V.M.C.; ARRUDA, I.C.; CANGERANA, F.A.; NIERO, L.I. & AZEVEDO NETO, R.S. - Determination of target values for use in Quality Control of hematology analysers. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):41-47, 1993.

ABSTRACT: The authors report a retrospective study realized with hematimetrics values (hemoglobin, hematocrit and erythrocyte), Red blood cell indexes (mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration) and leukocyte, obtained from 3 years (1988-1990), presented by 2 semi-automatic hematology analyzers, priorly calibrated with primary standards and control sample, in order to obtain target values (average on the daily means), that will be used in monitoring the accuracy of these equipments.

Firstly the means, the medians, the modes and the frequencies from first 1000 determinations of 1988, were calculated, in order to assess the distributions of the studied population.

Secondly, a retrospective statistical study made by a microcomputer, was performed, to analyse 613 routines with 392,000 determinations from 56,000 patients registered at the Health Centers of the ERSA 2, São Paulo City; the arithmetical means, the standard deviations, and the variation coefficients were calculated, and the medians and the maximum and minimum arithmetical means of each year and of the 3 years in question were determined.

From the relationship among the hematimetric values, empirical formulas were obtained, to be used in the control of the hematological analyzers.

The obtained target values were: Hemoglobin 13.4 g/dL, Hematocrit 40.1%, Erythrocyte $4.63 \times 10^6/\text{mm}^3$, mean corpuscular volume 86,7 μ^3 , mean corpuscular hemoglobin 29.1 pg, mean mean corpuscular hemoglobin concentration 33,5% and Leukocyte $7.91 \times 10^3/\text{mm}^3$.

The reference intervals of the target values are presented with 1 and 2 Standard deviations.

DESCRIPTORS: Quality control, Hematology, Target values hematology analyzers, Hematimetrics values, Red blood cell indexes, Leukocytes.

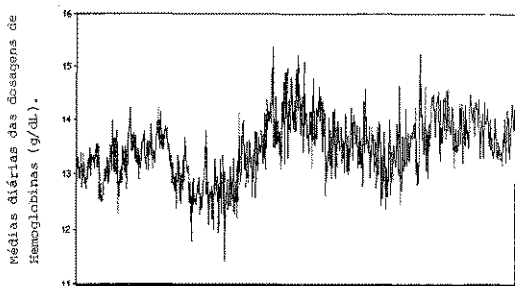


FIGURA 1

Representação gráfica das médias aritméticas diárias das dosagens de Hemoglobinas, de 613 rotinas, do período de 1988 a 1990.

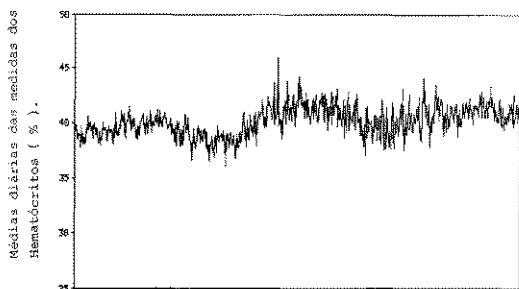


FIGURA 2

Representação gráfica das médias aritméticas diárias das medidas dos Hematócritos, de 613 rotinas, do período de 1988 a 1990.

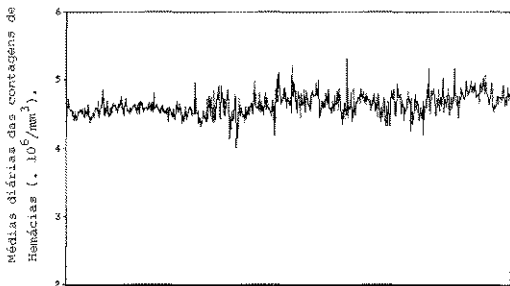


FIGURA 3

Representação gráfica das médias aritméticas diárias das contagens de Hemácias, de 613 rotinas, do período de 1988 a 1990.

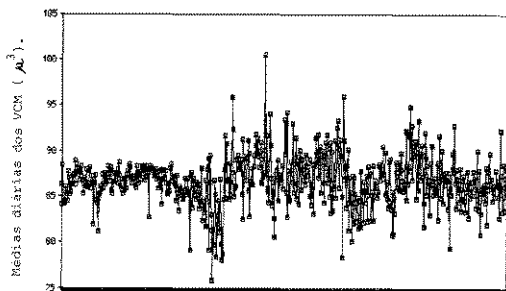


FIGURA 4

Representação gráfica das médias aritméticas diárias dos VCM, de 613 rotinas, do período de 1988 a 1990.

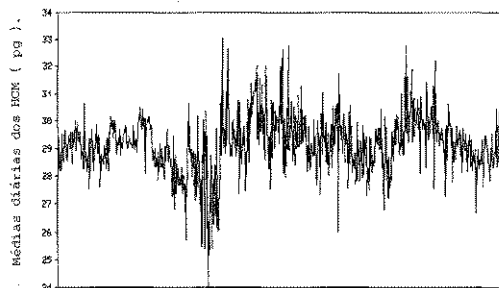


FIGURA 5

Representação gráfica das médias aritméticas diárias dos HCM, de 613 rotinas, do período de 1988 a 1990.

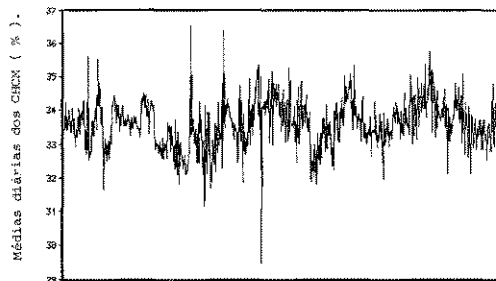


FIGURA 6

Representação gráfica das médias aritméticas diárias dos CHCM, de 613 rotinas, do período de 1988 a 1990.

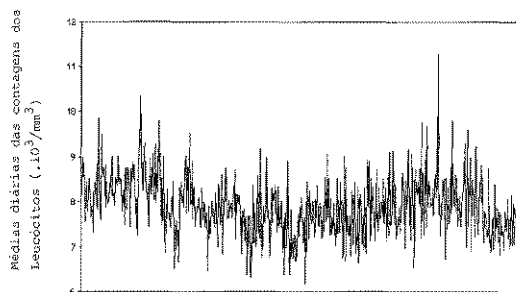


FIGURA 7

Representação gráfica das médias aritméticas diárias das contagens de Leucócitos, de 613 rotinas, do período de 1988 a 1990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLISON, F.S. - An historical review of quality control in hematology. *Am. J. Med. Technol.* 49(9):625-32, 1983.
2. BAUER, J.D. - *Clinical laboratory methods*. 9th. ed. St. Louis, C.V. Mosby, 1982. p. 14.
3. BORGES, D.R.; FILGUEIRAS, T.E.; BERLINGERI, J.C.; BORGES, D.S.R. - Avaliação, após 5 anos de uso, de programa de controle de qualidade de contadores hematológicos de múltiplos canais. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 17(4):143-46, 1981.
4. BORGES, D.R. - "Valores-alvo" de índices eritrocitários no controle de qualidade em hematimetria. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 23(5):135-37, 1987.
5. BULL, B.S.; ELASHOFF, R.M.; HEILBRON, D.C.; COUPERUS, J. - A study of various estimators for the derivation of quality control procedures from patient erythrocyte indices. *Am. J. Clin. Pathol.* 61:473-481, 1974.
6. BULL, B.S. & HAY, M.S. - Are red blood cell indexes international? *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109:604-06, 1985.
7. CEMBROWSKI, G.S.; WESTGARD, J.O. - Quality control of multichannel hematology analyzers: evaluation of Bull's Algorithm. *Am. J. Clin. Pathol.* 83(3):337-45, 1985.
8. DORSEY, D.B. - Quality control in hematology. *Am. J. Clin. Pathol.* 40:457-64, 1963.
9. ENGLAND, J.M.; WALFORD, D.M.; WATERS, D.A.W. - Re-assessment of the reliability of the haematocrit. *Brit. J. Haematol.* 23:247-56, 1972.
10. GILMER Jr, P.R.; WILLIAMS, L.J.; KOEPKE, J.A.; BULL, B.S. - Calibration methods for automated hematology instruments. *Am. J. Clin. Pathol.* 68:185-190, 1977.
11. GILMER Jr, P.R. & WILLIAMS, L.J. - The status of methods of calibration in hematology. *Am. J. Clin. Pathol.* 74(4):600-05, 1980.
12. GULATI, G. & HYUN, B.H. - Quality control in hematology. *Clin. Lab. Med.* 6(4):675-88, 1986.
13. GUSHIKEN, E.Y.; MUNHOZ, M.A.G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V.M.C.; NIERO, L.I. - Padronização do preparo de lisados hemoglobínicos estáveis para uso em laboratório de saúde pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 51(1/2):83-86, 1991.
14. KOEPKE, J.A. & PROTEXTOR, T.J. - Quality assurance for multichannel hematology instruments. Four years experience with patient mean erythrocyte indices. *Am. J. Clin. Pathol.* 75:28-33, 1981.
15. LEVY, W.C.; BULL, B.S.; KOEPKE, J.A. - The incorporation of red blood cell index mean data into quality control programs. *Am. J. Clin. Pathol.* 86:193-99, 1986.
16. LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; STIENE-MARTIN, E.A.; KOPKE, J.A. - *Clinical hematology: principles, procedures, correlations*. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1992, p. 552-3.
17. MUNHOZ, M.A.G.; GUSHIKEN, E.Y.; PACHECO, N.R.; CAMPA, S. B.; KITAMURA, C.; AZEVEDO NETO, R.S. - Uso de amostra controle na avaliação da reprodutibilidade de equipamentos semi-automatizados em hematologia laboratorial: uma proposta de controle de qualidade para laboratórios de saúde pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2):41-45, 1991.
18. ROSENFELD, L.G.M.; ANDRADE, M.; BORGES, D.R. Controle de qualidade em exames hematológicos. *An. Paul. Med. Cir.* 104:92-6, 1977.
19. SIMMONS, A. - *Hematology: a combined theoretical & technical approach*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1989, p. 190-1.

Recebido para publicação em 04 de dezembro de 1992.

RESÍDUOS DE ENDOSULFAN EM TUBÉRCULOS E FRUTOS*

Vera R.R. LEMES**
Odete N.K. INOMATA**
Heloísa H.C. BARRETTO**

RIALA6/746

LEMES, V.R.R.; INOMATA, O.N.K.; BARRETTO, H.H.C. - Resíduos de Endosulfan em tubérculos e frutos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):49-54, 1993.

RESUMO: Endosulfan é um inseticida do grupo éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado. Com a finalidade de registro no Brasil para extensão de uso foi realizado um estudo de seus isômeros Endosulfan I (alfa), Endosulfan II (beta) e metabolito sulfato de Endosulfan, remanescentes das culturas de batata, tomate, laranja, mamão, maçã, maracujá, morango, tratadas com o produto formulado Thiodan, concentrado emulsionável com teor de 350g/l do ingrediente ativo, seguindo-se as boas práticas agrícolas. O método utilizado foi o descrito por Mitchell, com modificações que permitiram obter melhores recuperações (82,1% de Endosulfan I, 84,4% de Endosulfan II e 91,0% de sulfato de Endosulfan, média obtida nas amostras testemunhas fortificadas). O limite de quantificação pela técnica de cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons foi de 0,01 mg/kg (ppm). Das 60 amostras analisadas, 20 testemunhas e 40 provenientes de culturas tratadas, foram encontrados Endosulfan I em 19 (47,5%), Endosulfan II em 21 (52,5%) e sulfato de Endosulfan em 17 (42,5%). Nas amostras de polpa de laranja e maracujá e na batata não foram encontrados resíduos, enquanto que na polpa de mamão foi detectado apenas o metabolito sulfato de Endosulfan. Resíduos de Endosulfan I, Endosulfan II e sulfato de Endosulfan foram os mais elevados na casca da laranja, apresentando níveis de 0,48 e 0,69 mg/kg de Endosulfan total. As amostras de maçã, tomate e morango apresentaram valores dentro dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelo Codex Alimentarius.

DESCRITORES: alimentos, resíduos de Endosulfan, pesticidas organoclorados, detecção por cromatografia a gás; resíduos de pesticidas, determinação.

INTRODUÇÃO

Uma formulação de pesticida somente poderá ser comercializada no Brasil após ter sido previamente registrada nos órgãos competentes. Para isso deverá atender às exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da agricultura, saúde e meio ambiente.²

Na obtenção do registro, os requerentes terão de fornecer dados e documentos sendo um deles dirigido ao Ministério da Saúde que depois, juntamente com o Ministério da Agricultura, estabelecerá os intervalos

de segurança, tendo em vista os limites máximos residuais apresentados nos diferentes tipos de cultura.

Como se sabe, os resíduos que permanecem nas culturas dependem de muitos fatores de variada importância, tais como grau de adsorção nas camadas superficiais, degradação química ou metabolismo, desaparecimento aparente devido a diluição pelo crescimento da planta e volatilidade do depósito. Para se obter subsídios para estimar um limite máximo de resíduos, produtos que receberam tratamentos conhecidos de pesticidas, realizados sob condições agrícolas e climáticas representativas, seguindo uma boa prática agrícola, devem ser analisados.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Com esta finalidade e para conhecer os níveis de resíduos remanescentes, diversas culturas tratadas com o produto técnico Thiodan, nas dosagens de 2 e 4 l/ha nas culturas de batata, laranja, mamão, maçã, tomate e 1,5 e 3,0 l/ha em morango, foram analisadas em diferentes tempos de carência.

Endosulfan, princípio ativo da formulação, é um inseticida do grupo éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado. O nome químico segundo IUPAC é C,C'- (1, 4, 5, 6, 7, 7-hexachoro-8, 9, 10-trinorbon-5-en-2, 3, -ylene) (dimethylsulphite) 6, 7, 8, 9, 10, 10-hexacloro- 1, 5, 5a, 6, 9,9a- hexahydro-6, 9-metano-2, 4, 3-benzodioxathiepin 3-oxide. É constituído por estes dois estereoisômeros alfa (I) e beta (II).¹⁰

O fato de o Endosulfan ser um éster, favorece a hidrólise do composto, transformando seus isômeros nos dióis e sulfatos correspondentes.

Os principais produtos de biotransformação do Endosulfan são o Endosulfan diol e o sulfato de Endosulfan, sendo que o primeiro não é tóxico enquanto que o segundo apresenta uma toxicidade similar ao composto precursor e por isso considera-se resíduo de Endosulfan a soma dos níveis encontrados dos isômeros I e II mais sulfato de Endosulfan.⁹

O problema ambiental dos pesticidas organoclorados não se restringe a compostos orgânicos com cloro na molécula, mas àqueles que apresentem cadeia cíclica de carbonos (inclusive cadeias aromáticas), compostos apolares e lipofílicos, pouco reativos quimicamente e conseqüentemente muito estáveis no meio ambiente.

Com uma meia vida de aproximadamente seis meses no solo e a possibilidade de hidrólise na água, Endosulfan não é persistente e acumulativo como outros compostos organoclorados do grupo dos ciclodienos.

O Endosulfan pode ser absorvido através do trato gastrointestinal, inalação ou contato com a pele. A DL50 oral e dérmica para ratos é 18 e 74 mg/kg, respectivamente, e a LC 50 via pulmonar é 80 mg/kg/4h.⁷ Em caso de intoxicação aguda no homem, podem ocorrer manifestações neurológicas, como irritabilidade e convulsões.⁹

Deve-se tomar cuidados especiais com o seu uso em locais muito próximos a mananciais, rios ou lagos ou com declives que facilitem o seu arraste. Isto se deve ao fato de o Endosulfan ser altamente tóxico para algumas espécies aquáticas, particularmente peixes.⁹ Pesquisas realizadas em amostras de água e sedimento no sul da Austrália detectaram a presença de Endosulfan em concentração suficiente para causar efeitos adversos no ambiente aquático.⁸

No Brasil é autorizado o uso em partes aéreas de diversas culturas. O produto, formulado como concentrado emulsionável (CE), tem classificação toxicológica I até 360 g/l.¹

O maior risco para o homem associado ao Endosulfan é a intoxicação aguda através de exposição acidental ou ocupacional, devendo-se

seguir as normas de segurança para manipulação e aplicação do produto.

A principal fonte de exposição da população em geral é o alimento, sendo importante o controle dos resíduos remanescentes nas culturas tratadas para se estabelecer o limite máximo permitido, o tempo de carência necessário e correlacioná-los com as normas do país ou do Codex Alimentarius. Segundo dados WHO⁹ têm sido encontrado resíduos de Endosulfan bem abaixo do limite máximo permitido⁹.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

Foram analisadas 60 amostras, assim distribuídas: batata(15), laranja casca(6), laranja polpa(6), maçã(3), mamão(3), maracujá(3), morango(12) e tomate(12), sendo que 40 amostras foram provenientes de culturas tratadas com o produto Thiodan, concentrado emulsionável com 350 g/l de Endosulfan, nas seguintes dosagens: 2 e 4 l/ha nas culturas de batata, laranja, mamão, maçã, tomate; 1,5 e 3 l/ha em morango, designadas como tratamento 1 e 2, respectivamente, e 20 amostras testemunhas para controle, plantadas nas mesmas condições das demais, porém sem aplicação do inseticida.

As amostras foram coletadas de acordo com as seguintes carências: batata com 1, 3, 7, tomate com 1, 3, laranja, maçã com 21, mamão com 22, morango com 6, 7, 14, 15 dias. Foram acondicionadas em papel laminado, devidamente identificadas, armazenadas e enviadas ao laboratório congeladas.

Reagentes

Florisil ativado a 135°C durante uma noite armazenado em dessecador por dois dias. Pesar 20 g em erlenmeyer com tampa, adicionar 1 ml de água desmineralizada e agitar até completa homogeneização.

Sulfato de sódio anidro granulado.

Acetonitrila, hexano, diclorometano grau resíduo.

Eluente: Em balão volumétrico de 1000 ml adicionar 3,5 ml de acetonitrila, 496,5 ml de diclorometano; completar o volume com hexano.

Método

O método utilizado foi o descrito por Mitchell, 1976⁶ com modificação na extração para uma mistura de diclorometano: hexano na proporção de 1:4 em volume e na purificação com florisil desativada a 5%, onde foi realizado um estudo comparativo de recuperação do método nas etapas testadas.

Os estudos de recuperações foram feitos nos diferentes tipos de amostras testemunhas fortificadas com 5 ml de uma mistura de padrões nas seguintes concentrações: 100 ng/ml de Endosulfan I e II e 200 ng/ml de sulfato de Endosulfan.

Procedimento

Pesar 25 g da amostra em erlenmeyer com tampa e adicionar 100 ml de acetonitrila deixando em contato por 60 minutos. Em seguida agitar por 30 minutos e filtrar em Buchner. Transferir o filtrado para funil de separação e adicionar 500 ml de água desmineralizada e 10 ml de solução saturada de cloreto de sódio. Agitar e adicionar 100 ml de uma mistura de diclorometano:hexano (1:4). Passar a camada superior através de um funil contendo sulfato de sódio anidro, para balão de 300 ml. Lavar o funil com 30 ml da mistura diclorometano: hexano (1:4) recebendo no balão. Concentrar em rotavapor a aproximadamente 5 ml. Transferir o concentrado para o topo de uma coluna cromatográfica contendo 20 g de florisil desativado com 1 ml de água tendo na parte superior 1 g de sulfato de sódio anidro. Eluir os pesticidas com 200 ml do eluente.

Receber em balão de 300 ml e concentrar em rotavapor a cerca de 3 ml. Adicionar 5 ml de hexano e concentrar novamente. Transferir o concentrado para tubo graduado de 5 ml, completar o volume com hexano e injetar no cromatógrafo.

Fazer a identificação e quantificação por cromatografia gasosa nas seguintes condições: cromatógrafo CG 90 com detector de captura de elétrons, fonte de níquel, equipado com coluna espiralada de vidro de 6 pés de comprimento por 1/8 de polegada de diâmetro interno, com fase estacionária, 1,5% OV17 + 1,95% OV210 em Chromosorb Q II 100/120 mesh, nas seguintes condições: temperatura da coluna, 208°C temperatura de injetor, 220°C, temperatura do detector, 260°C, fluxo de nitrogênio, 40 ml/min. A sensibilidade do aparelho foi ajustada de forma a conseguir uma deflexão de aproximadamente 60% da escala do papel do registrador com 200 pg de Endosulfan I.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As porcentagens das recuperações dos diferentes tipos de amostras estudadas encontram-se na tabela 1. Todas as recuperações foram feitas pelo método descrito por Mitchell modificado que apresentou um melhor resultado. O estudo da etapa de extração do método modificado demonstrou um acréscimo da ordem de 5-10% para Endosulfan I e II e de 2-5% para sulfato de Endosulfan. Florisil desativada a 5% foi a que apresentou melhor resultado (87,6% para Endosulfan I, 102,1% para Endosulfan II e 100,0% para sulfato de Endosulfan) contra (73,8%, 95,6%, 95,6%, respectivamente sem desativação e 69,2%, 89,1%, 86,9%, respectivamente desativada com 2% de água.

A média de porcentagem de recuperação para os diferentes tipos de amostras fortificadas com Endosulfan foi de 82,1% para Endosulfan I, 84,4% para Endosulfan II e 91,0% para sulfato de

Endosulfan e os valores individuais encontram-se na tabela 1.

TABELA 1

Porcentagens das recuperações segundo método de Mitchell, 1976, modificado.

Amostra	Endosulfan I (%)	Endosulfan II (%)	Sulfato de Endosulfan (%)
Batata	80	87	91
Laranja (casca)	71	62	97
Laranja (polpa)	71	83	91
Maçã	91	91	93
Mamão	79	83	92
Maracujá	86	82	79
Morango	75	83	92
Tomate	104	104	93

As amostras testemunhas não apresentaram resíduos de Endosulfan I, Endosulfan II ou sulfato de Endosulfan no limite de quantificação do método que é de 0,01 mg/kg/(ppm). Uma amostra testemunha de morango que apresentou 0,01mg/kg de sulfato de Endosulfan indica problemas na aplicação (Tabela 2).

Das 40 amostras de culturas tratadas, foram detectados Endosulfan I em 19 (47,5%), Endosulfan II em 21 (52,5%) e sulfato de Endosulfan em 17 (42,5%), conforme Tabela 2.

Como era de se esperar, as amostras de batata (aplicação por pulverização nas ramagens), polpa de laranja e de maracujá (aplicação nas laranjeiras e maracujazeiros), não apresentaram resíduos detectáveis. Na batata, um dos fatores prováveis é o de se encontrar embaixo da terra e nas polpas de laranja e de maracujá pelo fato de a casca ser muito espessa e de difícil penetração.

As análises das cascas de laranja mostraram que os resíduos foram detectados em todas as amostras dos tratamentos 1 e 2 com valores médios de 0,48 mg/kg e de 0,69 mg/kg de Endosulfan total, respectivamente. Valores sempre mais altos na casca do que na polpa são relatados por alguns autores⁵ sendo esta distribuição bastante conhecida em frutas cítricas.

Já na amostra de mamão, tanto no tratamento 1 (21/ha) como no tratamento 2 (41/ha) foi encontrado sulfato de Endosulfan apesar de ter sido retirada a casca antes do início da análise. Isto indica que a casca é permeável ao princípio ativo e que na carência estabelecida de 22 dias ele já foi metabolizado.

TABELA 2

Concentração média de resíduos de Endossulfan I e II e sulfato de Endossulfan em mg/kg (ppm)

AMOSTRA	n° total amostras	CARÊNCIA dias	NÃO TRATADA			TRATAMENTO 1 (2 l/ha):			TRATAMENTO 2 (4 l/ha)					
			N° END.I	END.II	S. END.	N° END.I	END.II	S. END.	N° END.I	END.II	S. END.			
Batata	6	1	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	<0.01	<0.01	<0.01
	3	3	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	<0.01	<0.01	<0.01
	6	7	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	<0.01	<0.01	<0.01
Tomate	6	1	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	0.05	0.07	<0.01	2	0.24	0.25	<0.01
	6	3	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	0.04	0.04	<0.01	2	0.26	0.24	<0.01
Laranja (casca)	6	21	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	0.06	0.19	0.23	2	0.12	0.33	0.24
Laranja (polpa)	6	21	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	<0.01	<0.01	<0.01	2	<0.01	<0.01	<0.01
Mamão	3	22	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	<0.01	<0.01	0.02	1	<0.01	<0.01	0.02
Maçã	3	21	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	0.01	0.01	0.02	1	0.02	0.03	0.01
Maracujá	3	21	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	<0.01	<0.01	<0.01
								TRAT. 1 (1,5 l/ha)			TRAT. 2 (3 l/ha)			
Morango	3	6	1	<0.01	<0.01	0.01	1	0.03	0.06	0.03	1	0.12	0.21	0.06
	3	7	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	0.01	0.07	0.04	1	0.07	0.17	0.03
	3	14	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	0.01	0.01	0.01	1	0.01	0.01	0.01
	3	15	1	<0.01	<0.01	<0.01	1	0.02	0.04	0.02	1	0.03	0.05	0.03

CONCLUSÃO

Analisando os valores obtidos e as diferenças encontradas nas amostras de tomate e morango se observa que houve um decréscimo significativo durante o período de carência, indicando uma decomposição do pesticida. (Fig. 1).

Nas amostras de maçãs provenientes das plantas que receberam os tratamentos 1 e 2 os valores médios foram de 0,04 mg/kg e 0,06 mg/kg para Endossulfan total após 21 dias da aplicação. Estes valores encontram-se abaixo dos níveis de tolerância de resíduos de Endossulfan estabelecidos para frutas em geral que é de 2 mg/kg(ppm)³. No Canadá, um monitoramento de Endossulfan realizado no período de 1978 a 1986 com 305 amostras de maçãs⁴ apresentou resíduos sempre abaixo dos limites máximos estabelecidos.

Pelos resultados encontrados foi observado que os níveis de resíduos apresentam valores considerados baixos frente àqueles estabelecidos para outras culturas. Isto se deve provavelmente ao rápido metabolismo ou decomposição do Endossulfan no período de carência estudado. Também é uma indicação de que as boas práticas agrícolas devem ser sempre seguidas para que cada vez mais os resíduos de pesticidas em alimentos se situem dentro dos parâmetros que não causem problema de saúde ao consumidor. O estudo propiciou também a implantação do método modificado para as diversas matrizes estudadas.

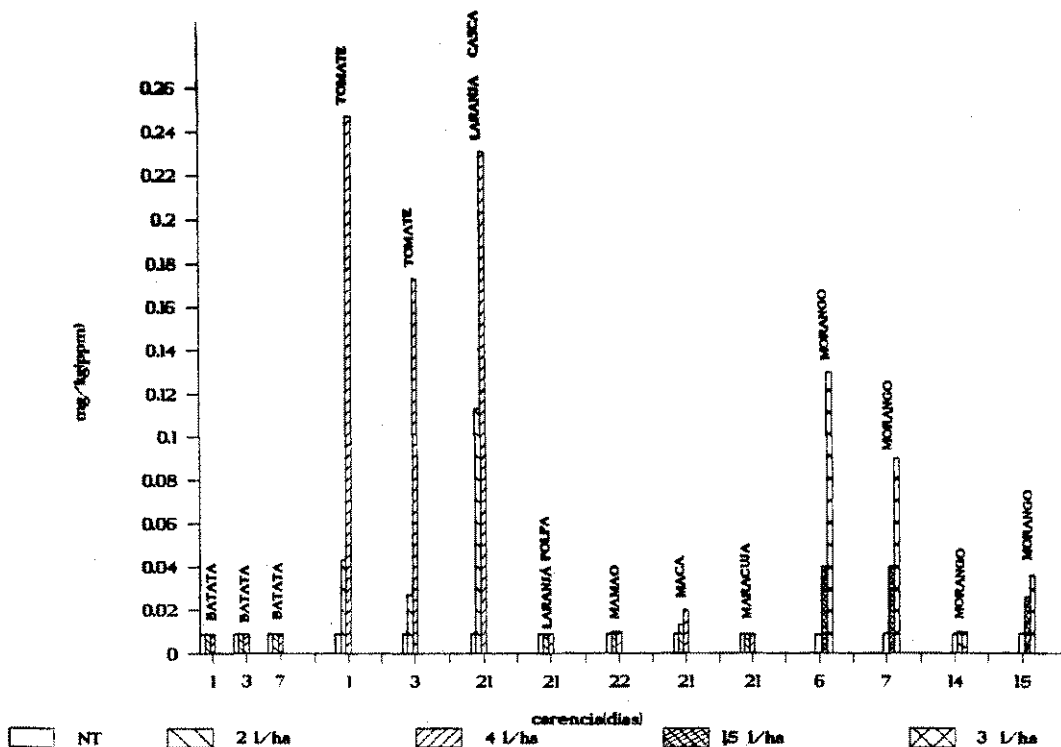


FIGURA 1

Níveis de Endosulfan total em mg/kg(ppm) em amostras de batata, tomate, laranja, mamão, maçã, maracujá, morango, não tratadas (NT) e tratadas com Thiodan, de acordo com as respectivas dosagens em (l/ha) e carências em (dias).

RIALA6/746

LEMES, V.R.R.; INOMATA, O.N.K.; BARRETTO, H.H.C. – Residues from Endosulfan on fruit and tubers. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):49-54, 1993.

ABSTRACT: Endosulfan is a pesticide by ester group with sulphurous acid of the chlorinated cyclic dial. For registering purposes with the aim of extending its range of uses for other applications in Brazil, a study of its residues, as well as of its metabolite, endosulfan sulfate, was performed on potato, tomato, orange, papaya, apple, maracuja and strawberry crops, on which it was applied according to good agricultural practices. The methodology employed was the described for Mitchell with modification. It was satisfactory recovery (82,1% to Endosulfan I, 84,4% to Endosulfan II and 91,0% to Endosulfan sulfate, medians of the fortified samples). The lower quantification threshold 0,01 mg/kg(ppm) by gas chromatography with electron capture detector. Among the 60 samples analysed, 20 untreated samples (control) and 40 samples for crops treated with Thiodan, emulsionable concentrate with 350 g/l of active ingredient, Endosulfan I was detected in 19 samples (47,5%), Endosulfan II in 21 (52,5%), and Endosulfan sulfate in 17 (42,5%). No residues were detected in the samples of orange and maracujá pulp, as well as in those of potato, whereas in the papaya pulp samples only the metabolite, endosulfan sulfate, was detected. The highest levels of Endosulfan I, Endosulfan II and Endosulfan sulfate were those detected in orange peel samples, with a total amount reaching the 0.48 and 0.69 mg/kg levels. In the apple, tomato and strawberry samples, the detected values were comparatively low, all of them remaining inside the range for maximum residue limits (MRL) according to Codex Alimentarius.

DESCRIPTORS: food, Endosulfan residues, organochlorine pesticide, gas chromatography detection, pesticide residues, determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. – Portaria SNVS nº 10 de 08/03/85, Ministério da Saúde. Diário Oficial, Brasília, 14 mar. 1985.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 98.816, de 11/01/90. Diário Oficial, Brasília, 12 jan. 1990. Seção I, p. 876-888.
3. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, Codex maximum limits for pesticide residues. 2nd ed. Rome, FAO/WHO, 1986, vol. 13 (FAO/WHO Food Standards Programme).
4. FRANK R.; BRAUN, H. E. & RIPLEY B. D. – Monitoring Ontario-grown apples for pest control chemicals used in their production, 1978-86. *Food Additives and Contaminants*, 6(2): 227-234, 1989.
5. IWATA, Y.; WESTLAKE, W.E; BARKLEY, J.H.; CARMAN, G.E. & GUNTHER, F.A. – Aldicarb residues in oranges, citrus by products, orange leaves, and soil after an aldicarb soil-application in orange grove. *J. Agric. Food Chem.*, 25(4): 933-936, 1977.
6. MITCHELL, L.R. – Collaborative study of the determination of endosulfan, endosulfan sulfate, tetrasul and tetradifon residues in fresh fruits and vegetables, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 59(1):209-212, 1976.
7. SAX, N.L. – Dangerous properties of industrial materials. Van Nostrand Reinhold – ed. New York, 2:384-385, 1988.
8. THOMA K. & NICHOLSON B.C. – Pesticide losses in runoff from a horticultural catchment in South Australia and their relevance to stream and reservoir water quality. *Environ. Technol. Lett.*, 10(1):117-129, 1989.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 1984. Endosulfan. Geneva, WHO, 1984. 62p. (Environmental Health Criteria 40).
10. WORTHING, C.R. – *The Pesticide Manual*. The British Crop Protection Council – 7 ed. Croydon, 1983.

Recbido para publicação em 04 de dezembro de 1992.

AÇÃO "IN VITRO" DE DIFERENTES DROGAS, SOBRE O *MYCOBACTERIUM KANSASII**

Daisy Nakamura SATO**
Eny Aparecida Matheus da SILVA**
Lucilaine FERRAZOLI**
Moisés PALACI**

RIALA6/747

SATO, D.N.; SILVA, E.A.M. da; FERRAZOLI, L.; PALACI, M. – Ação "in vitro" de diferentes drogas, sobre o *Mycobacterium kansasii*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):55-58, 1993.

RESUMO: A infecção causada pelo *M. kansasii* pode ser tão facilmente tratada como a tuberculose. Desde que a rifampicina foi introduzida nos esquemas terapêuticos a conversão do escarro verifica-se em 100% dos casos. O objetivo deste estudo foi contribuir no tratamento da micobacteriose causada pelo *M. kansasii*. Através da determinação da CIM, CBM e testes de sensibilidade pelo método das proporções, os autores comparam os resultados obtidos com os relatos da literatura internacional. Foram estudadas 30 cepas de *M. kansasii* isoladas de pacientes com problemas pulmonares. Um perfil de sensibilidade das cepas frente à isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol, etionamida, kanamicina e ciprofloxacina foi realizado. A metodologia foi utilizada de acordo com as normas preconizadas para a bacteriologia das micobactérias. Os resultados obtidos mostraram sensibilidade do *M. kansasii* à rifampicina, etionamida, kanamicina e ciprofloxacina, enquanto que para as demais drogas houve algumas variações. Nossos dados mostram a importância da rifampicina nos esquemas terapêuticos, no tratamento inicial, e a utilidade dos testes de sensibilidade no retratamento.

DESCRITORES: *Mycobacterium kansasii*; testes de sensibilidade às drogas; resistência às drogas.

INTRODUÇÃO

As micobactérias estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas no solo e na água, fazendo parte da flora normal humana. Porém, sob certas condições, algumas espécies micobacterianas podem se tornar patogênicas causando processos infecciosos ao homem^{4, 14, 15}.

Algumas espécies, tais como o *M. kansasii*, têm sido freqüentemente documentadas como sendo o agente etiológico de doenças, e o seu isolamento a partir de amostras de origem pulmonar tem aumentado em nosso meio^{18, 19}.

Pacientes com infecções pulmonares causadas pelo *M. kansasii* em geral respondem bem às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, embora

existam casos de falência de tratamento, associados à resistência à rifampicina³.

Com o objetivo de conhecer as drogas antituberculosas os autores determinaram a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima de cada droga para cepas de pacientes com comprometimento pulmonar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 30 cepas de *M. kansasii* isoladas de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar, com bacteriologia positiva para *M. kansasii*, provenientes de diversas unidades de saúde do Estado de São Paulo.

* Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz – Laboratório de Sorocaba e Laboratório Central.

** Pesquisadores Científicos dos Instituto Adolfo Lutz.

As cepas de *M. kansasii* foram isoladas a partir de amostras de escarro, descontaminadas pelo método de Petroff, semeadas em meio de Lowenstein-Jensen, incubadas a 37°C por 28 dias e identificadas segundo suas propriedades culturais e bioquímicas^{8,13}.

O padrão de susceptibilidade das cepas à isoniazida (INH), rifampicina (RFP), estreptomina (SM), etambutol (EMB), etionamida (ETH) e kanamicina (KN) foi determinado através do método das proporções⁵. No caso da ciprofloxacina (CPF), apesar da ausência de padronização da concentração para este método, incorporou-se ao meio de cultura a quantidade de 0,2 µg/ml, previamente determinada em estudos anteriores, para o *M. tuberculosis*¹⁶.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)^{11,20}: As cepas de *M. kansasii* foram semeadas em meio de Middlebrook 7H9 e mantidas em estufa a 37°C por 10 dias ou até obter uma turvação correspondente ao tubo número 1 da escala de McFarland. Para a determinação da CIM através do método de diluição em meio líquido, foram semeados 0,1 ml de cada inóculo no meio de Middlebrook 7H9 contendo as seguintes concentrações da droga:

INH e RFP (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/ml)

SM, ETH, KN e CPF (2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 µg/ml)

EMB (1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 µg/ml)

Os tubos foram mantidos a 37°C e a leitura da CIM realizada após 10 dias de incubação. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir macroscopicamente o crescimento das micobactérias. A CBM foi determinada pelo subcultivo dos tubos que não apresentaram crescimento visível, semeando-se a 0,1 ml em meio de Lowenstein-Jensen. Após a incubação a 37°C por 28 dias, foi realizada a leitura. A CBM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir mais do que 99,9% da população bacteriana no meio de cultura.

RESULTADOS

O padrão de susceptibilidade das cepas de *M. kansasii* frente às diferentes drogas, através do método das proporções está demonstrado na figura 1.

Em relação à ciprofloxacina, na falta de uma padronização da metodologia, os resultados obtidos foram ausência de crescimento bacteriano em 12 cepas de *M. kansasii*.

Os valores das CIMs e CBMs das drogas antituberculosas utilizadas estão expressos na figura 2.

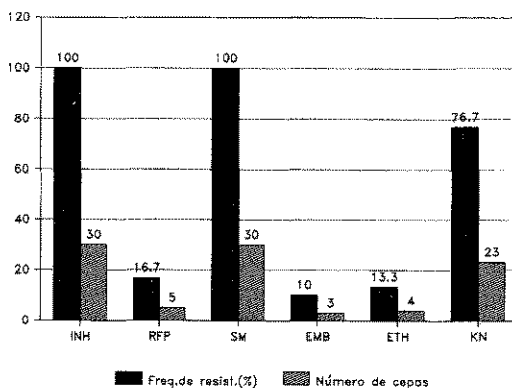


FIGURA 1
Frequência de resistência de 30 cepas de *Mycobacterium kansasii*, isoladas de escarro, de pacientes de diversas unidades de saúde do Estado de São Paulo, através do método das proporções.

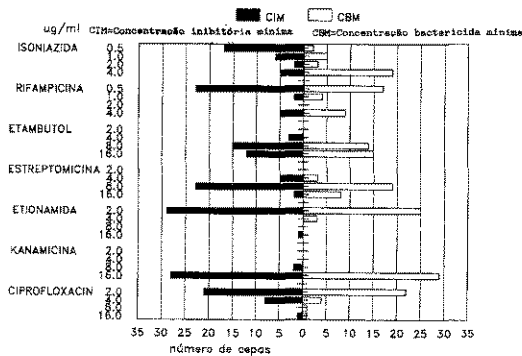


FIGURA 2
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), "in vitro" de drogas antituberculosas, frente ao *Mycobacterium kansasii*.

DISCUSSÃO

A inexistência de uma metodologia para a determinação da resistência às drogas e a falta de esquemas definidos para o tratamento de micobactérias outras que não o *M. tuberculosis*, estabelece a necessidade de se traçar um perfil de sensibilidade para cada droga, visando o sucesso terapêutico.

Numerosos estudos^{2,17} indicam que nos isolados de pacientes não tratados o *M. kansasii* é sensível a

1,0 µg/ml de rifampicina e 5,0 µg/ml de etambutol, é resistente a 1,0 µg/ml e sensível a 5,0 µg/ml de isoniazida, enquanto que à estreptomomicina apresenta sensibilidade variável a 2,0 µg/ml mas são sempre sensíveis a 10,0 µg/ml. Considerando o perfil de sensibilidade estabelecido para as cepas selvagens do *M. kansasii* e a eficácia dos esquemas terapêuticos contendo rifampicina¹⁷, o teste de sensibilidade rotineiro tem indicação principalmente em casos de recaídas e falências de tratamento.

Neste estudo verificamos que entre as drogas utilizadas nos esquemas terapêuticos, o *M. kansasii* mostrou resistência à isoniazida e estreptomomicina pelo método das proporções, uma vez que o *M. kansasii* é resistente a estas drogas nas concentrações críticas utilizadas no método, 0,2 µg/ml para isoniazida e 2,0 µg/ml para estreptomomicina. Na determinação da CIM obtivemos para a isoniazida resultados mais baixos que os encontrados por outros autores^{1, 3}, enquanto que na CBM os valores encontrados foram mais altos. Essa diferença entre ação inibidora (CIM) e ação bactericida (CBM) pode, no caso da isoniazida, ser explicada pela existência de outros fatores de resistência¹⁰. As micobactérias adquirem a multidroga resistência pelo fenômeno da mutação e seleção; entretanto, em certos casos, a

resistência pode ser causada pela estrutura lipídica da camada externa que envolve a bactéria⁷.

Com relação à rifampicina, estreptomomicina, kanamicina e etionamida houve concordância entre a CIM, CBM e o método das proporções.

Para o etambutol os resultados das CIMs e CBMs foram altos, contrariando dados existentes de sua ação bacteriostática e mostrando a ausência de ação bactericida. Há citações indicando a influência do meio sintético diminuindo a ação do etambutol⁹, e a interferência do período de incubação da cultura atuando na ação da droga¹². Também alguns autores mostraram com seus dados que a aparente resistência "in vitro" do etambutol pode ser um artefato e que pode não ocorrer "in vitro"²¹.

A ciprofloxacina foi também estudada e os resultados confirmaram a ação bactericida desta droga para o *M. kansasii*^{6, 10}. Os resultados dos testes pelo método das proporções foram registrados como ausência de crescimento, uma vez que não há padronização deste método para a ciprofloxacina.

Este estudo preliminar mostrou a importância da rifampicina no tratamento do *M. kansasii*. A partir dos dados obtidos os autores pretendem estudar a sensibilidade do *M. kansasii* frente a combinações de drogas e com isso sugerir esquemas terapêuticos mais eficazes.

RIALA6/747

SATO, D.N.; SILVA, E.A.M. da; FERRAZOLI, L.; PALACI, M. - Ação "in vitro" de diferentes drogas, sobre o *Mycobacterium kansasii*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 53(1/2):55-58, 1993.

ABSTRACT: The treatment of *M. kansasii* infection have been conducted as a tuberculosis. Since rifampin was introduced in the drug regimens for disease due to *M. kansasii* the sputum conversion from positive to negative is confirmed in 100%. This study was made to contribute in the treatment of disease due to *M. kansasii*. Through of Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration determination and susceptibility tests by proportion method, the authors compared the results that was obtained with the results of international data. 30 *M. kansasii* strains isolated of patients with pulmonary disease were studied. A susceptibility testing using the conventional antituberculosis drugs isoniazid, rifampin, streptomycin, ethambutol, ethionamide, kanamycin and ciprofloxacin was made according to the standardized techniques. The results showed that *M. kansasii* was sensible to rifampin, ethionamide, kanamycin and ciprofloxacin, while to another drugs the results were varied. Our data showed that rifampin is essential in the drug regimen of *M. kansasii* infection and the usefulness of susceptibility tests in the retreatment.

DESCRIPTORS: *Mycobacterium kansasii*; drug susceptibility tests; drug resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHN, C.H.; LOWELL, J.R.; AHN, S.S; AHN, S. and HURST, G.A. Chemotherapy for pulmonary disease due to *Mycobacterium kansasii*: efficacies of some individual drugs. 1981. Rev. Inf. Dis. 3 (5):1028-34.
2. AHN, C.H.; LOWELL, J.R.; AHN, S.S; AHN, S. and HURST, G.A. Short-course chemotherapy for

pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii*. 1983. Am. Rev. Resp. Dis. 128:1048-50.

3. AHN, C.H.; WALLACE Jr, R.J.; STEELE, L.C. and MURPHY, D.T. Sulfonamide containing regimens for disease caused by rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. 1987. Am. Rev. Resp. Dis. 135:10-16.

4. BECK, A. and STANFORD, J.L. *Mycobacterium xenopi*: a study of sixteen strains. 1968. *Tubercle*. 49:226-34.
5. CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H.T.; MENON, N.K.; MITCHISON, D.A.; RIST, N. et SMELEV, N.A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity tests in tuberculosis programmes. 1969. *Bull. WHO* 41:21-43.
6. COLLINS, C.H. and UTTLEY, H.C. In vitro susceptibility of mycobacteria to ciprofloxacin. 1985. *J. Antim. Chemoth.* 16:575-80.
7. DAVID, H.L. Basis for lack of drug susceptibility of atypical mycobacteria. 1981. *Rev. Inf. Dis.* 3(5):878-84.
8. DAVID, H.L.; LEVY-FREBAULT, V. et PAPA, F. Méthodes de Laboratoire Pour Mycobacteriologie Clinique (Supplément à "Mycobacteriologie Clinique et de Santé Publique" - Manuel de la S.E.M.). 1986. Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries. Institut Pasteur. Paris.
9. GANGADHARAM, P.R. and GONZALES, E.R. Influence of medium on the "in vitro" susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol. 1970. *Am. Rev. Resp. Dis.* 102:653-55.
10. GAY, J.D.; YOUNG, D.R. and ROBERTS, G.D. In vitro activities of norfloxacin and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium kansasii*. 1984. *Antim. Ag. Chemoth.* 26(1):94-96.
11. HAWKINS, J.E.; WALLACE Jr, R. J. and BROWN, B.A. Antibacterial susceptibility test: Mycobacteria. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 1991. Albert Balows (ed.) 5th Ed. Washington D. C. p. 1138-1152.
12. HEIFETS, L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility test in Mycobacteriology. 1988. *Am. Rev. Resp. Dis.* 137:1217-22.
13. KANTOR, I.N. Bacteriología de la tuberculosis humana y animal. 1988. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS/OMS. Monografía n. 11/rev. I.
14. KUBIN, M.; SVANDOVA, E.; MEDEK, B.; CHOBOT, S. and OLISOVSKY, Z. *Mycobacterium kansasii* infection in an endemic area of Czechoslovakia. 1980. *Tubercle*. 61:207-12.
15. MANIAR, C.A. and VANBUCKENHOUT, L.R. *Mycobacterium kansasii* from an environmental source. 1976. *Can. J. of Public Health*. 67:59-60.
16. NAKAMURA SATO, D.; SILVA, E.A.M.; PALACI, M.; UEKI, S.Y.M.; TELLES, M.A.S.; MARTINS, M.C. e LEITE, O.H.M. Susceptibilidade "in vitro" de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à ciprofloxacin. 1990. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 32:249-53.
17. PEZZIA, W.; RALEICH, J.W.; BAILEY, M.C.; TOTH, E.A. and SILVERBLATT, J. Treatment of pulmonary disease due to *Mycobacterium kansasii*: recent experience with rifampin. 1981. *Rev. Inf. Dis.* 3(5): 1035-39.
18. SILVA, E.A.M.; MIRANDA, J.B.N.; FERRAZOLI, L.; ALGE, M.E.; SILVA, R.R.F.; FUZIHARA, T.O. e PALACI, M. Ocorrência de infecções pulmonares devidas ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 47(1/2):11-17.
19. The Mycobacterioses Research Group of Japanese National Chest Hospitals. Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. 1983. *Chest*. 83(6):890-92.
20. THRUPP, M.D. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 1986. Victor Lorian (ed.) 2nd Ed. Baltimore M.D. Williams & Wilkins. p. 93-150.
21. TSANG, A.Y.; BENTZ, R.R.; SCHORK, A. and SODEMAM, T.M. Combined vs. single-drug studies of streptomycin and ethambutol. 1976. *Am. J. Clin. Pathol.* 70:816-20.

Recebido para publicação em 04 de dezembro de 1992.

INCIDÊNCIA DO GÊNERO *HAEMOPHILUS* NAS CONJUNTIVITES PURULENTAS EM CRIANÇAS NA REGIÃO DE CAMPINAS, SP.*

Mathilde RASKIN**
Marilu Mendes Moscardini ROCHA**
Ilka Maria LANDGRAF***
Braz MEZZACAPA NETO***

RIALA6/748

RASKIN, M.; ROCHA, M.M.M.; LANDGRAF, I.M. & MEZZACAPA NETO, B. Incidência do gênero *Haemophilus* nas conjuntivites purulentas em crianças na região de Campinas, SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):59-62, 1993.

RESUMO: O estudo de 354 conjuntivites purulentas, em crianças com menos de 10 anos de idade, na região de Campinas, teve como objetivo principal verificar a presença do *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* incriminado como o agente etiológico da Febre Purpúrica Brasileira nessa população. Dentre as 264 bactérias identificadas, este microorganismo foi observado em 16,29%, o *Haemophilus influenzae* em 34,09%, *Staphylococcus aureus* em 10,61% e *Staphylococcus sp.* em 14,39% dos casos. A maior positividade desses casos ocorreu entre a faixa etária de 0 (zero) a 2 (dois) anos (60,27%). A distribuição sazonal indicou a prevalência do *Haemophilus influenzae* no período de clima frio e do *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* no período de clima quente.

INTRODUÇÃO

Conjuntivites purulentas em crianças, especialmente aquelas ligadas a climas quentes, têm características clínicas de etiologia múltipla.

As conjuntivites purulentas em nosso país têm despertado um grande interesse em seu estudo desde a caracterização do agente etiológico da Febre Purpúrica Brasileira (FPB), posto que a manifestação clínica dessa doença é quase sempre precedida por conjuntivite purulenta. Neste caso o agente etiológico foi identificado como um clone especial do

Haemophilus influenzae biogrupo *aegyptius*, anteriormente denominado como *Haemophilus aegyptius*. Desta forma, o rastreamento epidemiológico deste agente etiológico em diferentes regiões do país facilitaria medidas profiláticas visando impedir o aparecimento dessa doença recentemente reconhecida e de caráter fulminante.

Nesta oportunidade foram também identificadas outras bactérias incriminadas como o agente causal dessas conjuntivites purulentas e sua frequência comparada com a do *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* na região de Campinas, estado de São Paulo.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz, Campinas, SP.

*** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

De 354 crianças, na faixa etária de 0-10 anos, com conjuntivite purulenta, em um período de 3 anos (1988-1990) foi estudada a secreção ocular empregando-se técnicas bacteriológicas.

O material foi colhido empregando-se estilete com algodão estéril e semeado diretamente em placa contendo ágar Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 10% de sangue de cavalo e achocolatado. As placas semeadas foram incubadas a 35/37°C por 24-48 horas em ambiente de CO₂ (5-10%) e umidade. As bactérias que apresentaram morfologia de coco gram-positivo e produtoras de catalase foram testadas quanto à presença de coagula-se pelo teste em tubo⁸. Aquelas que não demonstraram presença de catalase foram separadas segundo a hemólise. As cepas que apresentaram hemólise parcial foram testadas quanto à sensibilidade à optoquina; para aquelas do tipo beta hemolítico foi verificada a sensibilidade à bacitracina. Para caracterizar o *Enterococcus* foi utilizado o meio de cultura SF (Bacto SF Medium-Difco)³.

As bactérias com morfologia de diplococo gram-negativo foram identificadas segundo os testes de oxidase e série bioquímica dos açúcares para caracterização do gênero *Neisseria*¹³.

As cepas definidas como bacilos gram-negativos foram semeadas em ágar MacConkey (MC) e ágar BHI chocolate com 10% de sangue de cavalo. As colônias que se desenvolveram em MC foram identificadas a partir do meio presuntivo para enterobactérias, meio Pessoa e Silva⁴. Para os bacilos que se desenvolveram somente no BHI chocolate foram aplicados o teste de satelitismo, provas bioquímicas para definição de gênero e espécie e biotipos de *Haemophilus*^{2, 5, 6}, bem como a soraglutinação para a triagem do clone invasor do agente etiológico da FPB¹.

Foram relacionados os resultados obtidos com os diferentes períodos sazonais.

RESULTADOS

Dos 354 casos de conjuntivites estudados foram identificadas 264 amostras bacterianas. Destas, 151 (57,19%) foram identificadas como sendo do gênero *Haemophilus*, sendo que 43 (16,29%) bactérias deste gênero pertenceram à espécie *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*, porém apenas 3 amostras desta espécie apresentaram soraglutinação positiva para o clone do agente etiológico da FPB. Outras bactérias mais frequentemente isoladas foram *Staphylococcus sp* 38 casos (14,39%), *Staphylococcus aureus* 28 casos (10,61%), *Streptococcus sp* alfa hemolítico 11 casos (4,17%) e *Streptococcus pneumoniae* 10 casos (3,79%) (tabela 1).

TABELA 1

Agentes bacterianos identificados das 354 conjuntivites purulentas estudadas.

AGENTES BACTERIANOS	TOTAL DE CASOS POSITIVOS	(%)
<i>Haemophilus sp</i>	151	57,19
<i>Staphylococcus sp</i>	38	14,39
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	10,61
<i>Streptococcus sp</i> α hemolítico	11	4,17
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10	3,79
<i>Streptococcus sp</i> γ hemolítico	9	3,41
<i>Neisseria</i> não patogênica	8	3,03
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	1,52
<i>Streptococcus sp</i> β hemolítico	2	0,76
<i>Enterobacter</i> /E. coli	2	0,76
<i>Pseudomonas sp</i>	1	0,37
Total de positivos	264	74,60
Total de negativos	90	25,40
Total de casos	354	100,00

Observou-se que o isolamento de uma bactéria da secreção conjuntival dos pacientes, foi maior na faixa etária de 0-2 anos de idade, sendo que o agente etiológico mais freqüente foi o *Haemophilus sp*.

Caracterizadas as bactérias do gênero *Haemophilus* observou-se que o biotipo II do *Haemophilus influenzae* prevaleceu, sendo seguido pelo *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* e *Haemophilus influenzae* biotipo III. (tabela 2).

Comparando a incidência destes agentes etiológicos isolados das secreções conjuntivais e a sazonalidade, observou-se uma distribuição homogênea em todos os períodos do ano do *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp* e *Streptococcus*. Porém o *Streptococcus pneumoniae* apareceu mais vezes nesta região nos meses frios do ano, sendo que nestes 3 anos de estudo, não foi identificada nenhuma conjuntivite por este coco gram-positivo no primeiro trimestre. Da mesma forma, considerando-se as infecções causadas por *Haemophilus sp* no conjunto dos 3 anos estudados, não se notou alteração significativa quanto aos 4 períodos sazonais. No entanto, nos anos de 1988 e 1990, observou-se maior incidência destas conjuntivites no 3º período destes anos. Na observação dos resultados das conjuntivites que tiveram como agente etiológico *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* notou-se nos anos 1988 e 1990 que estas infecções ocorreram com maior freqüência no 2º período sazonal, período este em que ainda predominam temperaturas relativamente amenas. No ano de 1989, estas infecções surgiram apenas no 1º período sazonal com nenhum caso nos outros períodos. (Gráfico 1).

TABELA 2

Frequência de conjuntivite por *Haemophilus* segundo faixas etárias dos pacientes.

Haemophilus influenzae

FAIXA ETÁRIA (ANOS)	BIOTIPO							BIOGRUPO <i>AEGYPTIUS</i>				TOTAL
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	*FPB+	*FPB	SP	
0	06	23	07						01	06	01	44
%	54,55	43,40	30,43						33,33	15,00	5,60	29,14
1	10	03	01						01	07	03	25
%	18,86	13,04	50,00						33,33	17,50	16,66	16,56
2	04	04	01						06	07	22	
%		7,55	17,39	50,00					15,00	38,89	14,57	
3	03	03								07	01	14
%	27,27	5,66								17,50	5,60	9,27
4	01	02								01	02	06
%		1,89	8,70							2,50	11,11	3,97
5	01	02								01		04
%		1,89	8,70							2,50		2,65
6		01	01							02		03
%			4,35							5,00		1,99
7		01								04		05
%		1,89								10,00		3,31
8		02								01		03
%		3,77								2,50		1,99
9	01	02						01	01	01	06	
%		1,89	8,70						33,33	2,50	5,60	3,97
IGNORADA	02	07	02					01		04	03	19
%	18,18	13,21	8,70							10,00	16,67	12,58
TOTAL	11	53	23	02	00	00	00	01	03	40	18	151

*FPB = Febre Purpúrica Brasileira

DISCUSSÃO

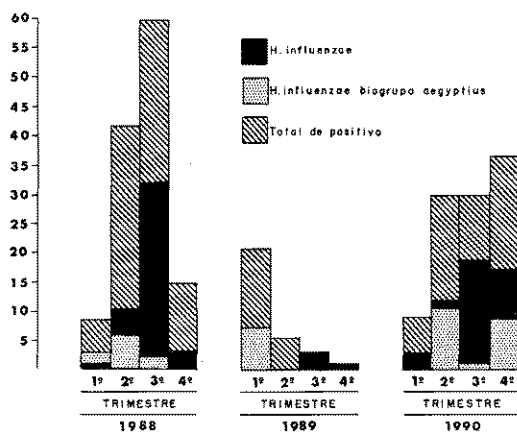


GRÁFICO 1

Distribuição sazonal de *Haemophilus sp* das conjuntivites nos 3 (três) anos estudados.

Os resultados demonstraram que o *Haemophilus sp* foi o agente bacteriano mais associado com as conjuntivites purulentas na faixa etária estudada, corroborando desta forma observações de outros autores^{4, 11, 12}, sendo seguido pelo *Staphylococcus sp* e pelo *Staphylococcus aureus*.

Embora *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*, o bacilo de Koch-Weeks, denominado anteriormente *Haemophilus aegyptius*¹⁰, tenha sido citado como agente bacteriano mais frequentemente isolado das conjuntivites purulentas agudas em certas partes da Europa, Norte da África e América do Norte⁷, este fato não foi observado na amostragem deste trabalho, no qual houve maior ocorrência do *Haemophilus influenzae*, correspondendo a 34,09%. O *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* ocorreu em 16,29% dos quais apenas 3 cepas apresentaram sorroaglutinação positiva para Febre Purpúrica Brasileira.

Embora não tenha sido descrito nenhum caso de Febre Purpúrica Brasileira na região de Campinas até o último período deste estudo, uma contínua vigilância das conjuntivites purulentas, especialmente em algum surto, deveria ser processada pois a faixa etária de maior prevalência da doença¹ coincide com a faixa etária de maior número de *Haemophilus* por nós identificados. Destes, os 3 casos em que foi encontrado o clone epidêmico do *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*, dois deles estavam na faixa etária entre 9 e 10 anos de idade. Desta forma um estudo cuidadoso de

surtos de conjuntivite purulenta viria em muito auxiliar no rastreamento desse clone epidêmico, facilitando assim a prevenção e controle dessa cepa invasora do *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*, até há pouco tempo desconhecida na área de Saúde Pública.

AGRADECIMENTO

Ao Dr. Carmo E. A. Melles que nos orientou na dissertação deste trabalho.

RIALA6/748

RASKIN, M.; ROCHA, M.M.M.; LANDGRAF, I.M. & MEZZACAPA NETO, B. - Incidence of the genus *Haemophilus* in purulent conjunctivitis in children in the region of Campinas, SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):59-62, 1993.

SUMMARY: The study of 354 purulent conjunctivitis in children under 10 years old in the region of Campinas, SP, had the aim of finding the presence of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*, the etiologic agent of the Brazilian Purpuric Fever in this population.

Among the 264 bacteria identified, this organism was shown in 16,29%, *Haemophilus influenzae* in 34,09%, *Staphylococcus aureus* in 10,61%, and *Staphylococcus sp* in 14,39. Most of these cases occurred between the age groups from 0 (zero) to 2 years (60,27%). The seasonal distribution showed a prevalence of *Haemophilus influenzae* in cold season and of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* in warm season.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANDILEONE, M.C.C. *et alii* - Febre Purpúrica Brasileira, caracterização rápida das cepas invasoras de *Haemophilus aegyptius*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 31(4):221-227, 1989.
2. BRENNER, D.J. *et alii* - Biochemical, Genetic and Epidemiologic Characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian Purpuric Fever. *Journal of clinical Microbiology*, 26(8): 1.524-1534, 1988.
3. DIFCO MANUAL. *Difco Laboratories*, Detroit, Michigan, 10th ed., 1984, p. 758.
4. HUET, M. - Premiers résultats de l'étude de 120 souches de bacilles du genre *Haemophilus* isolées de conjuntivites. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 33:65-79, 1956.
5. KILIAN, M. - *Haemophilus*. In: BALOWS, A., HAUSLER JR., W.J., HERRMANN, K.L., ISENBERG, H.D. & SHADOMY, H.J., (eds.) *Manual of clinical Microbiology*, 5th ed., Washington, American Society for Microbiology, 1991, p. 463-470.
6. KILIAN, M. & BIBERSTEIN, E.L. - *Haemophilus*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, c.1984, vol. 1, p. 558-569.
7. KILIAN, M. *et alii* - The taxonomy of *Haemophili* isolated from conjunctivae. *Acta. path. microbiol. scand. Sect B* 84:132-138, 1976.
8. NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2:34, 1982.
9. PESSOA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. - Meios de Rugar lisina motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:97-100, 1972.
10. PITTMAN, M. & DAVIS, D.J. - Identification of the Koch-Weeks bacillus (*Haemophilus aegyptius*). *J. Bact.*, 59:413-426, 1950.
11. SANDSTRÖM INGER, K.M.D. *et alii* - Microbial causes of neonatal conjunctivitis. *The Journal of Pediatrics*, 105(5):706-711, 1984.
12. SIEGEL, J.D. - Eye infections encountered by the pediatrician. *Pediatric Infect. Dis.*, 5(6):741-748, 1986.
13. VEDROS, N.A. - *Neisseria*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, c. 1984, vol. 1, p.290-296.

Recebido para publicação em 18 de maio de 1993.

GROWTH AND MAINTENANCE OF *Aedes albopictus* CELL LINE, CLONE C6/36, IN DIFFERENT MEDIA.*

Maria Luisa, BARBOSA**
Iray Maria ROCCO**
Julia M. M. Souza FELIPPE**
Aurea Silveira CRUZ**

RIALA6/749

BARBOSA, M.L.; ROCCO, I.M.; FELIPPE, J.M.M.S.; CRUZ, A.S. – Growth and Maintenance of *Aedes Albopictus* Cell line, clone C6/36, in Different Media. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):63-70, 1993.

SUMMARY: The sensitivity of *Aedes albopictus* cell line, clone C6/36, to arbovirus isolation and growth has been being shown by several authors. The present work has verified which, among several media under the same conditions, would be the most efficient one for C6/36 cultivation and viral isolation. The L-15 medium has proved to be the best among others (MEM, DMEM and 199) with the quickest viral isolation (DEN-1). Also, in this medium, the samples could be observed until the 14th day, without significative cellular death. The results recommend L-15 medium as the most efficient and economic one for the purposes.

INTRODUCTION

Among the arboviruses that infect man, dengue flavivirus is one of the most important. Paul, *et al.* (1969) should, for the first time, that *Aedes albopictus* mosquito cells were susceptible for the dengue virus isolation. Since then, different mosquito cell lines have been tested with the same purpose (Tesh, 1979; White, 1987; Kuno *et al.*, 1971; Kuno *et al.*, 1985). Based on the advantages offered by this methodology such as: they are more sensitive than the vertebrate cell culture system, are easier to manipulate, to maintain and to grow at ambient temperature (Chappell *et al.*, 1971) and remain as stable cultures

for 14 days without medium change (Race *et al.*, 1979).

Despite the existence of other mosquito cellular cultures for dengue isolation, the *Aedes albopictus* cell line, clone C6/36, has proved to be one of the most sensitive (Igarashi, 1978). In these cells the dengue virus infection can be easily observed by the characteristic cytopathic effect (CPE) (Kuno, 1983; Kuno *et al.*, 1985; Gubler *et al.*, 1984).

In this work, studies with the dengue-1 virus (DEN-1) in C6/36 cells were made, in different media, to verify the suitability between cells and medium that provides advantages in the isolation and propagation of dengue virus.

* Key Words: C6/36 cells. Cellular culture medium. Viral isolation. Cytopathic effect. Dengue virus.

** Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo – SP – CEP: 01246-900 – Brazil.

MATERIALS AND METHODS

a) Growth and Maintenance Media

The following media were tested:

– Leibowitz n°. 15 (L-15 – Sigma) modified with TPB (Tryptose Phosphate Broth), 2.95% of non essential aminoacids solution and 2% of L-glutamin.

– 199 medium (Gibco).

– Minimum Eagle Medium (MEM – Adolfo Lutz Institute, Cellular Culture Laboratory) according to Rechcigl (1977) supplemented with 0.2mM of non-essential aminoacids solution.

– Dulbecco Minimum Eagle Essential Medium (DMEM – Sigma).

All media were supplemented with 10% heat-inactivated at 56°C for 30 minutes of foetal bovine serum and contained 10 I.U./ml of penicillin and 100 uL/mL of streptomycin; for cell maintenance, 2% of FBS was added.

b) Cellular Adaptation to Media

Aedes albopictus cell line (clone C6/36) cultures, with 5×10^5 cells/ml, kindly supplied by Dr. Igarashi, Department of Preventive Medicine, Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University (Osaka, Japan), were used. The C6/36 cells were adapted to L-15, 199, MEM and DMEM media, through ten serial passages. For each passage, the cells were propagated in four 250 mL glass flasks (500,000 cells/mL) with different medium each and observed to verify their integrity.

After the 10th passage, the culture tubes were prepared as follows: one million cells with 2 mL of growth media (L-15, MEM, DMEM or 199) were propagated and incubated at 28°C for 24 hours. The growth media was then substituted by their respective maintenance media and then the cells were infected with 30 µL. of different inocules. The tubes were incubated at 28°C for at least ten days.

c) Viral Growth Test in Different Media

For the viral growth test in cells cultivated in different media, one sample of a DEN-1 patient isolation from serum, identified and typified by immunofluorescence (Gubler *et al.*, 1984) using monoclonal antibodies supplied by the Division of Vector Borne Virus, Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control, Fort Collins, CO, was used.

The 2nd and 14th passages of this sample were made and inoculated in the C6/36 cells grown in different media. The inoculum consisted of 30 µL of viral suspension which titre was $10^{7.37}/100$ mL or diluted from 10^{-1} to 10^{-6} . Three tubes of each media per sample dilution and three control tubes were used for each media. All tubes were observed daily and immunofluorescence tests were performed.

d) Human Sera

To verify the sera toxicity on the clone C6/36 in the different media tested, 40 patients sera were picked up at random, from a universe of 2,117 dengue suspected sera to viral isolation. Later, other 40 samples of 142 DEN-1 positive sera (isolation and immunofluorescence) were used for the re-isolation in the clone C6/36 kept in L-15 medium. All samples tested came from sera harvested during the 1990/1991 epidemic in the State of São Paulo. The inoculation volume of the sera was defined to be 30 uL after tests with volumes ranging from 10 to 50 uL. The toxic effect was intense with volumes above to 40 uL.

e) Isolation in L-15 Media and Immunofluorescence

After 24 hours of the cells' growth, tubes containing L-15 media modified were inoculated with 30 uL of each serum sample. Ten test tubes were used for each one of the 40 tested sera. They were observed with inverted microscope (Zeiss) from the first to the tenth day, accompanied by immunofluorescence daily tests (Gubler *et al.*, 1984).

TABLE 1

C6/36 cells' Adaptation to the Different Media

Passage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Media										
L-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEM	+	+	+	+	+	+	+	+	(*)	(*)
DMEM	+	+	+	+	+	+	+	(*)	(*)	(*)
199	+	+	+	+	(*)	*	#	@	@	@

+ – Integer cellular monolayer, few cells on the supernatant.

(*) – Cellular monolayer showing first degeneration signs.

* – Cellular monolayer with 50% of fallen cells.

– Cellular monolayer completely degenerated, 100% of fallen cells.

@ – Not possible.

TABLE 2

Cytopathic effect observed in infected C6/36 cells, maintained in different media. Second passage virus.

Day	Medium	C	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	L-15	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
2	L-15	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
3	L-15	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	DMEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-15	-	+	(+)	-	-	-	-	-
	DMEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L-15	-	+	+	(+)	-	-	-	-
	DMEM	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
6	L-15	-	+	+	+	(+)	-	-	-
	DMEM	-	+	(+)	-	-	-	-	-
	MEM	-	+	(+)	-	-	-	-	-
	199	(*)	(+)	-	(*)	(*)	-	-	-
7	L-15	-	+	+	+	+	(+)	-	-
	DMEM	-	(*)	(*)	+	(+)	-	-	-
	MEM	-	(*)	(*)	(+)	(+)	-	-	-
	199	*	*	(*)	*	*	(*)	(*)	-
8	L-15	-	+	+	+	+	(+)	-	-
	DMEM	(*)	*	*	+	(+)	-	-	-
	MEM	(*)	*	*	*	*	-	-	-
	199	*	*	*	*	*	*	*	(*)

- : No CPE

(+): Less than 25% of cells with CPE

+ : Plus than 75% of cells with CPE

(*) : 25% or less of dead cells

* : 75% or more of dead cells

C -: Not inoculated control cells.

TABLE 3

Cytopathic effect observed in infected C6/36 cells, maintained in different media. Fourteenth passage virus.

Day	Medium	C	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	L-15	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	DMEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
2	L-15	-	+	(+)	-	-	-	-	-
	DMEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
3	L-15	-	+	+	(+)	(+)	-	-	-
	DMEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	-	-	-	-	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-15	-	+	+	+	(+)	(+)	-	-
	DMEM	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	MEM	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	199	-	(+)	-	-	-	-	-	-
5	L-15	-	+	+	+	+	(+)	-	-
	DMEM	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
	MEM	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
	199	(*)	(+)	(+)	(+)	-	(*)	-	-
6	L-15	-	+	+	+	+	+	-	-
	DMEM	-	*	+	(+)	(*)	-	-	-
	MEM	-	*	(*)	(*)	(*)	(*)	-	-
	199	*	(*)	(*)	(*)	-	*	-	-
7	L-15	-	+	+	+	+	+	(+)	-
	DMEM	-	*	*	*	(*)	(*)	-	-
	MEM	(*)	*	*	*	(*)	-	-	-
	199	*	*	*	*	*	*	-	(*)
8	L-15	-	+	+	+	+	+	(+)	-
	DMEM	-	*	*	*	*	(*)	-	-
	MEM	-	*	*	*	*	*	-	-
	199	*	*	*	*	*	*	*	*

- : No CPE

(+): Less than 25% of cells with CPE

+ : Plus than 75% of cells with CPE

(*) : 25% pr less of dead cells

* : 75% or more of dead cells

C - : Not inoculated control cells.

TABLE 4

Toxicity Evaluation of Inoculated Sera on the Different Media Over C6/36 Cells.

DAY		1	2	3	4	5	6	7	8
MEDIA									
L-15	C	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
	S	2.5*	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
DMEM	C	0	0	*	0	0	0	0	25
	C+-	-	-	-	(+)	+	+	50	100
	S	12.5	12.5	12.5	25	25	32.5	32.5	32.5
MEM	C-	0	0	0	0	0	0	0	25
	C+	-	-	-	(+)	+	50	50	100
	S	37.5	37.5	37.5	50	50	55	55	55

C- : Not inoculated control cells.

C+ : Control cells inoculated with DEN- 1 in the 14th passage.

S : Inoculated sera samples.

- : Interger cells.

(+) : Less than 25% of cells with CPE.

+ : More than 75% of cells with CPE.

* : Percentage of tubes with fallen cells.

All tests were made in glass containers incubated in common bacteriologic incubator. No CO₂ incubator was used in any step of this work.

RESULTS

1 - Adaptation of C6/36 Cells to Different Media

The C6/36 cell the showed best adaptation to L-15 media (table 1), not showing any significant signs of degeneration until the 10th day.

In the MEM and DMEM media, dead cells were observed in the supernatant, after the 8th day and the monolayer showed signs of loss of confluency.

The 199 medium was the less adequate, once in the 5th passage more than 50% of the cells were dead, the cellular monolayer was not confluent in several points and the monolayer was unfastened.

The cells were observed until the 50th day only in the L-15 media and they had good aspect until the 14th day. After the 15th day, the tubes showed a progressive rise in the number of unfastened cells on the supernatant. Nevertheless, transfers made with bottles maintained for 50 days without medium change showed recuperation of the monolayer and sensitive cells for the dengue isolation.

2 - Test of viral Growth and Demonstration of CPE in Different Media

The cell cultures were maintained in different media and inoculated with DEN-1 virus at different passages (2nd and 14th) and at the dilutions previously cited, showed CPE from the 3rd day on with virus from the 2nd passage and from the 1st day with virus from the 14th passage in cells with L-15 media. This CPE was observed only in cells with MEM and DMEM from the 5th and 4th days on, with the passages 2 and 14 respectively, and this CPE was significantly less intense. With 199 medium this effect was seldom observed. Figure 1 shows the DEN-1 effect 48 hours after inoculation in C6/36 cell line with the different media used and their controls.

3 - Test of Toxic Effect of Sera Used for Isolation in Clone C6/36 Cells, in Different Media

Obtained results showed the effectiveness of L-15 media in relation to the toxic effect of the sera over the cells (table 4).

From 40 tubes inoculated with different sera, only 2.5% of cellular unfasting after 24 hours occurred in cells with L-15 media and 12.5% and 37.5% in cells with DMEM and MEM media, respectively. These proportions increased in subsequent days. The observation of the tubes was impossible from the 9th day on because the tubes of the negative controls

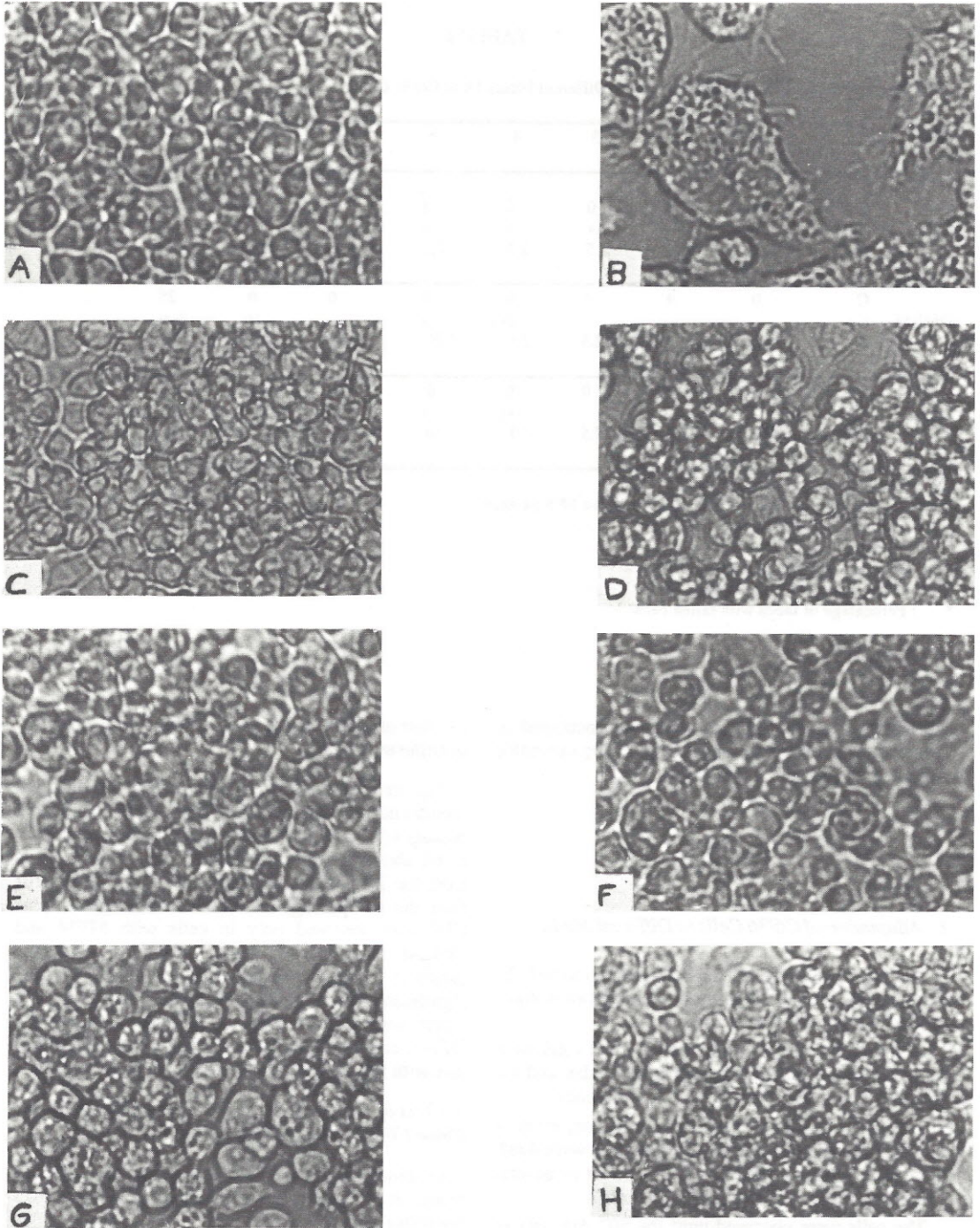


FIGURE 1

Morphology of C6/36 *Aedes albopictus* cell line grown in different media. Carl Zeiss optic microscope JE Naval, X125.

A, C, E and G: control cells in L-15, MEM, DMEM and 199 media respectively; B, D, F, and H: same media but inoculated with 30 ul of a $10^{-7.37/100}$ ul dilution of DEN-1.

showed a large number of unfastened cells in media other than L-15, were cells presented no alteration until the last day of observation. 199 medium was not used in this test as it was already verified the cells did not maintain their integrity after the 5th passage.

4 - Isolation and Immunofluorescence

It was verified that C6/36 cells, maintained in L-15 medium and inoculated with patients sera showed CPE in 25% of them after 72 hours. The immunofluorescence revealed that 20% of the samples tested resulted positive after 24 hours of inoculation (table 5).

TABLE 5

TABLE 5 - Chronological Order of Positivity by CPE Occurrence and Immunofluorescences in 40 Sera Samples Inoculated in C6/36 Cells in L-15 Medium.

Days after Inoculation	CPE	Immunofluorescence
1	0 (0.0%)	80 (20.0%)
2	0 (0.0%)	100 (25.8%)
3	100 (25.0%)	90 (22.5%)
4	150 (37.5%)	10 (2.5%)
5	110 (27.5%)	10 (2.5%)
6	30 (7.5%)	10 (2.5%)
7	10 (2.5%)	0 (0.0%)
Total	400 (100%)	300 (80%)

For each serum sample 10 tubes were made and observed for both CPE and immunofluorescence.

DISCUSSION

The *Aedes albopictus* cell line clone C6/36's high grade of susceptibility has been shown in the dengue virus isolation (Igarashi *et al.*, 1978). The identification of the isolated virus was at first made by the hemmagglutination inhibition test (Clarke *et al.*, 1958) and afterwards by complement fixation (Kuberski *et al.*, 1977). However, the sensibility was higher when the immunofluorescence technique with anti-Dengue monoclonal antibodies specific type sera, was used (Gubler *et al.*, 1984).

Kuno *et al.* (1985), showed that the detection of dengue virus in C6/36 cells is directly linked to the viral titre and incubation period, as well as the fusion of infected cells with formation of syncytia is influenced by the infecting viral strains, the pH and composition of media, the culture age and also by the kind of container surface where the cells are being cultivated (plastic or glass). (Randolph *et al.*, 1990).

Several authors (White, 1987; Gubler *et al.*, 1984; Tesh, 1979; Igarashi, 1978; Kuno *et al.*, 1985) tested the growth and better culture conditions for C6/36

cell line and its utilization in viral isolation, using different growth media and cell line maintenance. However, no one tested the several media under the same conditions, what makes impossible to determine which is the most adequated medium for cellular growth and viral isolation. To know which is the best medium is of extreme importance during the dengue epidemics once it is when an efficient virus isolation method is essential.

This work's universe is 142 patient sera, with positive isolation of DEN-1, proceeding from the epidemic area in São Paulo state.

In the first isolated samples, when C6/36 cells in L-15 were used, a decrease on the time of CPE occurrence was observed. Afterwards, 40 samples were taken randomly from the previous 142 so that a more accurate analysis of the results to verify the initial observation (tables 2, 3 and 5) could be made. A real decrease of 72 hours between the inoculation and the CPE occurrence was found (figure 5). Data showed that the L-15 media is the most efficient in the present conditions, being a more rapid method of viral isolation.

Another advantage of L-15 media is that the samples can be observed until the 14th day without significative cellular death. This is not the case with MEM, DMEM and 199 media, particularly with the last one which had a high number of dead cells in the supernatant from the 5th day on (tables 2 and 3).

The results are intriguing, due to the composition of the several media. It is known that the 199 medium is extremely rich of vitamins, which is not the case with L-15 medium, as well as in the non-essential aminoacids composition. As far as MEM is concerned, it is the poorer in aminoacids and salts. All the tested media have bicarbonate as buffer agent except the L-15 which buffering are base-free aminoacids. The acid metabolites percentage is reduced by the substitution of galactosis and sodium piruvate.

Therefore it can be inferred that one or more L-15 factors or components may interfere positively in the production of the cytopathic effect in the cell-virus interation. Since these results were obtained with incubation in common bacteriologic incubators, they may be different if CO₂ incubator is used.

Data presented are extremely important due to the necessity of this laboratory of producing viral antigens, as well as viral isolation and using for them the most efficient and economic media.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Luiza T. M. de Souza, Virology Service Director, who granted the viabilization of this work, to Dr. Luiz Florêncio de Salles Gomes for the critic revision of the manuscript and to Dr. Teresa Keico N. Sugahara for additional work.

BARBOSA, M.L.; ROCCO, I.M.; FELIPPE, J.M.M.S. & CRUZ, A.S. - Crescimento e manutenção de linhagem celular *Aedes albopictus* clone C6/36 em diferentes meios. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):63-70, 1993.

RESUMO: A sensibilidade da linhagem de células *Aedes albopictus*, clone C6/36, para isolamento e crescimento de arbovírus, tem sido demonstrada por vários autores. O presente trabalho verificou, qual entre vários meios, nas mesmas condições, seria mais eficiente para cultivo de C6/36 e isolamento viral. O meio L-15 mostrou ser o melhor entre outros (MEM, DMEM e 199), com mais rapidez no isolamento viral (DEN-1). Também, nesse meio, as amostras puderam ser observadas até o 14º dia, sem morte celular significativa. Os resultados recomendam o meio L-15 como o mais eficiente e econômico para os propósitos apresentados.

REFERENCES

- CHAPPELL W.A., CALISHER C.H., TOOLE R.F., MANESS K.C., SASSO D.R. & HENDERSON B.E., (1971). Comparison of three methods used to isolate Dengue virus type 2. *Applied Microbiology*, 22, 1100-1103.
- CLARKE, D.H. & CASALS, J., (1958). Techniques for hemmagglutination and hemmagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 7, 561-573.
- GUBLER, D.J., KUNO, G., SATHER, G.E., VELEZ, M. & OLIVER, A. (1984). Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for Dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33(1), 158-165.
- IGARASHI, A. (1978) Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunga viruses. *Journal of General Virology* 40, 531-544.
- KUBERSKI, T.T. & ROSEN, L., (1977). A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26, 533-537.
- KUNO, G. (1982). Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in serum-free medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 16 (5), 851-855.
- KUNO, G. (1983). Cultivation of mosquito cell lines in serum-free medium and their effects on Dengue virus replication. *In Vitro* 19(9), 707-713.
- KUNO, G., HINK, W.F. & BRIGGS, J.D. (1971). Growth promoting serum proteins for *Aedes albopictus* cells cultured in vitro. *Journal of Insect Physiology*, 17, 1865-1879.
- KUNO, G., MOORE, C.G. & SATHER, G.E. (1982). Factors affecting syncytial development in *Aedes pseudoscutellaria* cells by Dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30(4), 870-875.
- KUNO, G., GUBLER, D.J., VELEZ, M. & OLIVER, A. (1985). Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of Dengue viruses. *Bulletin of the World Health Organization*, 63 (2), 279-286.
- PAUL, S.D., SINGH, K.R.P. & BHAT, U.K.M. (1969). A study on the cytopathic effect of arboviruses on cultures from *Aedes albopictus* cell line. *Indian Journal of Medical Research*, 57, 339-348.
- RACE, M., WILLIAMS, M.C. & Agostini, C.F. (1979). Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 18-22.
- RANDOLPH, V. B. & STOLLAR, V. (1990). Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *Journal of General Virology*, 71, 1845-1850.
- RECHCIGL JR., M. (1977). CRC Handbook series in Nutrition and Food, section G: diets, food supplements, volume IV, culture media for cells, organs and embryos.
- TESH, R.B. (1979). A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28 (6), 1053-1059.
- WATERMAN, S.H. & MONATH, T.P. (1982). Fluorescent antibody techniques applied to the identification of dengue virus in infected tissues. *Acta Virologica*, 26, 367-381.
- WHITE, L.A., (1987). Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 to viral infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(7), 1221-1224.

Recebido para publicação em 17 de outubro de 1993.

FREQÜÊNCIA DE ANEMIA EM IDOSOS*

Fernanda Alves CANGERANA**
Hyun Mo YANG***
Ryuko Miyamaru YOKOMIZO**
Marcos Antonio Gonçalves MUNHOZ**
Elena Yoko GUSHIKEN**
Janete Alves Gomes MANOEL**
Luiz Italo NIERO**

RIALA6/750

CANGERANA, F.A.; YANG, H.M.; YOKOMIZO, R.M.; MUNHOZ, M.A.G.; GUSHIKEN, E.Y.; MANOEL, J.A.G. & NIERO, L.I.- Freqüência de anemia em idosos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):71-75, 1993.

RESUMO: Realizou-se um estudo retrospectivo de três anos no qual foram estudados os valores de hemoglobinas de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos, de ambos os sexos, que foram atendidas no Instituto Adolfo Lutz - Central no período compreendido entre os anos de 1990 e 1992.

Foram obtidas 2497 determinações: 1665 de mulheres e 832 de homens. Os valores de hemoglobina foram estudados em conjunto com o sexo e a idade dos indivíduos com o objetivo de estabelecer um perfil dos anêmicos. Os indivíduos do sexo masculino apresentaram anemia mais freqüentemente que os do sexo feminino, 19,83% e 10,09%, respectivamente. Quando levado em conta o fator idade, os indivíduos com mais de 80 anos apresentaram a maior freqüência da doença, 18,74%.

A freqüência de anemia encontrada foi de 13,34% em relação a todos os casos estudados.

DESCRIPTORIOS: idosos, anemia, hemoglobina, hematologia.

INTRODUÇÃO

A anemia é uma condição patológica que atinge grande quantidade de pessoas no mundo todo. Nos países subdesenvolvidos este é um sério problema de Saúde Pública. Em pessoas idosas é a alteração hematológica mais freqüente, afetando cerca de 12% da população com idade acima de 60 anos, segundo estimativa de Salive *et al.*⁵.

A anemia em idosos comumente é assintomática ou muito discreta, e raramente requer internação. Nas pessoas com idade mais avançada, a anemia pode

contribuir para que ocorra fadiga, fraqueza, edema e dispnéia⁵.

Zauber *et al.* estudaram indivíduos em perfeito estado de saúde com idade acima de 84 anos e encontraram médias de hemoglobina de 14,8 g/dL e 13,6 g/dL para homens e mulheres, respectivamente⁹. Tais valores estão acima do considerado como mínimo pela OMS^{6,10}; que determina que o limite de hemoglobina para que uma pessoa seja considerada anêmica é de 12,0 g/dL para mulheres não grávidas e 13,0 g/dL para homens. Esses valores são referentes ao nível do mar, e a OMS sugere, ainda, uma correção de

* Realizado na Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central.

** Da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Disciplina de Informática Médica da FMUSP.

0,2 g/dL para cada 300 metros de altitude. Portanto, o declínio da hemoglobina não é necessariamente um resultado do envelhecimento.

Frete à pequena quantidade de trabalhos sobre anemia em idosos na América Latina, tendo-se em vista que no ano 2025 o Brasil terá mais de 30 milhões de pessoas idosas segundo a projeção de Litvak & Maggi³, e, considerando-se ainda o aumento da esperança de vida⁷, resolvemos verificar a freqüência de anemia e definir um perfil desse agravo na população atendida por nossa instituição, além de relacionarmos estes dados com o sexo e a idade dos indivíduos estudados, buscando estabelecer quem são as pessoas anêmicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado a partir dos hemogramas de rotina efetuados em nosso laboratório no período compreendido entre os anos de 1990 e 1992. Tais exames são provenientes, em sua maioria, de pessoas que procuraram centros de saúde do ERSA². Os hemogramas foram realizados de maneira tradicional e corados pelo método de Leishman.

Foram analisadas 2497 determinações de hemoglobina: 1665 mulheres e 832 homens, com idade superior ou igual a 60 anos. Dividimos o grupo segundo a idade: com idade entre 60 e 69 anos, 70 a 79 anos e pessoas com idade igual ou superior a 80 anos.

Procedemos o estudo estatístico dos dados através do teste de χ^2 para estatística enumerável¹⁸, segundo a fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(o_i - f_i)^2}{f_i}$$

onde o_i é o número observado de anêmicos, f_i é o número esperado (supõe ser da população) e n é o número de categorias.

Realizamos também um Teste de Hipóteses com o objetivo de verificar o significado estatístico das freqüências encontradas e adotamos $p < 0,1$ como região de rejeição pois a amostra decaiu ao longo dos anos.

RESULTADOS

Dos 2497 indivíduos estudados 333 apresentaram anemia, resultando numa freqüência de 13,34%. Essa freqüência foi considerada como sendo igual à da população, ou seja, a freqüência esperada.

Na tabela 1 apresentamos o número observado de anemias e a sua freqüência discriminados em relação aos anos em estudo. O valor de χ^2 , com 2 graus de liberdade, calculado pela expressão acima é $\chi^2(2)=1,737895$, resultando em $p > 0,10$. Portanto, não

existe diferença estatística das freqüências encontradas ao longo dos três anos em relação à da população.

TABELA 1

Freqüência de anemia discriminada pelos anos estudados.

ano	anêmicos	normais	freq. (%)
1990	182	1131	13,86
1991	101	645	13,54
1992	50	388	11,42
total	333	2164	13,34

O número observado de anemias e suas freqüências discriminados em relação ao sexo dos indivíduos encontram-se na tabela 2. O valor calculado de $\chi^2(1)=45,55319$ resulta em $p < 0,001$. Portanto, rejeita-se a hipótese de igualdade da freqüência de anêmicos entre os sexos.

TABELA 2

Freqüência de anemia discriminada pelo sexo.

sexo	anêmicos	normais	freq. (%)
masculino	165	667	19,83
feminino	168	1497	10,09
total	333	2164	13,34

A discriminação em relação aos três grupos etários, com os respectivos números observados e suas freqüências, podem ser visualizadas na tabela 3. O valor calculado de $\chi^2(2)=27,4581$ resulta em $p < 0,001$ e rejeitamos a igualdade da freqüência de anêmicos entre os três grupos etários.

Estudando esses três grupos etários dois a dois encontramos o seguinte:

(a) Entre os indivíduos com idade entre 60 e 69 anos e as pessoas com idade de 70 a 79 anos obtemos $\chi^2(1)=22,18465$, resultando em $p < 0,001$. Rejeitamos a igualdade de freqüência entre esses dois grupos.

(b) Comparando-se os dados dos indivíduos com idade de 60 a 69 anos e os dados dos indivíduos com idade de 80 e mais anos encontramos $\chi^2(1)=16,62301$, resultando em $p < 0,001$. Rejeitamos a igualdade de freqüência entre esses dois grupos.

(c) Entre pessoas com idade compreendida entre 70 e 79 anos e pessoas com idade de 80 anos e mais temos $\chi^2(1)=16,11195$, resultando em $p < 0,001$. Rejeitamos a igualdade de freqüência entre esses dois grupos.

Percebemos que a idade crítica está em torno de 70 anos, pois, estatisticamente, a freqüência de anêmicos

difere mais entre os grupos de 60 a 69 anos e de 70 a 79 anos.

TABELA 3

Frequência de anemia discriminada pela faixa etária.

Faixa etária	anêmicos	normais	freq. (%)
60 a 69 anos	150	1302	10,33
70 a 79 anos	144	693	17,20
80 e mais	39	169	18,75
total	333	2164	13,34

Na tabela 4 podemos observar as frequências de anemia dos indivíduos pelo sexo e pela idade.

TABELA 4

Frequência de anemias discriminada pelo sexo e pela faixa etária.

faixa etária	masculino (%)	feminino (%)
60 a 69 anos	15,82	7,67
70 a 79 anos	23,97	13,58
80 e mais	30,30	13,38
total	19,83	10,09

Podemos verificar as frequências de anemia considerando-se os grupos pelo sexo no decorrer dos anos estudados na tabela 5.

TABELA 5

Frequência de anemia pelo ano e pelo sexo.

ano	masculino (%)	feminino (%)
1990	22,89	9,88
1991	17,24	11,55
1992	16,57	8,18
total	19,83	10,09

Na tabela 6 apresentamos as frequências dos grupos etários nos três anos em estudo.

TABELA 6

Frequência de anemia discriminada pelo ano e pela faixa etária.

faixa etária	1990 (%)	1991 (%)	1992 (%)
60 a 69 anos	9,83	12,25	8,26
70 a 79 anos	19,21	15,22	14,29
80 e mais	19,63	16,95	19,05
total	13,86	13,54	11,42

Nas tabelas 7.a e 7b encontram-se as frequências de anemia dos indivíduos levando-se em conta sexo, idade e o ano em estudo.

TABELA 7.a

Frequência de anemia discriminada pelo ano, pela faixa etária e pelo sexo: masculino.

faixa etária	1990 (%)	1991 (%)	1992 (%)
60 a 69 anos	17,81	15,34	11,96
70 a 79 anos	29,03	17,81	18,75
80 e mais	28,57	28,00	38,46
total	22,89	17,24	16,57

TABELA 7.b

Frequência de anemia discriminada pelo ano, pela faixa etária e pelo sexo: feminino.

Faixa etária	1990 (%)	1991 (%)	1992 (%)
60 e 69 anos	6,55	10,54	6,00
70 e 79 anos	14,09	14,01	11,11
80 e mais	16,46	8,82	10,34
total	9,88	11,55	8,18

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste estudo, verificamos que a frequência de anemia em idosos, correspondente a todos os indivíduos estudados no período de 1990 a 1992, foi de 13,34% o que mostra uma frequência próxima às encontradas na literatura internacional^{1,4,5,8}.

Joosten *et al.*¹ encontraram 24% de anemia em pacientes hospitalizados. Como nosso estudo foi realizado com indivíduos não internados nossa frequência realmente deveria ser menor.

Não existiu diferença significativa do ponto de vista estatístico na frequência de anemia estudada de um ano em relação aos outros, o que sugere uma

tendência a estabilidade da frequência dessas anemias.

Em relação ao sexo, há significativa diferença na incidência de anemias: os homens apresentaram uma frequência de 19,83% enquanto entre as mulheres encontramos 10,09%, dado semelhante aos encontrados na literatura^{4, 5}. Diversos estudos têm encontrado prevalência de anemias que vão de 6% a 30% em homens e de 10% a 22% em mulheres⁴.

Parasuramalu *et al.*¹² em um estudo na Índia encontraram frequência de anemia maior nas mulheres. Tal fato pode ser devido a uma dieta muito pobre em ferro que faz com que a mulher mantenha níveis baixos deste nutriente mesmo na menopausa.

O fato de os homens apresentarem mais anemia que as mulheres na terceira idade pode estar relacionado com fatores hormonais anteriormente estudados por Alexanian¹⁷ e outros. Segundo estes autores é possível estimular a eritropoiese por uma terapia de hormônios andrógenos. Entretanto, Lipschitz *et al.*¹³ não encontraram redução da testosterona circulante em homens idosos anêmicos o que os leva a crer que a teoria de que níveis baixos de andrógenos seriam uma causa de anemia não seja correta.

Analisando-se em conjunto as tabelas 4 e 5 podemos observar que as mulheres passam a ter uma frequência de anemia estável em torno dos 70 anos o que indica que, provavelmente, atinjam um patamar no valor de hemoglobina nesta idade. Entretanto, o comportamento das frequências dos homens difere apresentando uma ascensão. É possível supor-se que o aumento da frequência de anemia encontrado na tabela 4 é consequência do aumento da anemia dos homens mais idosos, visualizado na tabela 5. Autores internacionais já haviam demonstrado que as mulheres, conforme vão envelhecendo, atingem um valor de hemoglobina que passa a ser constante, enquanto as pessoas do sexo masculino, apresentam um valor de hemoglobina que tende a diminuir com o aumento da idade^{11, 13, 14}.

Os indivíduos mais velhos apresentam mais frequentemente anemia, como era esperado segundo a literatura^{5, 14}. Talvez o fato de que as pessoas mais idosas frequentemente apresentam uma doença de base possa ser o responsável pela maior frequência de anemia encontrada nas pessoas com mais de 80 anos. Lipschitz¹⁵ demonstrou que a anemia associada a uma doença crônica é a forma mais comum em pacientes idosos hospitalizados e que, inversamente, a anemia persistente pode ser uma manifestação de um processo de doença crônica.

A eritropoietina circulante de pessoas idosas (74-95 anos) com anemia foi estudada e comparada com a eritropoietina de pessoas adultas (25-60 anos) também anêmicas, por Nafziger *et al.*¹⁶. Tal estudo demonstrou que a concentração de eritropoietina sérica era menor nos mais idosos.

Desta forma podemos concluir que, embora a anemia não seja um fato natural ligado ao envelhecimento, a idade é um fator significativo ligado à anemia, por estar relacionado a outros fatores que a desencadeiam, tais como doenças de base, má absorção, resposta menos sensível da medula e da produção de eritropoietina.

A população de pessoas idosas tende a ter um aumento nas próximas décadas. Tal fato é significativo e, portanto, existe uma necessidade crescente de que os profissionais de saúde estejam preparados para esta nova realidade. Uma vez que a anemia na pessoa idosa não é um fato natural e provavelmente está relacionada a outras alterações fisiológicas, o diagnóstico precoce da anemia é fundamental para que os idosos possam ter uma atenção clínica apropriada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a orientação do Dr. Adhemar Longatto Filho, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

RIALA6/750

CANGERANA, F.A.; YANG, H.M.; YOKOMIZO, R.M.; MUNHOZ, M.A.G.; GUSHIKEN, E.Y.; MANOEL, J.A.G. & NIERO, L.I. THE ANAEMIA FREQUENCY AMONG ELDERLY. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53:(1/2):71-75, 1993.

ABSTRACT. A three-year-old retrospective study was performed based upon the hemoglobin values of sixty-year-old and over males and females. These patients were a hended at the Adolfo Lutz, Central Institute, during the period of 1990 to 1992.

From 2,497 determinations obtained, 1,665 were females and 832 males. The hemoglobin values were studied in order to determine the profile of anemics. The males showed more frequently anaemia than the females, 19,83% and 10,09%, respectively. In relation to the age factor, the ones over eighty years old showed a larger frequency of the disease, 18,74%.

The frequency of anaemia found was 13,34% in relation to all cases studied.

DESCRIPTORS: elderly, anaemia, hemoglobin, hematology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JOOSTEN, E.; PELEMANS, W.; HIELE, M.; NOYEN, J.; VERHAEGHE, R. & BOOGAERTS, M.A. Prevalence and causes of anaemia in a geriatric hospitalized population. *Gerontology* 38:111-117, 1992.
2. KOSOWER, N.S.; Altered properties of erythrocytes in a aged. *Am. J. Hematol.* 42:241-247, 1993.
3. LITVAK, J. & MAGGIS, S. Aging. *Infect Dis. Clin. North. Am.* 5(2): 353-363, 1991.
4. MANSOURI, A. & LIPSCHITZ, D.A. Anemia in the elderly patient. *Med. Clin. North Am.* 76(3):619, 1992.
5. SALIVE, M.E.; HUNTLEY, J.C.; GURALNIK, J.M.; PHILLIPS, C.L.; WALLACE, R.B.; OSTFELD, A.M. & COHEN, H.J. Anaemia and hemoglobin levels in older persons: relationship with age, gender, and health status. *J. Am. Geriatric. Soc.* 40: 489-496, 1992.
6. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Serie de informes tecnicos. Numero 503. Anemias Nutricionales. 1972.
7. SALGADO, M.A. O significado da velhice no Brasil: uma imagem na realidade latino-americana. *An. Bras. Geri. Gerontol.* 4(1):11-16, 1982.
8. TIMIRAS, M.L. & BROWNSTEIN, H. Prevalence of anemia and correlation of hemoglobin with age in a geriatric screening clinic population. *J. Am. Geriatr. Soc.* 35:639-643, 1987.
9. ZAUBER, N.P. & ZAUBER, A.G. Hematology data of healthy very old people. *JAMA* 257(16):2181-2184, 1987.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing and controlling iron deficiency anaemia through primary health care. A guide for health administration and programme managers. DeMaeyer, *E.M.* 26, 1989.
11. MILNE, J.S. & WILLIAMSON, J. Hemoglobin, hematocrit, leukocyte count, blood grouping in older people. *Geriatrics* 59:118-126, 1972.
12. PARASURAMALU, B.G.; VASTRAD, S.A. & SHIVARAN, C. Prevalence of anaemia in the aged population in selected slums of HUBLI City. *Indian J. Public Health vol. XXXIII*(2): 117-118, 1990.
13. LIPSCHITZ, D.A.; UDUPA, K.B.; MILTON, K.Y. & THOMPSON, C.O. Effect of age on hematopoiesis in man. *Blood* 63(3):502-509, 1984.
14. HAWKINS, W. W.; SPECK, E. & LEONARD, V.G. Variation of the hemoglobin level with age and sex. *Blood* 9:999-1007, 1954.
15. LIPSCHITZ, D.A. The anemia of chronic disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* 38: 1258-1264, 1990.
16. NAFZIGER, J.; PAILLA, K.; LUCIANI, L.; ANDREUX, J.P.; SAINT-JEAN, O. & CASADEVALL, N. Decreased erythropoietin responsiveness to iron deficiency anemia in the elderly. *Am. J. Hematol.* 43:172-176, 1993.
17. ALEXANIAN, R. Erythropoietin and Erythropoiesis in anemic man following androgens. *Blood* 33(4):564-572, 1969.
18. DIXON, W.J. & MASSEY JR. F.J. *Introduction to Statistical Analysis*. McGraw-Hill, Inc. New York. 4th Ed., 1983.

Recebido para publicação em 22 de outubro de 1993.

QUANTIFICAÇÃO DO ASPARTAME POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAR) EM PÓS PARA O PREPARO DE SOBREMESAS*

Rejane W. ABREU**
Irani R. OLIVEIRA**
Odair ZENEON**

RIALA6/751

ABREU, R.W.; OLIVEIRA, I.R. & ZENEON, O. - Quantificação de aspartame por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) em pós para o preparo de sobremesas, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53 (1/2):77-80, 1993.

RESUMO: Foram analisadas para a determinação do aspartame 72 amostras de mistura em pó para o preparo de sobremesas dietéticas, gelatinas, pudins e flans, de vários sabores e marcas, comercializadas pelas indústrias nacionais, utilizando-se o método da cromatografia líquida de alta resolução (CLAR), com grau de recuperação do aspartame entre 96-97%. Todas as amostras analisadas apresentaram teores de aspartame dentro do limite estabelecido pela legislação em vigor, isto é, 75 mg por 100 g do produto a ser consumido.

DESCRITORES: alimentos dietéticos, determinação de aspartame; aspartame; cromatografia líquida de alta resolução.

INTRODUÇÃO

O aspartame, éster metílico do dipeptídeo L-aspartil-L-fenilalanina, é um edulcorante permitido pela legislação brasileira utilizado em vários tipos de alimentos dietéticos, por apresentar poder adoçante de 180 a 200 vezes maior que o da sacarose e por não ocasionar sabor residual amargo^{1,4}. Estudos metabólicos têm mostrado que o aspartame é digerido e transformado pelas mesmas vias bioquímicas das proteínas, produzindo valor calórico de 4 kcal/g e funcionando efetivamente como dietético, para adoçar alimentos e bebidas.

A utilização do aspartame em alimentos exige cuidados tecnológicos, pois sob certas condições de umidade, temperatura e pH, a ligação éster é hidrolisada, formando o dicetopiperazina, a aspartilfenilalanina, o aspartato e a fenilalanina, que não têm o sabor doce.

Recentemente, o mercado nacional foi invadido por inúmeros produtos à base de pós para o preparo de sobremesas de gelatina, flans e pudins contendo aspartame, como alternativa para a população de diabéticos e obesos. Com isto, o laboratório de Saúde Pública teve de enfrentar o desafio de estabelecer técnicas analíticas para controlar estes produtos, frente à legislação em vigor¹.

A determinação do aspartame em alimentos é complexa, tanto pela grande diversificação das formulações como pela dificuldade analítica, devida aos interferentes constituintes do produto. Na literatura, há vários métodos colorimétricos^{3, 7}. O método que utiliza ninidrina como reagente para desenvolver cor, sofre interferência de aminoácidos contendo o grupo $1 : \alpha$ - amino livre⁶. Os únicos métodos considerados mais seletivos para a determinação de aspartame em alimentos, fundamentam-se na cromatografia líquida de alta resolução (CLAR)^{2, 5}.

* Realizado na Seção de Doces e Amiláceos da Divisão de Bromatologia e Química do I.A.L.

** Do Instituto Adolfo Lutz

Os objetivos deste trabalho foram avaliar os teores de aspartame em várias misturas em pó para o preparo de sobremesas dietéticas de gelatina, de pudins e flans, de vários sabores, por cromatografia líquida de alta resolução; verificar, através da detecção do composto químico dicetopiperazina, se a tecnologia de fabricação dos produtos que utilizam o aspartame foi adequada.

MATERIAIS E MÉTODO

Foram analisadas 72 amostras de produtos dietéticos referentes a pós para o preparo de sobremesas, que tinham em sua composição o edulcorante aspartame, comercializadas por várias indústrias nacionais, assim distribuídas: 40 amostras para o preparo de gelatina, de doze diferentes sabores; 28 para o preparo de pudim, com sete diferentes sabores e quatro para o preparo de flan, com dois sabores distintos.

O aspartame foi quantificado por cromatografia líquida de alta resolução, com cromatógrafo Waters, mod. 510 e 484, equipado com detector ultravioleta e coluna Waters - 10 μ m Bondapak C-18, 4,6 mm x 25 cm, utilizando as seguintes condições experimentais:

Deteção - μ Y, 200 nm
Fluxo - 2 μ l'/min.
Volume - 20 μ l'

Fase móvel - Preparar solução de fosfato de sódio monobásico 0,0125M. Ajustar o pH da solução a 3,5 com ácido fosfórico p.a. Transferir 900 ml desta solução para um balão volumétrico de 1000 ml e adicionar 100 ml de acetonitrilo grau HPLC. Filtrar a solução através de membrana 0,4 nm.

Solução-padrão de aspartame - Pesar 140 mg de aspartame p.a. e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml com 70 ml de metanol grau HPLC. Dissolver com ultra-som por 15 minutos e completar o volume com o mesmo solvente. Transferir 10 ml desta solução para outro balão volumétrico de 100 ml com 70 ml de metanol grau HPLC. Dissolver com ultrassom por 15 minutos e completar o volume com o mesmo solvente. Transferir 10 ml desta solução para outro balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com metanol.

Preparação da amostra - Pesar uma quantidade da amostra que contenha cerca 14 mg de aspartame em um erlenmeyer de 125 ml. Adicionar 40 ml de metanol grau HPLC. Agitar por 15 minutos e dissolver com ultra-som pelo mesmo período de tempo. Decantar e transferir o sobrenadante para balão volumétrico de 100 ml. Repetir a operação de extração com metanol, transferir o sobrenadante e completar o volume com o mesmo solvente. Filtrar a solução através de membrana de 0,4 nm.

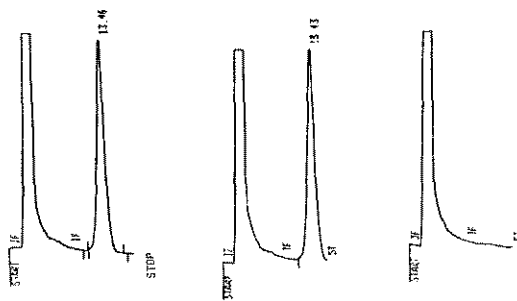
Preparação da prova em "branco" - Pesar uma quantidade da amostra em "branco", isto é, a mesma

matriz da amostra sem a presença do edulcorante, equivalente à quantidade da amostra submetida à análise, em um frasco erlenmeyer de 125 ml. Realizar o mesmo procedimento efetuado na preparação da amostra, descrito acima.

Procedimento analítico - Injetar 20 μ l da solução-padrão de aspartame no cromatógrafo ajustado às condições experimentais preestabelecidas. Efetuar esta operação três vezes consecutivas para verificar a reprodutibilidade do aparelho. Injetar 20 μ l da amostra previamente preparada. Fazer duas injeções de cada uma das amostras e uma do "branco". Injetar a solução-padrão no meio e no final de cada série de amostras, para verificar se o aparelho permanece nas mesmas condições experimentais de trabalho. Através das áreas dos picos registrados nos cromatogramas, calcular o teor de aspartame nas amostras analisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas das amostras analisadas mostraram pico no tempo de retenção médio de 13 minutos, correspondente ao aspartame e não revelaram picos correspondentes ao da dicetopiperazina, que teria um tempo de retenção médio de 7 minutos. Os cromatogramas referentes ao padrão branco e a uma das amostras analisadas, estão representados na figura abaixo.



Padrão de aspartame

Amostra

Branco

O teste de recuperação para o aspartame com o método analítico utilizado, foi de 96-97%, demonstrando sua adequação para a determinação do referido edulcorante em alimentos.

Os resultados dos teores de aspartame nas amostras analisadas estão expressos na tabela. De acordo com estes valores e conforme o modo de preparar a sobremesa, constante na rotulagem de produto, a quantidade de aspartame encontrada estava inferior a 75 mg/100 g do produto a ser consumido, estando, portanto, de acordo com as disposições legais em vigor.

CONCLUSÕES

TABELA

Teor de aspartame em pós para o preparo de sobremesas

Sobremesa	Amostra Sabor	Nº	Valor teórico	Valor experimental
			médio (%)	médio (%)
Gelatina	Morango	4	2,57	2,43
	Limão	6	2,54	2,47
	Framboesa	5	2,54	2,43
	Uva	5	2,54	2,46
	Tangerina	5	2,54	2,42
	Cereja	5	2,56	2,49
	Abacaxi	3	2,57	2,44
	Pêssego	1	2,55	2,52
	Laranja	1	2,50	2,36
	Tutti-frutti	3	2,54	2,44
	Groselha	1	2,50	2,35
	Salada de frutas	1	2,60	2,59
Pudim	Chocolate	6	1,16	1,11
	Morango	4	1,44	1,38
	Baunilha	6	1,38	1,29
	Coco	5	1,43	1,38
	Caramelo	5	1,29	1,21
	Leite condensado	1	0,95	0,94
	Leite	1	1,50	1,40
Flan	Baunilha	2	2,26	2,20
	Chocolate	2	2,26	2,16

O método utilizado para determinação de aspartame mostrou-se adequado para sua determinação em pós para o preparo de sobremesas de várias composições.

Todos os produtos analisados apresentaram quantidade de aspartame de acordo com a legislação em vigor.

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença de dicetopirazina, demonstrando que a tecnologia de fabricação e conservação dos produtos analisados foi adequada.

AGRADECIMENTO

Ao laboratório de controle de qualidade da Nutrasweet - Divisão de Monsanto Ltda. e à sua equipe técnica, pela colaboração na parte experimental do trabalho.

RIALA6/751

ABREU, R.W.; OLIVEIRA, I.R. & ZENEBO, O. - Determination of aspartame in dry mix to prepare desserts. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53 (1/2):77-80, 1993.

ABSTRACT: To determinate their aspartame contents were analysed 72 samples of dry mix products to prepare dietetic desserts, such as, gelatins, puddings and flans, of several flavors and marks, made by Brazilian industries. The analytical method used was high performance liquid chromatography (HPLC), which showed an average aspartame extraction of 96-97%.

The contents of aspartame in all samples analysed were according to the limits of Brazilian law.

DESCRIPTORS: dietetic foods, aspartame determination: aspartame; high performance liquid chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 04/88 do Conselho Nacional de Saúde. Diário Oficial, Brasília, 19 de dezembro de 1988. Seção I, pt. I, p. 24716. Aprova a revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais em alimentos.
2. FOX, L.; ANTHONY, G.D. & LAU, E.P.K. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59:1048, 1976.
3. GUVEN, K.C. & OZOL, T. - *Acta Pharm. Turc.* 26:28, 1984. *Anal. Abstr.*, 47:3F14, 1985.
4. HOMLER, B.E. - Aspartame: implications for the food scientist. In: STEGINK, L.D. & FILER, L.J. Jr., (ed.) - *Aspartame: physiology and biochemistry*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1984. p. 247-60.
5. ISSAQ, H.L.; WEISS, D.; RIDLON, C.; FOX, S.D. & MUSCHIK, G.M. - *J. Liq. Chromatogr.*, 9:1791, 1986.
6. LAU, O.W.; LUK, S.F. & CHAN, W.M. - Spectrophotometric determination of aspartame in soft drinks with ninhydrin as reagent. *Analyst*. 113:765-68, 1988.
7. OZOL, T. - *Acta Pharm. Turc.* 26:59, 1984. *Anal. Abstr.*, 1985. 47: 4E85.

Recebido para publicação em 07 de outubro de 1993.

INVESTIGAÇÃO E ISOLAMENTO DE *Leishmania*: CRIOPRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE BIÓPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EXPERIMENTAL

Maria de Fátima Leren de ARAUJO*
Rosângela Borges REINA*
Maria Cecília Outeiro GORLA*
Almir Venilton MONTEIRO*
José Eduardo TOLEZANO*

RIALA6/752

ARAUJO, M.F.L.; REINA, R.B.; GORLA, M.C.O.; MONTEIRO, A.V. & TOLEZANO, J.E. – Investigação e isolamento de *Leishmania*: criopreservação de amostras de biópsias de lesões cutâneas na Leishmaniose Tegumentar Experimental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):81-84, 1993.

RESUMO: Foi investigada a viabilidade do isolamento de *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* a partir da criopreservação, a -20°C , -70°C e -196°C , de amostras de biópsias de lesões cutâneas de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados. Biópsias de 2mm de diâmetro foram obtidas de lesões de patas de hamsters. Metade das biópsias foi acondicionada em tubos de poliestireno para congelamento, contendo 1,0ml de solução salina estéril e 0,1ml de glicerol. As amostras restantes foram, individualmente, maceradas em solução salina estéril e acondicionadas em alquotas de 1,0ml em tubos de poliestireno para congelamento, com 0,1ml de glicerol. Foram constituídos três grupos de tubos, que foram mantidos, inicialmente, por uma noite a 4°C , sendo transferidos sucessivamente para -20°C , -70°C e -196°C , que foram as temperaturas de manutenção, respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3, que assim permaneceram por um período de 60 dias. Após este período as amostras foram descongeladas e examinadas em esfregaços, culturas e inoculações desses materiais. Ambas as espécies de *Leishmania* sobreviveram na condição de manutenção estabelecida para o grupo 1, ou seja -20°C , tanto em biópsia como em homogenizado de macerado de biópsia. *L. (L.) amazonensis* sobreviveu, também, na condição de manutenção do grupo 3, a -196°C .

DESCRITORES: *Leishmania*, isolamento; *L. (V.) braziliensis*; *L. (L.) amazonensis*, Leishmaniose Tegumentar experimental; criopreservação, biópsias.

INTRODUÇÃO

Estudos recentes apontam, em todo o mundo, um total de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de aquisição de Leishmaniose, sendo estimado que 12 milhões estariam infectados por flagelados do gênero *Leishmania*¹².

No Brasil, são registrados anualmente cerca de 26.000 novos casos de Leishmaniose, consideradas todas as formas clínicas¹⁰.

No estado de São Paulo, são notificados, a cada ano, cerca de 400 novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A grande maioria

destes casos é autócone do próprio estado, porém, de diferentes regiões geográficas¹¹.

No estudo das leishmanioses grande destaque é dado à padronização dos procedimentos relacionados ao isolamento, à proliferação e à preservação de *Leishmania*.

O isolamento de *Leishmania*, de humanos, de reservatórios naturais ou fontes de infecção e de vetores, com a finalidade de identificação e classificação é sempre uma etapa importante para esclarecimento de aspectos relativos à epidemiologia da parasitose ou, mesmo, para a avaliação e prognós-

* Do Instituto Adolfo Lutz

tico clínico ou, ainda, para a definição de medidas de controle.

Ainda que vários pesquisadores tenham investigado e relatado diferentes metodologias para o isolamento e proliferação de *Leishmania*^{1, 2, 3, 4, 7, 8}, algumas etapas relacionadas a estas atividades permanecem a demandar definição de conduta.

Assim sendo, para a obtenção de crescimento primário de *Leishmania* fazem-se necessários a coleta, o acondicionamento, o transporte e o processamento do material biológico obtido de indivíduo suspeito de estar infectado pelo protozoário.

No estado de São Paulo, a busca pelo conhecimento dos flagelados do gênero *Leishmania* exige superação de um primeiro e grande obstáculo para isolamento desses agentes causais, obstáculo esse relativo às condições de acondicionamento para transporte de material biológico proveniente de pacientes das mais diferentes e distantes regiões, podendo decorrer, algumas vezes, vários dias desde a coleta da biópsia, na região endêmica, até o processamento laboratorial.

No presente trabalho procurou-se investigar, de maneira simples, uma solução para essa questão, estudando as condições mais propícias para o acondicionamento e a temperatura de manutenção, por longos períodos de tempo, de biópsias de lesões de patas de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados por *Leishmania*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação da condição mais adequada para o acondicionamento e a manutenção, por longo período de tempo, de material biológico destinado ao processamento visando o isolamento de *Leishmania*, foi definido um protocolo de pesquisa em que

biópsias, colhidas de lesões cutâneas de hamsters experimentalmente infectados com diferentes espécies do parasita ficaram mantidas em distintas temperaturas.

Biópsias de 2mm foram colhidas de lesões cutâneas de patas de hamsters (*M. auratus*), experimentalmente infectados com flagelados do gênero *Leishmania*, sendo *L. amazonensis* representante do subgênero *Leishmania*, e *L. braziliensis* pertencente ao subgênero *Viannia*.

Metade das biópsias colhidas foi acondicionada, separadamente, em flaconetes de poliestireno contendo 1,0ml de solução 0,85% NaCl estéril e 0,1ml de glicerol. O restante das biópsias foi macerado, individualmente, em solução 0,85% NaCl estéril e o homogeneizado foi acondicionado em alíquotas de 1,0ml em flaconetes contendo 0,1ml de glicerol.

Foram constituídos, então, três grupos com quatro flaconetes cada um, de forma que cada grupo conteve uma amostra de biópsia e uma amostra do homogeneizado de macerado de lesão cutânea para cada uma das espécies de *Leishmania* utilizadas no estudo.

Todos os grupos de flaconetes foram resfriados a 4°C por uma noite, sendo após transferidos para -20°C. O grupo 1 permaneceu por 60 dias nesta temperatura, enquanto que os grupos 2 e 3, após 24 horas, foram transferidos para -70°C.

O grupo 2 permaneceu por 60 dias nesta temperatura e o grupo 3, após 24 horas foi transferido para -196°C onde, também, permaneceu por 60 dias.

Após esse período, todas as amostras foram degeladas em banho-maria a 37°C e examinadas pela confecção de esfregaços, por semeadura em meio de NNN e por inoculações de parte destas amostras em hamsters.

TABELA 1

Viabilidade, cultivabilidade e infectividade de amostras de *leishmania* mantidas, por 60 dias, em diferentes temperaturas de congelamento, em biópsias ou em homogeneizados de macerado de lesões cutâneas de hamsters experimentalmente infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*.

Grupo experimental	<i>Leishmania</i> : L. (L.)	<i>amazonensis</i>	L. (V.)	<i>braziliensis</i>
	Biópsia	Homogeneizado de macerado	Biópsia	Homogeneizado de macerado
1 (-20° C)	E/C	E/C	C/I	C
2 (-70° C)	E	E	-	-
3 (-196° C)	E/C/I	E/C	-	-

E – Presença de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços realizados de amostras descongeladas.

C – Desenvolvimento e proliferação de formas promastigota de *Leishmania* em cultivos realizados a partir da semeadura de amostras descongeladas.

I – Inoculação positiva para *Leishmania* em hamsters, a partir de amostras descongeladas.

-- Ausência de *Leishmania* para qualquer um dos critérios utilizados.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

O crescimento primário de *Leishmania*, "in vivo" ou "in vitro", a partir de material biológico colhido de pacientes com LTA, se constituiu em importante etapa para o conhecimento de aspectos relacionados à epidemiologia da parasitose ou mesmo   avaliação clínica, entre outros^{2,3}.

No estado de São Paulo, onde anualmente são notificados cerca de 400 casos de LTA, o perfil epidemiológico é representado por focos restritos e casos esporádicos, porém, espalhados por todas as regiões geogr ficas⁶.

A tentativa de isolamento de *Leishmania* dos casos autóctones pelo Laboratório de Saúde Pública, situado na capital do Estado, esbarra em dificuldades relacionadas às distâncias e   pulverização das áreas end micas.

A execução de procedimentos para o isolamento de *Leishmania* em condições de campo, em áreas end micas, sofre limitações decisivas que determinam muitas vezes seu insucesso. No caso de culturas de material de biópsia de lesão cutânea esta limitação   devida a altas taxas de contaminação bacteriana e/ou fúngica; no que se refere às inoculações em animais de laboratório, o custo e à necessidade de uma estrutura mínima impossibilitam a descentralização deste procedimento⁷.

De outra parte, a criopreservação é, hoje, uma metodologia indispensável no estudo de protozoários parasitas⁸. No presente estudo procurou-se aproveitar as vantagens da criopreservação na tentativa de otimizar recuperação, o isolamento e a proliferação de *Leishmania* de materiais biológicos colhidos de animais infectados com o flagelado.

Os resultados obtidos indicaram a viabilidade de *Leishmania*, pertencentes aos subg neros *Leishmania* e *Viannia*, em biópsias ou homogeneizados de macerado de lesão cutânea de hamsters experimentalmente infectados, mesmo após um período de 60 dias, mantidos em condições de congelamento. (tabela).

No estado de São Paulo, assim como no restante da região sudeste do Brasil, acredita-se que a grande maioria dos casos de LTA é devida a *L. (V.) braziliensis*.

Neste trabalho, verificou-se, claramente, a possibilidade de isolamento deste parasita a partir do congelamento de biópsias de lesões cutâneas, ao menos à temperatura de -20 C; o que significa dizer, a utilização de um freezer doméstico para a manutenção de amostras de material biológico para posterior encaminhamento ao laboratório que procederá o isolamento de *Leishmania*.

Esses resultados remetem, também,   necessidade de novos estudos, para outras avaliações sobre condições de acondicionamento prolongado e transporte de material biológico destinado ao isolamento de *Leishmania*. Sobre as condições de coleta e transporte, Marzochi *et alii*², desenvolveram um sistema por punção aspirativa a vácuo para isolamento e cultivo *Leishmania*, que parece ser uma outra alternativa adequada para condições de trabalho de campo em áreas end micas.

Os autores acreditam, finalmente, ser importante a avaliação dos procedimentos aqui descritos em situações de manutenção e transporte de material biológico colhido de pacientes com LTA, em áreas end micas, para o isolamento de *Leishmania*.

RIALA6/752

ARAUJO, M.F.L.; REINA, R.B.; GORLA, M.C.O.; MONTEIRO, A.V. & TOLEZANO, J.E. – Investigation and isolation of *Leishmania*: cryopreservation of samples of biopsies from skin lesions in experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):81-84, 1993.

ABSTRACT: We investigated the viability of isolation of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* from cryopreserved, at -20 C, -70 C and -196 C, samples of biopsies of hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected. Biopsies with 2mm of diameter were obtained from feet lesions of hamsters. Half of the biopsies was conditioned in plastic freezing tubes containing 1.0ml of sterile salt solution and 0.1ml of glycerol. The rest was macerated in sterile salt solution and conditioned in aliquot of 1.0ml into plastic freezing tubes containing 0.1ml of glycerol. It was constituted, then, 3 groups, so that each group contained a biopsy or macerated sample belonging to the different *Leishmania* at the temperatures above mentioned. Every group were cooled at 4 C for overnight, then placed at -20 C for 24 hours, where stayed the group 1 for 60 days. The other plastic freezing groups were placed at -70 C for 24 hours where stayed the group 2 for 60 days, being the group 3 placed at -196 C where continued for 60 days too. After this period, the samples were thawed and examined from the smears, cultures and inoculation of these materials. The results obtained up to the present indicated the surviving and the cultivability of *L. (L.) amazonensis* at -20 C and -196 C and *L. (V.) braziliensis* at -20 C, both strains in macerated and fragment.

DESCRIPTORS: *Leishmania*, isolation, *L. (V.) braziliensis*; *L. (L.) amazonensis*; Experimental Cutaneous leishmaniasis; Cryopreservation, biopsies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, C.R. & MARZOCHI, M.C. de A. – Axenic culture's comparative study of six subspecies of *Leishmania* from the New and Old World in coconut water. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:81, 1987.
2. BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; JESUS, A.R.; MEDEIROS NETO, E.; SANTOS, J.A. & JOHNSON Jr., W. – The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesions. A simple approach for isolation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:579, 1987.
3. CUBA-CUBA, C.A.; NETTO, E.M.; COSTA, E.M.; COSTA, J.L.M.; BARRETO, A.C. & MARSDEN, P.D. – El cultivo "in vitro" como instrumento práctico para el diagnóstico y aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2. Estudios en pacientes de áreas endémicas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 28:317-324, 1986.
4. CUBA-CUBA, C.A.; NETTO, E.M.; MARSDEN, P.D.; ROSA, A.C.; CUENTAS, E.A.L. & COSTA, J.L.M. – Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80:456-457, 1986.
5. EVANS, D., ed. – *Handbook on isolation characterization and cryopreservation of Leishmania*.
6. GOMES, A.C. – Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *An. bras. dermatol.*, 67:55-60, 1992.
7. HENDRICKS, L.D. & WRIGHT, N. – Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by "in vitro" cultivation of saline aspirate in Schneider's *Drosophila* medium. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 28:962-964, 1979.
8. JAFFE, C.L.; GRIMALDI, G. & McMAHON – PRATT, D. – The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: MOREL, C.M., (ed.) *Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual*. UNDP/WORD BANK WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Funda o Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Brasil. p. 47-91, 1984.
9. JAMES, E.R. – Maintenance of Parasitic Protozoa by cryopreservation. In KIRSOP, B.E. & SNELL, J.J.S., (ed.) – *Maintenance of microorganisms*. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press, London, 1984. p. 161-177.
10. MARZOCHI, M.C. de A.; TELXEIRA, P.C.; MARZOCHI, K.B.F.; CONCEI O, N.F.; COUTINHO, W. & BRITO, D.B. – Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 35:301-303, 1993.
11. WANDERLEY, D.M.V.; GONZAGA, E.Z.S.; GALIMBERTI, M.Z.; TOLEZANO, J.E. & CORRÊA, F.M.A. – Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana. *Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Natal-RN, 1990.
12. WHO. Technical Report Series Control of leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee. *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.* 793:1-158.

Recebido para publica o em 10 de outubro de 1993.