

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

VOL. II • MAIO DE 1942 • NÚM. 1



AV. DR. ARNALDO, 3
SÃO PAULO - BRASIL

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é publicada sob a forma de fascículos, que serão reunidos em volume, e não tem data certa de aparecimento.

Será enviada, mediante solicitação, às instituições científicas interessadas, ou por permuta com publicações congêneres.

Toda a correspondência referente à Revista deve ser dirigida ao Diretor do Instituto Adolfo Lutz:

DR. J. P. DE CARVALHO LIMA

Avenida Dr. Arnaldo, 3

São Paulo — Brasil

DEPARTAMENTO DE SAUDE DO ESTADO DE
SÃO PAULO

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAUDE PÚBLICA

VOL. II

MAIO DE 1942

N.º 1



AVENIDA DR. ARNALDO, 3
SÃO PAULO — BRASIL

SUMÁRIO

	PÁGINA
LUIS DE SALES GOMES e F. BARROS MAGALDI JORDÃO — Suscetibilidade de <i>Cebus versuta</i> Elliot ao virus da poradenite inguinal	3
BRUNO RANGEL PESTANA e EMMA DE LIMA — Estudo comparativo da contagem de germes do leite em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado, e incubadas às temperaturas de 32 e 37°C.	18
AUGUSTO DE E. TAUNAY, MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA e GABRIEL GARCIA DE FIGUEIREDO — A reação de fixação do complemento no diagnóstico da amebiose	34
MANOEL DE BRITTO E SILVA — Surto epidêmico de mononucleose infectuosa	42
J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR — Do exame microscópico do guaraná em bromatologia	45
NELSON CAGNO — Sobre alguns aspéctos importantes do guaraná (<i>Paullinia cupana</i>). Estudo e caracterização do seu alcalóide	69
ARIOSTO BÜLLER SOUTO e OLÍVIA DE GODOY — Investigações sobre produtos de tomate	100

SUSCETIBILIDADE DE *CEBUS VERSUTA* ELLIOT AO VIRUS DA PORADENITE INGUINAL (*)

LUIS DE SALES GOMES

Chefe da Sub-divisão de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz

F. BARROS MAGALDI JORDÃO

Técnica de laboratório do Instituto Adolfo Lutz

A primeira referência à transmissão do vírus da poradenite inguinal a símios parece ter sido a de Bellard e Uribe¹, consubstanciada numa contribuição ao estudo da moléstia, apresentada ao IV Congresso Venezuelano de Medicina, reunido em 1925. Nesse trabalho, infelizmente pouco divulgado, os autores referem ter conseguido a reprodução experimental da linfogranulomatose inguinal em “macaco capuchinho” (*Cebus capuchinus*), duas semanas após a inoculação de puz inguinal humano na região prepucial do macaco.

Hellestrom e Wassen², alguns anos depois, anunciam o isolamento do vírus, conseguindo infectar, por via transcraniana, *Macacus rhesus* e *Macacus cynomolgus*.

A seguir, foi verificada, quer por inoculação prepucial quer intracraniana, a sensibilidade de numerosas outras espécies como sejam: *Macacus inuus*, *Cercocebus fuliginosus* e *Cynocephalus babuin*, por Levaditi e colaboradores³; *Cebus fatuellus* (capuchinho castanho), *Callithrix jacchus* (mico comum), *Cebus penicillata*, *Cercopithecus callithrix*, *Cebus capuchinus*, *Cebus chrysopus*, *Hapale penicillata* e *Erythrocebus patas*, por Findlay⁴; *Cercopithecus saebaeus*, por Caminopetros, Phylactos e Photakis⁵; *Troglodytes niger* (chipanzé), por Levaditi, Mollaret e Reinié⁶; *Macacus fuscatus*, por Miyagawa e colaboradores⁷.

Entre os diversos símios pertencentes ao gênero *Cebus* e existentes nas matas do Estado de São Paulo, um dos mais encontrados é

* Recebido para publicação em 24-2-1942.

sem dúvida *Cebus versuta* Elliot⁸; que, segundo a autorizada opinião de O. Pinto⁹, é a espécie comum das zonas setentrional e ocidental de S. Paulo, bem como da região oeste do Estado de Minas Gerais.



FIG. 1

Cebus versuta Elliot ♀ (n.º 1)

De captura relativamente fácil e, por isso, de aquisição pouco onerosa, pensámos na possibilidade de se prestar este símio ao fornecimento regular de antígeno poradênico para ser utilizado em reações intradérmicas (reação de Frei) para diagnóstico da moléstia de Nicolas-Favre em suas múltiplas manifestações.

De posse de um casal dessa espécie símia, que nos foi enviado da região norte do Estado, iniciámos nossas experiências orientadas no sentido de verificar sua suscetibilidade à moléstia. Para isso utilizámos como fonte de virus a amostra "Barc." isolada anteriormente por um de nós (L. S. Gomes)¹⁰ e que vinha sendo mantida por passagens em cérebro de camundongos brancos. A via de inoculação foi a intra-cerebral.

Os resultados dessas experiências são os seguintes:

INOCULAÇÃO DE VIRUS FORADÊNICO NO CÉREBRO DE
CEBUS VERSUTA ♀ (N.º 1)

Exemplar fêmea pesando 2.200 grs. (ver Fig. 1). Recebeu, intracerebralmente, 0,4 cc. de suspensão de cérebro de camundongo (4.^a passagem) diluído a 10% em soro fisiológico esteril e controlado, no momento, quanto à virulência (série de camundongos) e quanto à esterilidade para bactérias aeróbias e anaeróbias (meios de cultura).

Obs.

2.^o dia: A temperatura atingiu 40°C., tendo o animal rejeitado alimento, apresentando contudo certa vivacidade.

3.^o dia: Idem.

4.^o, 5.^o dias: Houve ligeira baixa térmica. O símio alimenta-se regularmente e mostra-se esperto.

6.^o, 7.^o e 8.^o dias: Temperatura alta, de novo, e oscilante entre 39,6 e 40,2 C.. Estado geral bom.

9.^o dia: Foi feita colheita de sangue venoso para pesquisa de virus circulante (Temp. 40°C.).

A temperatura continuou ainda alta, até o 15.^o dia, tendendo a normalizar-se durante alguns dias, após os quais elevou-se ainda a 39,8 para cair, depois, definitivamente na normal (Fig. 2).

Durante a infecção o macaco manteve-se sempre vivaz, acompanhando com o olhar os menores movimentos desenvolvidos à sua vizinhança. Nenhum esboço de paralisia nem de contratura muscular. Certo grau de inapetência e febre eram os únicos sinais de moléstia. Peso 25 dias após a inoculação — 1.700 grs. (deficit = 550 grs.).

Pesquisa de virus circulante — O sangue venoso colhido no 9.^o dia de infecção, depois de desfibrinado, foi testemunhado quanto à esterilidade para bactérias, e inoculado no cérebro de camon-

dongos brancos. Um primeiro grupo recebeu cerca de 0,02 cc. de sangue puro; o outro grupo recebeu a mesma quantidade de sangue diluído a 1:3 em sol. fisiológica. Todos os camondongos adoeceram 4 dias após a inoculação, tendo o exame histológico do cérebro dos que foram sacrificados demonstrado a existência de uma meningite monocitária discreta.

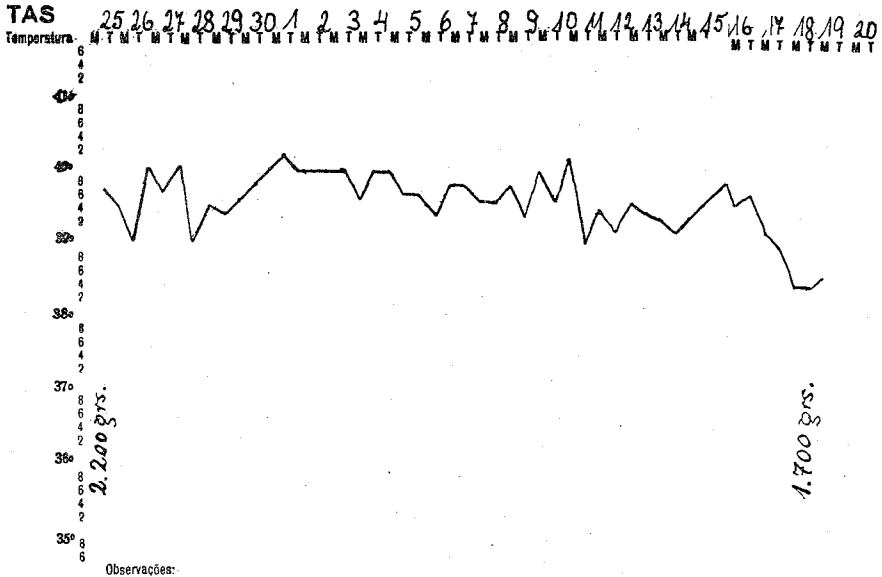


FIG. 2

Curva térmica de *Cebus versuta* n.º 1

Um outro camondongo do 2.º grupo, 50 dias após a inoculação, embora aparentemente são, apresentava ainda sinais histológicos de uma meningo-encefalite residual discreta (ver corte da Fig. 3).

Por outro lado, devemos esclarecer que esta amostra de vírus circulante não resistiu a mais de 3 passagens em série, tornando-se, na 4.ª, completamente avirulenta.

Do conjunto dessas observações verifica-se que o vírus poradênico circulou no símio experimentado, sendo a presença desse vírus revelada no sangue, por meio da inoculação deste em cérebros de camondongos brancos e por meio de passagens.

As lesões inflamatórias de tipo discreto encontradas nos camondongos, bem como a perda precoce de virulência nas passagens,

explicar-se-iam provavelmente pela carga mínima de vírus que os glóbulos brancos do sangue poderiam carregar, de acordo, aliás, com as conclusões de Levaditi, Ravaut, Lépine e Schoen¹¹, e de Levaditi e Reinié¹².

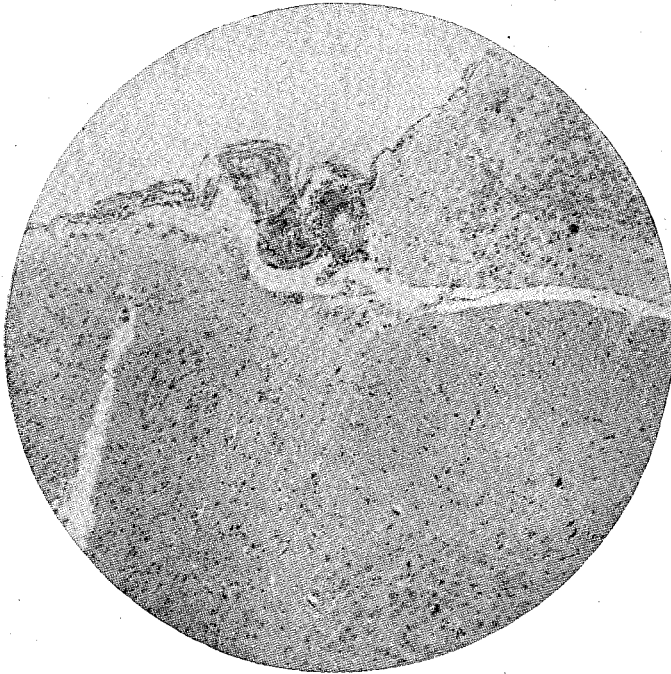


FIG. 3

Meningo-encefalite residual discreta, em camondongo inoculado com sangue de *Cebus versuta* n.º 1, e sacrificado 50 dias após a inoculação. 110 x

Vários são os tipos de infecção experimental por vírus poradênico, em macacos inoculados no cérebro: *agudo*, *sub-agudo* e *crônico*. Além destes, referem-se Levaditi e colaboradores (*op. cit.*) à forma *inaparente* na qual certos animais, embora infectados com amostra virulenta, não deixam transparecer nenhum sintoma patológico manifesto durante 30 ou 40 dias de observação. Mas, sacrificados ao fim deste tempo, mostram, entretanto, na massa encefálica, além de alterações típicas, abundante quantidade de vírus revelada pelo forte poder antigênico das suspensões cerebrais.

O tipo de infecção experimental que acabamos de ver em nosso *Cebus* 1, poderia ser classificado como um *tipo crônico-febril*: febre,

queda acentuada do peso e tempo de duração da moléstia, entre 3 e 4 semanas. Sobrevivência do animal.

INOCULAÇÃO DE VIRUS PORADÊNICO NO CÉREBRO DE
CEBUS VERSUTA ♂ (N.º 2)

O exemplar macho utilizado nesta segunda série de experiências é o que se acha representado na Fig. 4. Peso: 4.500 grs.. Recebeu no cérebro 0,4 cc. de suspensão de cérebro de camondongo (36.^a passagem), diluído a 10% em soro fisiológico e controlado, no momento, quanto à virulência — em série de 6 camondongos, e quanto à esterilidade para bactérias — em meios comuns de cultura.

Devemos anotar que a amostra "Barc.", de vírus poradênico, embora já em 36.^a passagem, encontrava-se em ótimas condições de virulência, o que se poderá verificar da ficha representada na Fig. 5. E perfeitamente virulenta ela ainda se mantém até o momento em que escrevemos este trabalho (60.^a passagem).

Após a inoculação, apresentou o *Cebus* 2, em resumo, a seguinte sintomatologia infecciosa:

Obs.

2.^o dia: Pouca mobilidade, tristeza, cabeça abaixada até à proximidade do plano horizontal inferior da gaiola. Rejeitou alimento. Temp. máx. 39^o,4C..

3.^o dia: Comeu duas bananas. Continua com a cabeça abaixada e sente tremores. Hemiplegia esquerda.

4.^o dia: Manifesta fome, mas tem dificuldade de abrir a boca para tomar o alimento.

5.^o dia: O animal não se mantém mais sentado; está sempre deitado. Apresenta, de espaço a espaço, nos músculos ainda ativos, fortes contraturas. Os maxilares continuam serrados. Foi sangrado na veia safena e o sangue, posteriormente, inoculado em 6 camondongos.

7.^o dia: Mesma atitude do dia anterior. Fotografia (ver fig. 6)

9.^o dia: Baixa brusca da temperatura, a 35^o,5C. e morte. Peso: 2.500 grs. (deficit no peso = 2.000 grs.).

Durante a infecção a temperatura oscilou entre 38^o,4C. e 39^o,2C., descendo lentamente até a véspera da morte, quando então baixou bruscamente a 35^oC. (ver quadro térmico da Fig. 7).

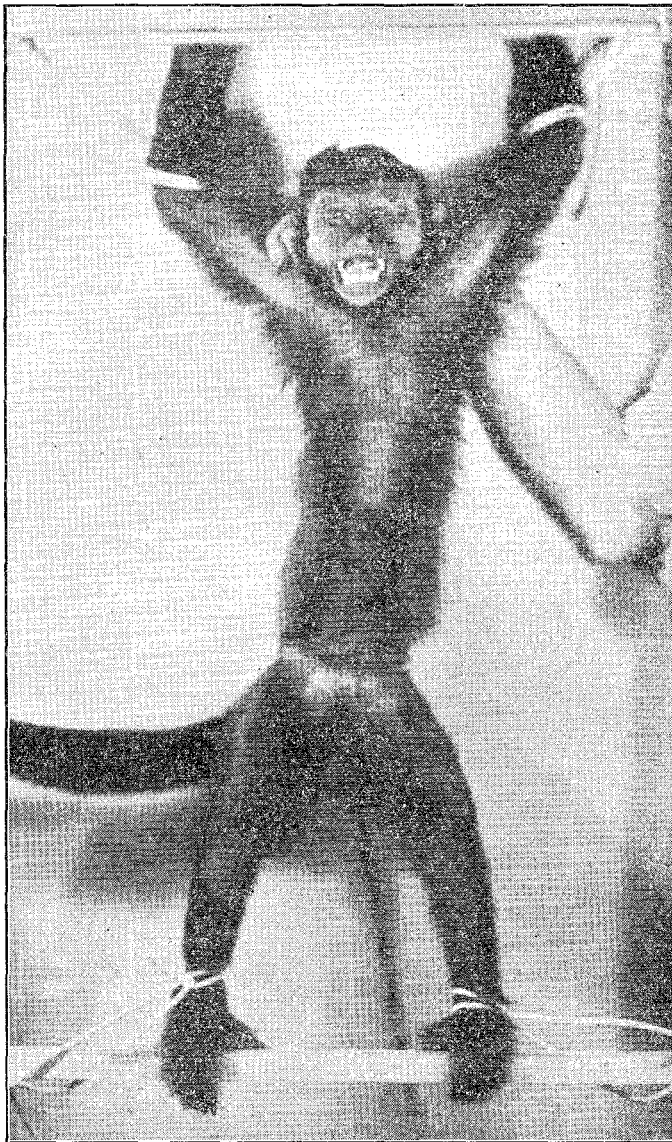


FIG. 4

Cebus versuta Elliot ♂ (n.º 2)

Praticamente, pode-se dizer que não houve febre, pois, segundo verificações por nós feitas, em macacos desta espécie e em *rhesus*, a temperatura retal normal oscila entre 38º e 39º,2 C..

A infecção desenvolvida em *Cebus* 2, como se vê, enquadra-se no chamado tipo agudo que é o mais habitual da forma meningo-encefálica.

À necrópsia foram colhidos fragmentos de órgãos e, com as possíveis precauções de assepsia, toda a massa encefálica para ser utilizada na preparação de suspensões virulentas para passagens, na preparação de antígenos e na de cortes histológicos. Os resultados dessas provas e exames serão adiante relatados.

Pesquisa de virus circulante — Como no símio anterior, neste também foi comprovada a existência do virus circulante. Esta comprovação foi feita pela inoculação de sangue colhido durante a moléstia, em série de camondongos.

Não deixa de ser interessante o fato de se poder surpreender o virus em circulação, mesmo quando o animal não acusa hipertermia, como é o caso deste segundo *Cebus*. Aliás, essa dispersão do virus no organismo correria por conta (segundo a opinião já citada de Levaditi e Reinié) dos glóbulos brancos do sangue.

Mas, tal como se déra com a amostra circulante do *Cebus* 1, a presente amostra também degenerou, não resistindo a mais de 3 passagens.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SECCÃO DE VIRUS

MATERIAL INOC.	Virus poradênico
PROCEDÊNCIA	"Barc." - Sta. Casa
LOTE DE CAMONDONGOS	
N.º DE CAMONDONGOS INOC.	6
N.º DE PASSAGENS	36a.
DATA DA INOCULAÇÃO	16-2-41
OBSERVAÇÕES	

Cam	Data																				Cult.	Observações
	Dias																					
1				S																		
2				DS																		
3				DDD+																		
4				DDDD+																		
5				DDDD+																		
6				DDDD+																		

+ = Morto, D = Doente, M = Moribundo, S = Sacrificado, N = Normal fim observ.

Fig. 5

Ficha mostrando a atividade do virus poradênico (amostra Barc.) num lote de 6 camondongos (36.ª passagem).

Prova de virulência do cérebro — Suspensão de cérebro do *Cebus 2*, foi inoculada em série de 6 camundongos, tendo estes apresentado, alguns dias depois, sinais de moléstias e, ao exame histológico do cérebro, meningo-encefalite.



FIG. 6

Cebus versute n.º 2, 7 dias após a inoculação do vírus poradênico de passagem. Paralisação do lado esquerdo.

Esta amostra “Barc.-Cebus” vem sendo mantida em camundongos até a presente data, estando já na 25.^a passagem e em condições de ótima virulência.

Prova da ação antigênica do cérebro — O antígeno de cérebro de *Cebus 2*, preparado segundo a técnica comum (suspensão a 20% e a 10% em sol. fisiológica e inativação a 60° C., durante 1 hora, dois dias), foi largamente usado em intradermo reações de Frei, em casos de poradenite inguinal e de retite estenosante poradênica, paralelamente comparado com antígenos preparados com puz inguinal humano.

A equivalência de um e outro antígenos na positividade das reações diz bem claro da presença e da multiplicação do vírus no cérebro do macaco.

Na fotografia da Fig. 8 pode-se confrontar a ação dos dois antígenos (de *Cebus* 2 e humano), num caso de linfogranulomatose de Nicolas-Favre. Vê-se aí que o antígeno símio (b) deu reação intradérmica tão fortemente positiva quanto o antígeno humano (a).

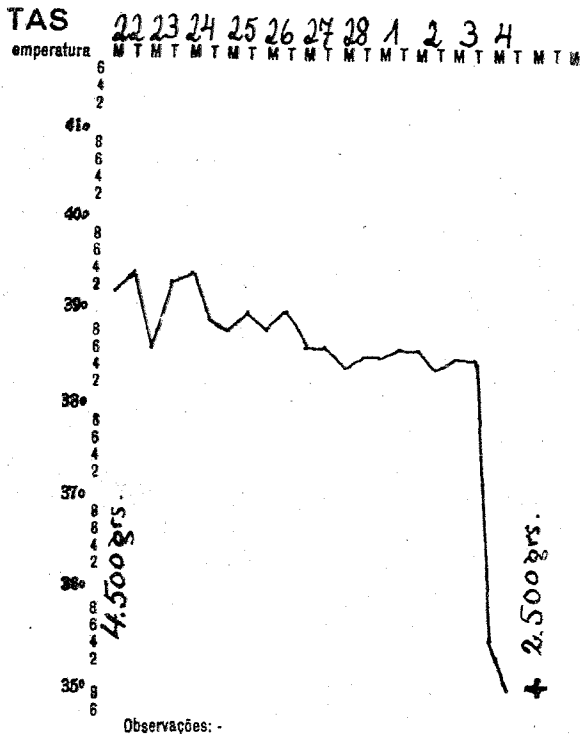


FIG. 7

Curva térmica de *Cebus versuta* n.º 2

Exames histo-patológicos — Durante o exame necroscópico que se seguiu à morte do animal, colhemos, com as cautelas possíveis de assepsia, toda a massa encefálica para exames histológicos e para preparação de antígeno. Ainda para exames histológicos, retiramos pequenos fragmentos de cada um dos demais órgãos do animal.

A Fig. 9 representa a microfotografia de um corte de cérebro deste macaco, podendo-se verificar nele a existência de *meningite intensa, cortical e septal, além de focos discretos de encefalite*.

Alterações importantes foram também notadas nos cortes de rim, alterações estas consubstanciadas numa *glomerulo-nefrite aguda*

conforme se verifica da microfotografia representada na Fig. 10. Estas lesões renais merecem aqui um registo especial, porquanto não as vimos ainda assinaladas nos autores que têm se ocupado com o estudo experimental deste virus, e cujas publicações se acham ao alcance das nossas vistas.

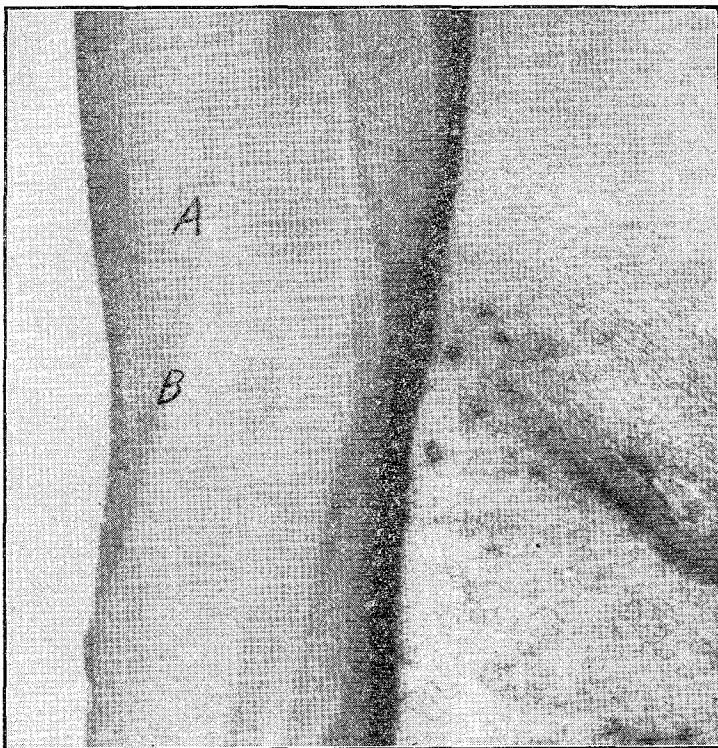


FIG. 8

Reações de Frei positivas, obtidas com antígeno humano (A) e com antígeno cerebral de *Cebus versuta* n.º 2 (B), em doente de 4.^a moléstia venérea.

Nos cortes dos demais órgãos nada digno de nota foi encontrado.

Somos muito gratos pelas atenções dispensadas às nossas consultas, aos distintos colegas Dr. Olivério Pinto, Ilustre diretor do Depart. de Zoologia, da Secretaria da Agricultura de S. Paulo, e Dr. João Montenegro, digno chefe da secção de anatomia patológica do Instituto Adolfo Lutz.



FIG. 9

Corte de cérebro de *Cebus versuta* n.º 2. Meningite intensa, cortical e septal. Focos discretos de encefalite. 110 x

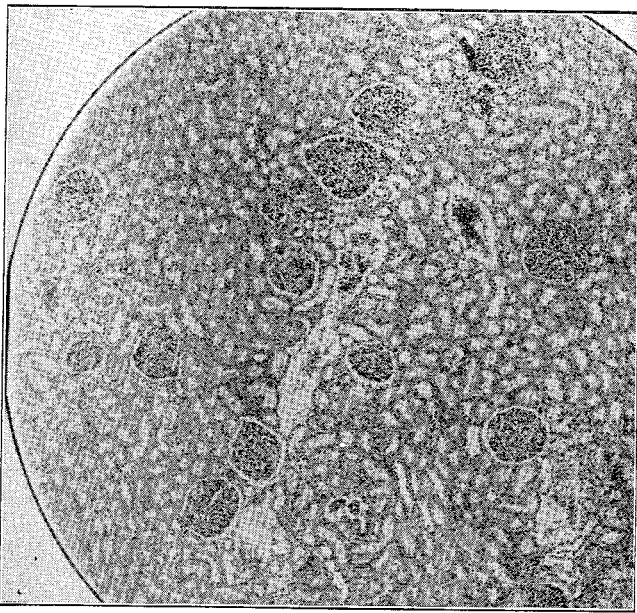


FIG. 10

Corte de rim de *Cebus versuta* n.º 2. Glomerulo-nefrite aguda. 110 x

RESUMO

Depois de reverem, ligeiramente, vários gêneros e espécies de macacos sensíveis ao vírus da poradenite inguinal (Moléstia de Nicolas-Favre), fazem os A. A. uma série de experiências e pesquisas no sentido de demonstrar a suscetibilidade ao referido vírus, de uma espécie símia comum nas zonas norte e ocidental do Estado de S. Paulo: *Cebus versuta* Elliot.

Dois macacos desta espécie (♀ e ♂), inoculados intra-cerebralmente com vírus poradênico de passagem em camondongo, apresentaram tipos de infecção diversos:

1.º — *Cebus versuta* ♀. Febre e perda de peso foram os únicos sintomas de infecção. A febre durou cerca de 25 dias, após os quais o macaco sarou. Este tipo infeccioso poderia talvez ser classificado como *crônico-febril*.

No 9.º dia da moléstia (temp. 40°C.) foi sangrado na veia sendo demonstrada a presença de vírus circulante, por meio de inoculação deste sangue em cérebro de camondongos. O vírus do sangue manteve-se ativo durante 3 passagens, degenerando depois.

2.º — *Cebus versuta* ♂. Apresentou um tipo infeccioso agudo, acompanhado de paralisias, de grande perda de peso e de morte no 9.º dia. No sangue deste exemplar foi demonstrada, também a presença de vírus circulante, até 3.ª passagem em camondongo.

O cérebro mostrou-se virulento para camondongos e, em suspensão antigênica morta, deu reações de Frei positivas em doentes de poradenite inguinal e de retite estenosante.

Cortes de cérebro deste macaco demonstraram a existência de meningite intensa, cortical e septal, além de focos discretos de encefalite.

Cortes de rim mostraram a presença de glomérulo-nefrite aguda. Os A. A. chamam a atenção para este ataque do vírus ao rim, fato que parece não ter sido ainda assinalado em infecções experimentais com este vírus.

SUMMARY

After a quick review of the several genuses and species of monkeys susceptible to infections by the virus of the inguinal paradenitis (disease of Nicolas-Favre) the A. A. carried on a series of experiments and researches in order to show the susceptibility to such virus infection by a species of monkey commonly found in the Occidental and Northern zones of the State of S. Paulo (Brazil), the so-called *Cebus versuta* Elliot.

Two monkeys of such species (♀ and ♂) when inoculated by the intra-cerebral route with the paradenitis virus obtained from man through serial intra-cerebral inoculation in mice, presented different types of infection.

1.º — *Cebus versuta* ♀. The only symptom was fever and loss of weight. The fever lasted about 25 days after which the monkey got well. This type of infection might perhaps be classified as *chronic febrile*.

In the 9th day of disease (temp. 40°C.) it was bled from the vein and the virus was demonstrated in the circulating blood by intra-craneal inoculations in mice. The blood virus kept its power to the third inoculation series thereafter losing the disease producing properties.

2.º — *Cebus versuta* ♂, had an acute type of infection followed by paralysis, great loss of weight and death in the 9th day. In the blood of this specimen the presence of the virus was also demonstrated.

The brain of this monkey inoculated in mice produced the disease and the dead antigenic suspensions of the same material gave positive Frei reaction in patients with inguinal paradenitis and stenosing rectitis.

Microscopical sections of the brain of this monkey showed heavy meningitis both cortical and septal, besides discrete encephalitis foci.

In the kidneys was found an acute glomerulo-nephritis. The A. A. call attention to the kidney lesions caused by the virus, a fact, they think, so far not mentioned in experimental work with such virus.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BELLARD e URIBE — 1925, *Apud Findlay* (Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 27 (35) June 1933).
- 2 — HELLERSTROM, S. e WASSEN, E. — 1930, 7.º Congr. Int. Derm. Syph. Copenhage, Agosto.
- 3 — LEVADITI e COLAB. — 1932, *Ann. Inst. Pasteur*, 48 (27).
- 4 — FINDLAY, G. M. 1932, *The Lancet*, 2 (11).
1933, *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.*, 27 (35) June.
- 5 — CAMINOPETROS, PHYLACTOS e PHOTAKIS — 1932, *C. R. Soc. Biol.*, CX (445).
- 6 — LEVADITI, MOLLARET e REINIÉ — 1935, *Bull. Ac. Med.*, 113 (439).
- 7 — MIYAGAWA, Y. e COLAB. — 1935, *Jap. Journ. of Exp. Med.*, 13 (1).
- 8 — ELLIOT — 1910, *Ann. Mag. Nat. Hist.*, V (77) 8th Fev.
- 9 — PINTO, OLIVERIO — 1941, "Fapeis avulsos" do Dep. Zool. Secr. Agric. S. Paulo, 1 art. 15 (111) Março.
- 10 — S. GOMES, LUIS DE — 1940, *Brasil Médico*, Ano LIV, n.º 47 (777) Nov. 1940, *Rev. da Ass. Paulista de Med.*, XVII, n.º 4 (33) Outubro.
- 11 — LEVADITI, RAVAUT, LÉPINE e SCHOEN — 1931, *C. R. Soc. Biol.*, 107 (959).
- 12 — LEVADITI e REINIÉ — 1933, *C. R. Soc. Biol.*, 118 (123).

ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DE GERMES DO LEITE EM PLACAS DE AGAR "STANDARD" E AGAR-LEITE-TRIPTONA-GLICOSADO, E INCUBADAS ÀS TEMPERATURAS DE 32 e 37°C. (*)

BRUNO RANGEL PESTANA

Chefe da Sub-divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz

EMMA DE LIMA

Técnica de laboratório do Instituto Adolfo Lutz

O leite, sendo um alimento completo e, como tal, insubstituível em todas as fases da vida humana, deve merecer da parte dos sanitaristas grande atenção.

O exame bacteriológico é uma das principais, ou talvez a principal prova a que deve ser submetido o leite, afim de ser verificado o seu grau de pureza.

No exame bacteriológico, uma das partes principais tem sido a contagem do número de germes encontrados no leite, pois a maior ou menor quantidade deles poderá orientar sobre a qualidade do produto.

Essa questão é objeto de estudos muito cuidadosos.

Como é do conhecimento dos que se dedicam a esses estudos, a composição do meio de cultura e a temperatura de incubação são os dois fatores essenciais no exame bacteriológico do leite.

O presente trabalho visa demonstrar as vantagens do emprego de placas com agar-leite-triptona-glicosado na contagem de germes, e de temperatura mais adequada ao crescimento dos germes habituais constantes da flora láctea.

Esse estudo foi dividido em duas partes:

- 1º) Procurámos verificar o crescimento dos germes sob a *influência do meio (agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado)* incubado em temperaturas diferentes, 32 e 37°C.;

(*) Recebido para publicação em 12-3-42.

- 2º) Verificámos o crescimento dos germes sob a *influência da temperatura*, isto é, incubados a 32 e 37°C., em ambos os meios.

Estas observações foram conduzidas durante 5 meses. Relatamos aqui os primeiros resultados obtidos.

INFLUÊNCIA DO MEIO

Até 20 de Fevereiro de 1941, o meio de cultura empregado na secção de "Controles Biológicos", do Instituto Adolfo Lutz, para a contagem, em placas, do número de germes, era o agar "standard" ¹, meio esse adotado oficialmente e cuja fórmula é a seguinte:

Adicionar 3 gramas de extrato de carne, 5 gramas de peptona e 15 gramas de agar a 1.000 cc. de água destilada. Ferver até que todo o agar esteja dissolvido. Completar o volume perdido com água destilada. Ajustar a reação de tal modo que a leitura do pH depois da esterilização esteja entre 6,4 — 7,0.

Levar à temperatura de ebulição, agitando frequentemente, completar o volume perdido com água destilada e clarificar.

Distribuir em recipientes apropriados e esterilizar.

A substituição desse meio, porém, já vem sendo estudada desde algum tempo por diversos autores.

Como foi verificado, existem no leite certos germes que se desenvolvem muito pobremente no agar "standard" e produzem colônias de dimensões tão pequenas que se torna quasi impossível a sua contagem. No leite cru, essas colônias são dadas como pertencentes ao estreptococo. No leite pasteurizado, elas tanto podem pertencer ao estreptococo, que resiste à temperatura da pasteurização, como a germes esporulados, termófilos, facultativos ou obrigatórios.

Por outro lado, há também germes que não apresentam crescimento visível no agar "standard", mas que se acham em estado latente nas amostras de leite examinadas. Nessas condições, há grandes causas de erro na contagem dos germes das placas semeadas.

Safford e Stark ² demonstraram que a adição de leite desnatado ao agar "standard" aumenta o número de colônias da amostra de leite nele inoculado. Essa investigação veio confirmar o trabalho de Hiscox, Hoy, Lomax, Mattick e outros. Esse aumento chega a 17%. A adição de glicose ao mesmo meio eleva esse aumento a 35%.

Em 1935, Breed ³, estudando esse assunto, menciona 2 fórmulas de agar para a substituição do agar "standard":

- 1º) Agar-leite-triptona-glicosado;
- 2º) Modificação inglesa do agar "standard". Ambas as fórmulas contêm leite crú.

Yale e Pederson ⁴, em 1936, procederam a uma série de exames de leite, tanto pasteurizado como crú, estudando-os sob o ponto de vista da temperatura de incubação e do meio de cultura utilizado.

Os meios empregados foram o agar "standard" e o agar-leite-triptona-glicosado, e as temperaturas variavam de 18 a 55°C.. Os autores obtiveram resultado mais favorável com o agar leite à temperatura de 32°C., ou pouco menos, sobre o agar "standard" nas mesmas condições.

No mesmo ano, Bowers e Hucker ⁵ publicaram minucioso trabalho sobre o mesmo assunto, estudando também a neopeptona em lugar da triptona. Esse estudo veio confirmar os seguintes pontos de seu trabalho ulterior:

- 1º) que o agar-triptona-glicosado é mais eficiente do que o agar "standard", para o exame bacteriológico do leite;
- 2º) que a adição de leite desnatado, a esse meio, aumenta o número de colônias; e, finalmente,
- 3º) que a triptona é 37% mais eficiente do que a neopeptona.

Yale ⁶, em 1938, apresentou em trabalho muito bem desenvolvido o resultado de 42 investigações feitas por 56 laboratórios, sobre 24.000 amostras de leite crú, pasteurizado, feitas comparativamente em agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado, às temperaturas de 32 e 37°C., terminando com as conclusões seguintes:

"No meio contendo triptona, as colônias são maiores do que no agar "standard", sendo assim contadas com mais facilidade, tanto por esse motivo como pela opacidade do meio".

Em 1939, Abele ⁷, justificando a modificação do meio de cultura empregado pelo "Standard Methods for Examination of Dairy products", apresenta substancial trabalho em que faz um estudo comparativo entre o agar-leite-triptona-glicosado (que designa por agar-T-G-E-M), o agar-peptona-dextrosado (agar-A-A-M-M-C) e o agar "standard" incubados a 32 e 37°C.. Estudou 335 amostras de leite e cremes (crús e pasteurizados).

Demonstra o autor a eficiência do T-G-E-M sobre os outros meios e a vantagem da incubação a 32°C..

TÉCNICA

Meios empregados — No presente trabalho empregámos o agar “standard”¹, já mencionado, e o agar-leite-triptona-glicosado, cuja fórmula é a seguinte⁸:

Agar	1,5%
Extrato de carne	0,3%
Triptona	0,5%
Glicose	0,1%
Água destilada	
pH preferível: 7,0. Antes da esterilização final adiciona-se 1% de leite desnatado.	

Amostras semeadas — Semeámos 398 amostras de leite pasteurizado, algumas entradas diretamente para exame bacteriológico e a maior parte para exame químico.

Contagem das placas — Para apresentação dos resultados, separámos as placas em 8 grupos:

- 1º) placas contáveis;
- 2º) placas incontáveis;
- 3º) placas contáveis em agar “standard”;
- 4º) placas contáveis em agar-leite-triptona-glicosado;
- 5º) placas contáveis a 32°C.;
- 6º) placas contáveis a 37°C.;
- 7º) placas contáveis em ambos os meios, e, finalmente,
- 8º) placas contáveis em ambas as temperaturas.

Diluições — Com as primeiras 79 amostras, empregámos diluições diferentes, a começar pela de 1/100 (sendo que essa diluição era utilizada apenas para as amostras de leite de granja).

Da 80.^a amostra por diante, fixamos a diluição de 1/10.000 para as semeaduras, por havermos verificado ser essa diluição a mais constante. As diluições eram feitas com água filtrada esterilizada, empregando-se uma pipeta para cada diluição.

Temperatura — Até a 79.^a amostra empregámos apenas a temperatura de 37º; daí por diante utilizámos as temperaturas de 37 e 32°C., comparativamente.

Tempo de incubação — A contagem era feita após 48 horas de incubação.

Resultado — Conforme se poderá verificar no quadro que se segue, a diferença na contagem do número de germes, nos 2 meios, já se faz notar a 37°C. e essa diferença se acentua ainda mais, quando estudamos comparativamente os 2 meios diferentes, incubados à temperatura de 32°C..

QUADRO I

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.
30	20-2-41	1/100.000	8.400.000	9.800.000
31	"	"	6.200.000	9.600.000
32	21-2-41	"	5.600.000	8.000.000
33	28-2-41	"	300.000	5.400.000
35	"	"	300.000	3.200.000
36	"	"	300.000	6.000.000
47	31-3-41	"	Incontavel	Incontavel
48	"	"	25.000.000	20.000.000
38	3-3-41	1/1.000	160.000	Incontavel
39	"	"	45.000	160.000
41	10-3-41	"	280.000	Incontavel
44	20-3-41	"	140.000	Incontavel
45	22-3-41	"	80.000	112.000
51	31-3-41	1/100	200	600
33	28-2-41	1/10.000	1.370.000	Incontavel
34	"	"	2.150.000	2.360.000
35	"	"	320.000	Incontavel
36	"	"	680.000	Incontavel
37	3-3-41	"	300.000	600.000
40	5-3-41	"	2.020.000	1.950.000
42	10-3-41	"	780.000	340.000
43	20-3-41	"	400.000	1.800.000
11	22-3-41	"	320.000	380.000
12	"	"	420.000	920.000
13	"	"	120.000	920.000
14	"	"	500.000	190.000
15	"	"	60.000	2.100.000
16	"	"	60.000	120.000
1	21-3-41	"	210.000	280.000
2	"	"	1.980.000	1.340.000
3	"	"	560.000	640.000
4	"	"	2.320.000	2.460.000
5	"	"	320.000	840.000
6	"	"	300.000	980.000

CONTAGEM DE GERMES DO LEITE

23

N.º	Data	Diluição	Agar "stan-	Agar - leite
			dard" n.º de germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.
7	21-3-41	1/10.000	60.000	900.000
8	"	"	Incontavel	Incontavel
9	"	"	150.000	540.000
10	"	"	Incontavel	Incontavel
46	22-3-41	"	140.000	150.000
17	24-3-41	"	Incontavel	Incontavel
18	"	"	300.000	700.000
19	"	"	10.000	340.000
20	"	"	500.000	490.000
21	"	"	210.000	230.000
22	"	"	Incontavel	Incontavel
23	26-3-41	"	150.000	940.000
24	"	"	2.500.000	Incontavel
25	"	"	90.000	540.000
26	"	"	150.000	380.000
27	"	"	580.000	580.000
28	"	"	380.000	Incontavel
29	27-3-41	"	30.000	40.000
30	"	"	200.000	440.000
31	"	"	450.000	580.000
32	"	"	80.000	140.000
33	"	"	30.000	10.000
34	"	"	140.000	120.000
35	28-3-41	"	Incontavel	Incontavel
36	"	"	700.000	900.000
37	"	"	440.000	500.000
38	"	"	Incontavel	Incontavel
39	"	"	2.200.000	2.900.000
40	"	"	800.000	1.000.000
41	29-3-41	"	2.600.000	2.750.000
42	"	"	170.000	30.000
43	"	"	Incontavel	Incontavel
44	"	"	460.000	340.000
45	"	"	Incontavel	Incontavel
46	"	"	Incontavel	Incontavel
49	31-3-41	"	1.500.000	1.450.000
50	"	"	50.000	500.000
52	"	"	1.500.000	1.400.000
53	2-4-41	"	Incontavel	Incontavel
54	"	"	300.000	800.000
55	"	"	Incontavel	Incontavel
56	"	"	80.000	120.000
57	"	"	Incontavel	Incontavel
58	"	"	60.000	80.000

Influência da temperatura — O método de contagem em placas, para o exame bacteriológico do leite, sendo um trabalho de rotina, exige estufas de grande capacidade e que mantenham uma temperatura uniforme e constante.

Conforme fizemos notar no início deste trabalho, a influência da temperatura foi o segundo ponto visado pelas nossas observações.

A temperatura que adotávamos para a incubação das placas semeadas no nosso serviço, de acordo com o método "standard", era a de 37°C..

A substituição dessa temperatura de incubação também vem sendo estudada por diversos autores, e alguns a estudaram juntamente com a substituição do meio de cultura.

Breed e Pederson⁹, de 1930-1931, submetem à prova as estufas comuns usadas para incubação.

Yale, Pederson e Breed¹⁰, estudando a uniformidade de temperatura exigida para o exame bacteriológico do leite, concluíram que:

"A variação da temperatura das estufas é uma das principais causas de erro na contagem de placas, procedida no trabalho rotineiro do "controle" de leite, pelo fato de estar a temperatura de 37°C. no limite máximo da temperatura de crescimento dos vários tipos de germes encontrados no leite".

Em 1934, Pederson e Yale¹¹, após experiências feitas com 78 amostras de leite, incubadas em temperaturas que variavam de 21 a 55°C., por 48 horas de incubação, chegaram às seguintes conclusões:

- 1º) A temperatura de 32°C. deve ser preferida à de 37°C. para a incubação das placas destinadas à contagem dos germes do leite;
- 2º) Com 48 horas de incubação a 32°C. obtem-se maior número de colônias do que a 37°C., resultando uma avaliação melhor da qualidade do leite;
- 3º) A 32°C. há menos erro na contagem do que a 37°C., devido à variação de temperatura da estufa;
- 4º) A porcentagem da contagem máxima, obtida em 48 horas, varia consideravelmente a 37°C., porém é perfeitamente constante a 32°C.

Ao experimentarmos o novo meio de cultura, adotamos sistematicamente a semeadura das placas em duplicata. Incubávamos uma série a 37°C. e outra a 32°C..

O resultado foi francamente satisfatório, quando empregamos a temperatura de 32°C., apresentando um crescimento mais favorável, conforme se pode ver nos quadros seguintes:

QUADRO II

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
110	18-4-41	1/10.000	400.000	900.000	3.000.000	Incontavel
111	"	"	240.000	300.000	1.000.000	1.300.000
115	"	"	470.000	740.000	1.200.000	1.700.000
119	"	"	1.040.000	1.270.000	2.870.000	Incontavel
120	"	"	300.000	1.050.000	Incontavel	Incontavel
121	19-4-41	"	1.380.000	1.640.000	Incontavel	Incontavel
123	25-4-41	"	200.000	300.000	950.000	1.940.000
124	"	"	600.000	700.000	1.050.000	1.560.000
129	26-4-41	"	320.000	830.000	30.000	400.000
131	"	"	2.160.000	2.180.000	1.150.000	2.600.000
132	"	"	270.000	410.000	350.000	700.000
135	"	"	1.600.000	2.250.000	2.000.000	2.500.000
140	28-4-41	"	2.500.000	2.860.000	2.200.000	Incontavel
142	"	"	1.800.000	1.900.000	3.300.000	Incontavel
143	"	"	1.440.000	2.020.000	1.900.000	2.700.000
152	30-4-41	"	480.000	630.000	910.000	960.000
153	"	"	290.000	520.000	690.000	1.180.000
154	"	"	30.000	70.000	140.000	240.000
155	"	"	240.000	490.000	540.000	780.000
157	"	"	1.120.000	1.350.000	2.250.000	2.400.000
158	"	"	300.000	430.000	870.000	920.000
159	"	"	40.000	110.000	320.000	500.000
160	"	"	1.030.000	750.000	1.990.000	2.030.000
161	"	"	570.000	680.000	1.230.000	1.770.000
162	"	"	10.000	110.000	90.000	170.000
166	1-5-41	"	130.000	360.000	1.610.000	2.030.000
169	"	"	70.000	290.000	1.170.000	2.170.000
171	"	"	2.050.000	2.600.000	Incontavel	Incontavel
53	"	"	80.000	180.000	250.000	260.000
54	"	"	580.000	830.000	1.120.000	1.150.000
179	2-5-41	"	580.000	1.180.000	800.000	1.080.000
180	"	"	610.000	1.480.000	940.000	1.850.000
181	"	"	2.510.000	2.720.000	2.620.000	Incontavel
183	"	"	80.000	140.000	110.000	150.000
184	"	"	620.000	1.190.000	680.000	1.070.000
188	7-5-41	"	—	1.450.000	80.000	Incontavel

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.
59	3-4-41	1/10.000	50.000	460.000
60	"	"	120.000	560.000
61	"	"	280.000	800.000
62	"	"	80.000	220.000
63	"	"	80.000	800.000
64	"	"	40.000	60.000
66	4-4-41	"	280.000	340.000
67	"	"	2.900.000	3.000.000
68	"	"	2.800.000	2.600.000
69	"	"	200.000	460.000
70	"	"	420.000	360.000
71	"	"	Incontavel	Incontavel
72	5-4-41	"	60.000	430.000
73	"	"	300.000	780.000
74	"	"	320.000	400.000
75	"	"	140.000	540.000
76	"	"	200.000	140.000
77	"	"	360.000	600.000
48	"	"	300.000	800.000
78	7-4-41	"	2.700.000	2.600.000
79	"	"	300.000	300.000
80	"	"	Incontavel	Incontavel
81	"	"	Incontavel	Incontavel
83	"	"	1.500.000	1.800.000
84	9-4-41	"	30.000	60.000
85	"	"	400.000	1.200.000
86	"	"	2.300.000	2.600.000
88	"	"	2.800.000	3.000.000
92	15-4-41	"	2.990.000	3.180.000
94	"	"	460.000	500.000
95	"	"	2.540.000	2.580.000
96	"	"	Incontavel	Incontavel
97	16-4-41	"	220.000	670.000
98	"	"	480.000	840.000
100	"	"	580.000	630.000
101	"	"	Incontavel	Incontavel
103	17-4-41	"	Incontavel	Incontavel
104	"	"	Incontavel	Incontavel
105	"	"	Incontavel	Incontavel
106	"	"	90.000	220.000
107	"	"	Incontavel	Incontavel
108	"	"	310.000	440.000
109	"	"	50.000	50.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes por cc.	germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
189	7-5-41	1/10.000	160.000	1.100.000	480.000	1.860.000
190	"	"	80.000	470.000	300.000	1.200.000
191	"	"	950.000	1.700.000	Incontavel	Incontavel
192	"	"	30.000	1.800.000	480.000	1.200.000
193	"	"	700.000	1.400.000	1.200.000	Incontavel
194	"	"	120.000	1.320.000	580.000	Incontavel
198	8-5-41	"	1.270.000	1.580.000	1.940.000	2.240.000
201	"	"	270.000	900.000	400.000	880.000
202	"	"	670.000	1.480.000	Incontavel	Incontavel
203	"	"	1.630.000	1.800.000	1.700.000	2.200.000
204	"	"	2.220.000	2.540.000	2.200.000	3.000.000
206	"	"	1.320.000	2.090.000	Incontavel	Incontavel
208	"	"	2.840.000	3.300.000	Incontavel	Incontavel
56	"	"	130.000	293.000	240.000	580.000
209	9-5-41	"	1.500.000	1.700.000	Incontavel	Incontavel
210	"	"	800.000	650.000	700.000	1.200.000
211	"	"	300.000	550.000	600.000	800.000
213	"	"	60.000	600.000	300.000	720.000
215	"	"	350.000	120.000	200.000	400.000
217	"	"	140.000	400.000	300.000	600.000
219	"	"	130.000	620.000	80.000	380.000
220	"	"	110.000	980.000	120.000	980.000
222	14-5-41	"	60.000	280.000	Incontavel	Incontavel
225	"	"	340.000	2.900.000	640.000	700.000
227	"	"	720.000	1.290.000	Incontavel	Incontavel
228	14-5-41	"	2.890.000	Incontavel	Incontavel	Incontavel
229	"	"	1.200.000	1.800.000	Incontavel	Incontavel
60	"	"	320.000	500.000	Incontavel	Incontavel
230	16-5-41	"	120.000	400.000	100.000	420.000
231	"	"	800.000	900.000	1.370.000	1.580.000
232	"	"	1.600.000	2.000.000	1.450.000	2.100.000
237	"	"	400.000	500.000	1.200.000	1.280.000
240	"	"	1.800.000	1.600.000	2.100.000	3.000.000
61	"	"	100.000	110.000	60.000	150.000
243	17-5-41	"	70.000	120.000	70.000	250.000
244	"	"	260.000	120.000	300.000	750.000
246	"	"	850.000	800.000	350.000	980.000
249	"	"	80.000	100.000	100.000	300.000
250	"	"	340.000	350.000	610.000	880.000
251	"	"	550.000	500.000	1.080.000	1.200.000
252	"	"	1.200.000	1.550.000	2.250.000	3.000.000
253	"	"	550.000	570.000	90.000	1.200.000
254	18-5-41	"	1.650.000	1.700.000	2.200.000	2.580.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes	germes por cc.	n.º de germes
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
256	18-6-41	1/10.000	600.000	570.000	20.000	700.000
257	"	"	500.000	540.000	800.000	1.000.000
258	"	"	1.500.000	2.000.000	2.300.000	3.000.000
259	"	"	50.000	20.000	700.000	2.250.000
260	"	"	70.000	120.000	300.000	980.000
262	"	"	1.200.000	1.500.000	1.880.000	2.800.000
63	21-5-41	"	30.000	45.000	220.000	250.000
268	"	"	1.650.000	2.850.000	Incontavel	Incontavel
271	"	"	60.000	180.000	220.000	350.000
273	"	"	450.000	1.800.000	1.200.000	3.000.000
276	22-5-41	"	180.000	200.000	270.000	800.000
278	"	"	1.200.000	1.400.000	1.400.000	1.600.000
279	"	"	280.000	320.000	400.000	400.000
280	"	"	180.000	180.000	350.000	450.000
281	"	"	1.300.000	1.310.000	1.600.000	1.700.000
282	"	"	400.000	600.000	1.530.000	1.850.000
284	"	"	870.000	950.000	Incontavel	Incontavel
64	"	"	250.000	300.000	90.000	790.000

QUADRO III

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes	germes por cc.	n.º de germes
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
285	23-5-41	1/10.000	260.000	280.000	200.000	310.000
286	"	"	120.000	100.000	180.000	350.000
288	"	"	20.000	80.000	210.000	300.000
289	"	"	100.000	80.000	100.000	270.000
290	"	"	100.000	250.000	400.000	570.000
292	"	"	170.000	380.000	440.000	500.000
249	"	"	100.000	270.000	290.000	340.000
295	"	"	20.000	10.000	30.000	100.000
296	"	"	150.000	360.000	200.000	350.000
297	24-5-41	"	80.000	150.000	150.000	850.000
304	"	"	490.000	1.070.000	200.000	1.200.000
306	"	"	320.000	480.000	360.000	850.000
308	"	"	180.000	290.000	650.000	1.060.000
311	26-5-41	"	300.000	370.000	320.000	400.000
316	"	"	150.000	200.000	160.000	200.000
318	"	"	150.000	340.000	400.000	850.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes por cc.	germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
320	26-5-41	1/10.000	320.000	350.000	400.000	550.000
322	27-5-41	"	100.000	130.000	100.000	190.000
324	"	"	330.000	440.000	630.000	910.000
325	"	"	600.000	850.000	960.000	1.090.000
327	27-5-41	"	240.000	300.000	370.000	470.000
328	"	"	140.000	170.000	170.000	200.000
329	"	"	190.000	400.000	280.000	430.000
331	"	"	320.000	500.000	350.000	800.000
332	28-5-41	"	100.000	150.000	160.000	190.000
334	"	"	230.000	300.000	290.000	300.000
336	"	"	100.000	150.000	110.000	300.000
337	"	"	560.000	1.000.000	910.000	1.110.000
338	"	"	60.000	160.000	120.000	160.000
340	"	"	180.000	230.000	200.000	250.000
341	"	"	110.000	280.000	230.000	350.000
342	"	"	450.000	520.000	380.000	750.000
69	"	"	300.000	400.000	540.000	750.000
344	29-5-41	"	250.000	300.000	200.000	400.000
346	"	"	1.000.000	1.750.000	3.000.000	3.300.000
356	30-5-41	"	320.000	Incontavel	600.000	Incontavel
357	"	"	80.000	170.000	120.000	350.000
358	"	"	200.000	Incontavel	1.000.000	Incontavel
360	"	"	60.000	1.480.000	200.000	1.800.000
361	"	"	40.000	150.000	130.000	550.000
362	"	"	160.000	2.150.000	250.000	2.200.000
363	"	"	180.000	630.000	320.000	950.000
364	"	"	110.000	680.000	180.000	700.000
368	2-6-41	"	60.000	150.000	40.000	750.000
369	"	"	70.000	200.000	60.000	370.000
374	"	"	600.000	800.000	700.000	830.000
376	4-6-41	"	30.000	170.000	40.000	600.000
377	"	"	70.000	400.000	280.000	580.000
378	"	"	100.000	350.000	80.000	300.000
379	"	"	40.000	110.000	50.000	220.000
380	"	"	30.000	50.000	40.000	320.000
381	4-6-41	"	20.000	90.000	20.000	650.000
382	"	"	40.000	200.000	220.000	700.000
383	"	"	30.000	120.000	60.000	180.000
384	"	"	10.000	180.000	90.000	210.000
385	"	"	20.000	300.000	100.000	420.000
386	"	"	10.000	230.000	90.000	270.000
387	"	"	50.000	120.000	10.000	130.000
73	"	"	25.000	200.000	30.000	300.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
74	4-6-41	1/10.000	150.000	400.000	80.000	500.000
389	5-6-41	"	100.000	210.000	370.000	400.000
390	"	"	120.000	580.000	280.000	1.280.000
393	"	"	190.000	100.000	100.000	250.000
394	"	"	80.000	60.000	120.000	Incontável
398	"	"	250.000	300.000	980.000	1.500.000

Afim de podermos proceder ao estudo comparativo entre os dois meios e as duas temperaturas, seleccionámos as nossas placas do seguinte modo:

QUADRO IV

	32°C.	37°C.
N.º de placas incontáveis só no agar "standard"	0	1
N.º de placas incontáveis só no agar-leite	13	15
N.º de placas incontáveis em ambos os meios ...	73	71

QUADRO V

	A. "standard"	A. leite
N.º de placas incontáveis só a 32°C.	29	22
N.º de placas incontáveis só a 37°C.	4	1
N.º de placas incontáveis em ambas as temperat.	57	50

Média calculada entre os 2 meios (agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado), com a incubação das placas a 32 e 37°C.:

QUADRO VI

	32°C.	37°C.
	Placas contáveis nos dois meios = 222	Placas contáveis nos dois meios = 334
M_1 = n.º médio de col. no leite	782658 ± 47446 (erro padrão da média)	752844 ± 40147 (erro padrão da média)
M_{st} = n.º médio de col. no "standard"	520811 ± 36723 (erro padrão da média)	511796 ± 31991 (erro padrão da média)
$D = M_1 - M_{st}$	261847	241048
E_D = erro padrão de D	5997	53917
$\frac{D}{E_D}$	4,36	4,47
P	100%	100%

Legenda: M_1 = meio-leite; M_{st} = meio "standard"; D = diferença; P = porcentagem.

Média calculada entre as duas temperaturas (32 e 37°C.), com a incubação das placas feitas com os dois meios diferentes. A diferença que se vai notar entre a porcentagem do agar-leite e agar "standard" é devida ao fato de ser maior o número de placas incontáveis no meio de agar-leite, conforme se verifica nos quadros IV e V.

QUADRO VII

	Meio-leite	Meio "standard"
	Placas contáveis em ambas as temperaturas = 218	Placas contáveis em ambas as temperaturas = 234
$M_{32°C.}$ = n.º médio de col. a 32°C. ...	679341 ± 49028 (erro padrão da média)	587009 ± 43804 (erro padrão da média)
$M_{37°C.}$ = n.º médio de col. a 37°C. ...	583578 ± 39668 (erro padrão da média)	396068 ± 31350 (erro padrão da média)
$D = M_{32°C.} - M_{37°C.}$	95763	190941
E_D = erro padrão de D	63066	53867
$\frac{D}{E_D}$	1,52	3,70
P	87%	100%

CONCLUSÕES

Pelo estudo comparativo de 398 amostras de leite pasteurizado, semeadas em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado e incubadas às temperaturas de 32 e 37°C., chegámos às seguintes conclusões:

- 1º) O emprego do agar-leite-triptona-glicosado, incubado à temperatura de 32°C., na contagem dos germes do leite em placas, dá em resultado um aumento de 100% sobre o agar "standard".
- 2º) A incubação a 32°C., em combinação com o agar-leite-triptona-glicosado, demonstrou ser mais favorável ao crescimento dos germes do leite do que a 37°C..
- 3º) As diferenças entre as médias do agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado, à temperatura de 37°C., e entre as médias do agar "standard" e agar-leite, à temperatura de 32°C., vêm demonstrar, de modo positivo, que essa diferença é real e não ocasional, provando assim que o agar-leite-triptona-glicosado é um meio mais favorável ao crescimento dos germes do leite do que o agar "standard", e esse crescimento é mais favorecido quando se emprega a temperatura de 32°C., em lugar de 37°C., para a incubação das placas.

ABSTRACT

The comparative study of about 398 samples of pasteurized milk planted on standard agar and Tryptone-glucose milk agar, incubated at 32°C. and 37°C., led to the following conclusions:

- 1) An increase in count was observed in 100 per cent of the samples when planted on Tryptone-glucose milk agar, instead of standard agar, both incubated at 32°C..
- 2) Incubation at 32°C. in combination with the use of Tryptone-glucose milk agar, resulted in increases in plate count of considerably greater magnitude than were obtained by the use of the agar and incubation at 37°C..

- 3) The differences between the average of standard agar and Tryptone-glucose-milk-agar, at 37°C., and between the average of standard agar and milk agar, at 32°C., show very clearly that this difference is real and not occasional, thus proving the Tryptone-glucose-milk-agar to be a more convenient medium for the growth of the germs contained in milk than the standard agar. This growth is increased when there is used, for the incubation of the plates, a temperature of 32° instead of 37°C..

BIBLIOGRAFIA

- 1 — "Standard Methods of Milk Analyses", 1934, pg. 16.
- 2 — SAFFORD, C. E. and C. N. STARK — *J. Dairy Sci.*, 1937, 20:577 e *Am. Jour. Publ. Health*, 1936, 26:350.
- 3 — BREED, Robert S. — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1935, 25:663.
- 4 — YALE, M. W. and Carl S. PEDERSON — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1936, 26:344.
- 5 — BOWERS, C. S. and G. J. HUCKER — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1936, 26:350.
- 6 — YALE, M. W. — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1938, 28:148.
- 7 — ABELE, C. A. — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1939, 29:821.
- 8 — "Standard Methods for the Examination of Dairy Products", 1941, pg. 23.
- 9 — BREED, Robert S. and Carl S. PEDERSON — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1932, 22:745.
- 10 — YALE, M. W., Carl S. PEDERSON and Robert S. BREED — *Jour. Bacteriology*, 1933, 25:66.
- 11 — PEDERSON, Carl S. and M. W. YALE — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1934, 24:477.

A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NO DIAGNÓSTICO DA AMEBIASE (*)

AUGUSTO DE E. TAUNAY

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA

Médico do Serviço de Leishmaniose com exercício no Instituto Adolfo Lutz

GABRIEL GARCIA DE FIGUEIREDO

Técnico de laboratório do Instituto Adolfo Lutz

Em 1927 Graig¹ demonstrou que o soro de doentes infectados com *Endamoeba histolytica* continha anticorpos específicos capazes de fixar o complemento, quando se usa um antígeno especial obtido de culturas de *E. histolytica*. A natureza exata desta reação de fixação do complemento até o presente não foi bem determinada, mas os resultados de seu emprego como método de diagnóstico e controle do tratamento têm sido bastante satisfatórios.

Experimentalmente² também já foi demonstrada a existência do anticorpos no sangue de animais sensíveis, tais como coelhos, gatos e cães inoculados com culturas, cistos lavados ou com o próprio antígeno de *E. histolytica*. Stone, em 1935, inoculando coelhos por via intra-peritoneal com cistos vivos e lavados de *E. histolytica* conseguiu demonstrar o aparecimento de anticorpos no sangue, já que as reações foram fortemente positivas.

Graig e Kagy chegaram ao mesmo resultado, inoculando formas vegetativas de *E. histolytica* no cecum e ileum de cães. Meleney e Frye³, em 1937, confirmaram as experiências anteriores, sendo que em coelhos injetavam antígeno amebiano. Estes mesmos autores, em *Macacus rhesus* infectados natural ou experimentalmente, obtiveram reações negativas coincidindo com ausência de lesões intestinais demonstráveis. Nesses mesmos animais quando inoculados com antígeno amebiano as reações de fixação do complemento foram positivas, se bem que de curta duração. Craig e Swartz

* Recebido para publicação em 23 de Fevereiro de 1942.

welder tendo infectado *Macacus rhesus* com culturas de *E. histolytica* obtiveram reações positivas em todas, coincidindo com lesões amebianas intestinais.

O fato da reação tornar-se negativa depois da infestação ter sido eliminada tanto no homem como nos animais de experiência, é outro argumento em favor da existência de anticorpos específicos no sangue, demonstráveis pela reação de fixação do complemento. Apesar de ser um processo de diagnóstico divulgado há 14 anos, o seu emprego não entrou na prática corrente, pela dificuldade que há em serem preparados bons antígenos. Entre nós não nos consta que tenha sido feita qualquer observação nesse sentido, o que justifica a presente comunicação.

Passamos a descrever as técnicas empregadas, necessárias à execução da reação de fixação de complemento no diagnóstico da amebiase.

PREFARO DO ANTÍGENO

O antígeno, por nós utilizado, foi conseguido a partir de culturas ricas de *E. histolytica*, tratadas pelo álcool conforme preconiza Craig.

Na obtenção de culturas ricas inicialmente usamos o meio de Boeck-Drbohlav e um meio composto de soro de boi, coagulado, líquido de Locke e uma pitada de amido de arroz. As fezes foram semeadas conforme a técnica de Craig, isto é, sempre em quantidade suficiente e sem qualquer tratamentos prévio. Das várias sementeiras realizadas com material rico em cistos ou trofozoitos, apenas algumas culturas foram conseguidas após 48 horas de estufa a 37°, culturas pobres que não atingiam a média de uma ameba por campo. (400 ×) O crescimento bacteriano, muito intenso, tornava o meio impróprio perecendo as culturas em 72 horas, sem haver possibilidade de repique. Tratamos o material a ser semeado com diferentes antisépticos, tais como: lugól, ácido clorídico, nipagina, prata coloidal, etc., mas os resultados sempre foram maus. Snyder e Meleney⁴ lavam o material a ser semeado e fazem a flutuação dos cistos com sulfato de zinco (densidade 1130). Com o intuito de obtermos um número apreciável de cistos com a menor quantidade possível de germes, utilizamos o processo de Faust para enriquecimento das fezes: após a flutuação na solução do sulfato de zinco, pipetamos cuidadosamente a parte superior da solução onde se encontram os cistos, lavamos várias vezes em solução fisiológica e praticamos

as sementeiras. Conseguimos por este processo culturas com 5 trofozoitos em média por campo, com crescimento quasi nulo de germes em 48 horas de estufa a 37°. A partir destas culturas foram feitos repiques cada 24 horas, que nos serviram na preparação do antígeno. Em média, não conseguimos ultrapassar de seis o número de repiques, morrendo as culturas na última passagem. O meio que nos deu melhor resultado foi o de soro de boi, coagulado, acima descrito.

Para preparar o antígeno, aspira-se por meio de uma pipeta toda a parte líquida do meio, tendo-se o cuidado de lavar a parte sólida com solução fisiológica. O material assim obtido é centrifugado a 3.000 rotações e o sedimento tratado pelo álcool absoluto na proporção de 1 de sedimento para 7,5 volume de álcool. Guardar em vidro neutro durante 15 dias na estufa a 37°, tendo-se o cuidado de agitá-lo varias vezes por dia, conforme a técnica descrita por Craig. Decorridos os 15 dias o antígeno é filtrado em papel de filtro, e está pronto a ser usado após os necessários controles.

Conforme demonstrou Graig, o fato de haver no antígeno substâncias extraídas das amebas e dos germes que também vegetam nas culturas, não depõe contra a especificidade do mesmo, uma vez que o citado autor provou que tais bactérias, quando cultivadas isoladamente e feita a extração pelo álcool, não acarretam a fixação do complemento no soro de doentes com infestação amebiana, resultados estes confirmados por outros autores. Stone, usando um antígeno livre de bactérias, obtido pela extração de cistos lavados, conseguiu resultados semelhantes aos obtidos com antígeno preparado de culturas contendo amebas e bactérias.

Uma vez pronto o antígeno devemos dosar suas propriedades antigênicas e, principalmente, verificar se não tem ação anti-complementar e hemolítica. Com os antígenos por nós preparados, achamos que tinham melhor ação quando usados diluídos em solução fisiológica do que puros, tendo sido empregados na diluição de 1:30.

TITULAÇÃO DO ANTÍGENO

1) Preparar diferentes diluições do antígeno da seguinte maneira: a um tubo grande contendo 4 cc. de solução fisiológica juntar 1 cc. de antígeno, gota a gota, com agitação, para termos uma diluição final 1:5.

Preparar as diluições seguintes, juntando:

2 cc. de 1:5	+ 2 cc. de sol. fisiológica	= 1:10
2 cc. de 1:10	+ 2 cc. " " "	= 1:20
2 cc. de 1:20	+ 2 cc. " " "	= 1:40
2 cc. de 1:40	+ 2 cc. " " "	= 1:80

2) Dispor 4 séries de tubos contendo 4 tubos em cada série. Nos 4 tubos da primeira série colocar 0,5 cc. de antígeno diluído a 1:10; nos 4 tubos da segunda colocar 0,5 de antígeno a 1:20; nos 4 tubos da terceira colocar 0,5 cc. de antígeno a 1:40 e nos 4 tubos da quarta colocar 0,5 cc. de antígeno a 1:80.

3) Preparar as seguintes diluições de um soro fortemente positivo: 1:5 — 1:10 — 1:20 — 1:40. Juntar ao primeiro tubo de cada série 0,5 cc. de soro diluído a 1:5, ao segundo tudo 0,5 cc. de soro diluído a 1:10, ao terceiro 0,5 cc. de soro diluído a 1:20 e ao quarto 0,5 cc. de soro diluído a 1:40. Agitar levemente todos os tubos e deixar em repouso 15 minutos.

4) Juntar 1 cc. do complemento a todos os tubos, contendo 2 unidades cheias de complemento.

5) Colocar na estante um tubo controle de soro contendo 0,5 cc. de soro diluído a 1:5 e 1 cc. de complemento (2 unidades cheias), e um controle de sistema hemolítico contendo 1 cc. de solução fisiológica e 1 cc. de complemento (2 unidades cheias).

6) Agitar levemente todos os tubos e colocar na estufa a 37° durante 90 minutos.

7) Juntar 1cc. de glóbulos de carneiro sensibilizados a todos os tubos. Agitar novamente e colocar na estufa a 37°. Fazer a leitura.

8) A dose ótima do antígeno a ser usada é aquela que produz inibição completa da hemólise com as menores diluições de soro.

TITULAÇÃO DO PODER ANTI-COMPLEMENTAR DO ANTÍGENO.

1) Preparar uma série de 6 tubos aos quais se juntam 0,5 cc. de antígeno diluído a 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 nos 5 primeiros e 0,5 cc. de solução fisiológica no último tubo.

2) Juntar a cada tubo 0,5 cc. de soro normal inativado diluído a 1:10.

3) Juntar 2 unidades cheias de complemento a cada tubo. Estufa a 37° durante uma hora.

4) Juntar 1 cc. de glóbulos de carneiro sensibilizados a cada tubo. Em todos os tubos deve haver hemólise total; se em qualquer tubo contendo antígeno houver inibição da hemólise, o antígeno não deve ser usado.

Em todas as nossas reações empregamos um sistema hemolítico composto de glóbulos de carneiro e soro de coelho anti-carneiro. Preferimos empregar glóbulos de carneiro previamente sensibilizados e que consiste em misturar 15 a 20 minutos antes de serem usados glóbulos e amboceptor em proporções exatas.

E' de grande importância usar sempre complemento com título exato para se poder apanhar as menores inibições da hemólise. Empregamos para dosagem do complemento a técnica descrita por Kolmer⁵ e que consiste no seguinte: diluir o complemento puro a 1:30 em solução fisiológica e distribuir numa série de 10 tubos da seguinte maneira:

Complemento diluído a 1:30	Antígeno	Sol. fisiológica	S. hemolítico	
1	0,10	0,5 cc.	1,4 cc.	1 cc.
2	0,15	0,5 cc.	1,4 cc.	1 cc.
3	0,20	0,5 cc.	1,3 cc.	1 cc.
4	0,25	0,5 cc.	1,3 cc.	1 cc.
5	0,30	0,5 cc.	1,2 cc.	1 cc.
6	0,35	0,5 cc.	1,2 cc.	1 cc.
7	0,40	0,5 cc.	1,1 cc.	1 cc.
8	0,45	0,5 cc.	1,1 cc.	1 cc.
9	0,50	0,5 cc.	1,0 cc.	1 cc.
10	0,00	0,5 cc.	2,5 cc.	1 cc.

A menor quantidade de complemento diluído 1:30 que produzir hemólise total é a unidade exata. O tubo seguinte é a unidade cheia que contem, 0,05 cc. a mais de complemento diluído. Para a reação empregar 2 unidades cheias, diluindo de tal maneira que 1 cc. contenha as 2 unidades cheias.

O cálculo é muito simples, por exemplo:

Unidade exata — 0,5 cc.

Unidade cheia — 0,35 cc.

Dose certa (2 unidades cheias) — 0,7 cc.

Para saber qual a diluição a ser feita para que 1cc. contenha 2 unidades cheias basta dividir 30 pela dose, no caso $\frac{30}{0,7} = 43,$

litica, exame este consistindo no exame direto do material a fresco, enriquecimento pelo processo de Faust, esfregaços corados pela hematoxilina fêrrica e cultura (casos duvidosos, casos negativos e tal após 5 exames de fezes completos executados em períodos dife- alguns positivos). Os casos negativos só foram considerados como rentes. Grande parte do material enviado e seus respectivos exames devemos à gentileza do Dr. Dácio Franco do Amaral e do Dr. Ávila Pires, a quem consignamos os nossos agradecimentos. Contamos com um total de 82 observações cujos resultados comparativos entre a reação e o exame das fezes se dispõem conforme o quadro abaixo:

R. F. C.	+	—	—	+
Ex. das fezes .	+	—	+	—
N.º de casos ..	66	13	2	1
Porcentagem ..	80,48%	15,85%	2,44%	1,22%

Vemos, pois, que em 79 reações, ou seja 96,34 %, houve concor- dância com o exame das fezes, enquanto em 3 ou seja 3,66 % os re- sultados foram discordes.

Em três casos, desde o início a reação foi fortemente positiva ao passo que o exame das fezes era negativo; num dos casos positivou- se no segundo exame e nos outros dois, somente no terceiro. Ocor- rência interessante verificou-se quando usamos o soro de pessoa su- posta sã, como testemunha da reação, obtivemos uma reação forte- mente positiva. Feito o controle, 3 exames sucessivos foram nega- tivos, tendo-se porem encontrado formas vegetativas de *E. hystoli- tica* pela cultura, após 96 horas de estufa.

Quanto à variação da intensidade da reação com o tratamento, dispomos de pequeno número de observações, todas concordes em patentear a redução de sua intensidade embora nenhuma se tenha tornado negativa.

Como podemos constatar os nossos resultados são bons, o que nos anima a prosseguir, com o fim de obter maior número de ob- servações.

RESUMO

Os A. A., após acentuarem que não encontraram na bibliogra- fia nacional nenhum trabalho referente ao assunto, descrevem a técnica por eles empregada para cultura da *E. hystolitica* usando o meio de soro de boi coagulado mais líquido de Locke.

Descrevem a seguir as técnicas usadas para extração do antígeno e verificação do seu poder antigênico e anti-complementar; os antígenos têm sido usados diluídos a 1:30 em sol. fisiológica.

Relatam a técnica empregada na reação, sua interpretação e os resultados obtidos em confronto com os exames das fezes (direto, enriquecimento pelo Faust, coloração pela hematoxilina férrica e cultura). Foram considerados negativos para *E. histolítica* nas fezes, somente os casos nos quais foram executadas 5 séries de exames em diferentes ocasiões. De 82 reações houve concordância com exame das fezes em 79 ou seja 96,34 % enquanto em 3 ou seja 3,66% os resultados foram discordes, conforme discrimina o quadro anexo.

ABSTRACT

The authors, after pointing out that there was found no publication about the subject in the national literature, describe the technique used for the culture of *E. histolítica*, using coagulated beef serum and loke's solution.

Afterwards they describe the techniques used for the extraction of the antigen and the verification of the antigen and anti-complementary power, the antigens having been used dissolved at 1:30 in physiologic solution.

They report the technique used in the reaction, its interpretation, and the results obtained, in comparison with those of the examination of stool (direct examination, Faust's enrichment method, iron hematoxylin stain and culture). There were considered negative for *E. histolítica* in stool only those cases in which there were made 5 series of tests performed at different occasions. There was an accordance with the stool examination in 79 cases out of 82 tested, or 96,34%, while in 3, or 3,66 % the results disagreed, as seen in the joined table.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — GRAIG, E. F. — Amebiasis and amebic dysentery, C. C. Thomas Springfield, 1934, I.
- 2 — GRAIG, E. F. — Laboratory diagnosis of protozoan diseases, Lea a Febiger, 1942.
- 3 — MELENEY, H. E. & FRYE, W. W. — 1937, *Am. Jour. Public Health*, 27, 505.
- 4 — SNYDER, T. L. & MELENEY, H. E. — 1941, *Am. Jour. Trop. Med.*, 21, 63.
- 5 — KOLMER, J. H. & BOENER, F. — Approved Laboratory technic — D. Appleton-Century Company, 1941.

SURTO EPIDÊMICO DE MONONUCLEOSE INFECTUOSA

MANOEL DE BRITTO E SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

No momento em que grassa em S. Paulo uma epidemia, já hoje identificada como de Mononucleose Infectuosa, é-nos oportuno reletar alguns dados sobre um surto semelhante que se deu em Mogí-Mirim.

Sobre a natureza desta epidemia, que teve lugar entre os meses de Dezembro de 1939 e Fevereiro de 1940, fizemos ao Diretor do Instituto um relatório transmitido, em seguida, ao Diretor Geral do Departamento de Saude do Estado.

Nessa época trabalhavamos no antigo Instituto Bacteriológico com a Reação de Paul-Bunnell, já em uso desde 1932 em diversos paizes, e para o fim de diagnóstico das Mononucleoses Infectuosas e que entre nós ainda era desconhecida ou não tinha sido posta em prática. Sobre os nossos resultados publicamos um trabalho no 1.º número desta Revista, em 1941.

Infelizmente, só tivemos notícias de tal surto quasi em seu término. A notícia nos foi trazida com pormenores pelo acadêmico C. Sampaio, 4.º anista da Faculdade de Medicina, que aquí chegou acometido de tal enfermidade. Apresentando-se com os gânglios cervicais infartados, febre, dor de cabeça, foi feito pelo Dr. J. Ória, do Departamento de Histologia da Faculdade, uma fórmula leucocitária, que deu como resultado um quadro hematológico típico da Mononucleose Infectuosa. Disse-nos o referido acadêmico que a enfermidade de que estava acometido grassava em forma epidêmica naquela cidade. Todos os casos que teve ocasião de conhecer apresentavam-se idênticos ao seu: a princípio mal-estar, depois febre que ia até 39-40º, dor de cabeça pronunciada, e, no período de defervescência, aparecimento dos gânglios infartados, principalmente na região cervical.

Seguindo para aquela cidade, de chegada tivemos a notícia de que o surto estava no fim. Junto aos clínicos locais, e entre eles o

Dr. Marcelo Orlandi, que teve a gentileza de nos acompanhar, tivemos a confirmação do aparecimento da sintomatologia semelhante em todos os casos por eles examinados, que se contavam em cerca de cem.

A princípio pensaram em febre tifóide, para-tifóide, gripe, suposições estas que foram eliminadas mais tarde em vista dos resultados negativos das Hemoculturas e Reações de Widal procedidas no Instituto Bacteriológico. Com dificuldades para realizar outros exames de laboratório, foram afastadas as hipóteses de febre tifóide e para-tifóide, porem não chegaram a conclusão quanto à natureza da epidemia.

Tivemos ocasião de entrar em contacto com cerca de 30 pessoas que estiveram acometidas desta enfermidade. Todas nos contavam a mesma história clínica. Soubemos que em dois deles foi feita a fórmula leucocitária; um material foi examinado pelo Dr. Sales Monteiro, analista do Instituto Penido Burnier de Campinas, que deu como um caso positivo para Mononucleose Infectuosa. O outro foi enviado para o Dr. Otávio Tizi, em São Paulo, dando idêntico resultado. Este último doente conta que só de sua família estiveram com doença idêntica, 9 pessoas.

Colhemos material para exame de 5 dos convalescentes mais novos, para verificação si sua fórmula sanguínea e Reação de Aglutinação de Paul-Bunnell ainda positivavam. Damos em anexo um quadro que resume estes 5 casos.

Como vimos, dos 5 casos a que nos referimos acima, apresentando sintomatologia clínica de Febre Ganglionar de Pfeiffer, 4 ainda deram o quadro hematológico característico para esta afecção e, dentre estes, 2 deram a Reação de Paul-Bunnell positiva. Aliás, estes resultados já eram previstos, uma vez que, como sabemos, a fórmula leucocitária conserva-se positiva ainda por 2-3 meses, o que só raramente acontece para a Reação de Aglutinação, pois, como vimos, as aglutininas baixaram logo ao normal.

Pelos dados colhidos naquela cidade, exames feitos em S. Paulo (em número de 8) e pelo carater epidêmico, benigno da afecção, julgamos tratar-se de um surto de Mononucleose Infectuosa, em forma epidêmica. E' de se lamentar que uma forma como esta — epidêmica, de um amoléstia de que somente tinham sido encontrados em S. Paulo, aliás no Brasil, casos esporádicos, passe sem uma maior documentação, no registo da 1.^a epidemia que teve lugar entre nós e que é relativamente rara na literatura mundial.

DOENTES	REACÇÃO DE AGLUTINAÇÃO DE PAUL-BUNNELL-DAVIDSOHN	FÓRMULA LEUCOCITÁRIA							OBSERVAÇÕES
		Jovens	Bastonetes	Segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos	
CASO I R. C. A. 26 anos	1/7 Negativa	0	11,5	30,0			49,0	8,0	Febre há 8 dias; 38°5 no início, atualmente pequena alteração ao anoitecer. Sudorese abundante. Não apresenta baço palpável nem gânglios infartados. A garganta tem aspecto normal. Entre os mononucleares foram encontradas formas atípicas, dando quadro característico de Mononucleose Infecciosa.
CASO II F. S. 36 anos	1/28	0	8,4	34,8	2,4	0	44,8	8,8	Esteve acamado durante 17 dias. A princípio febre de 39° à noite e dor de cabeça. Contra a dor de cabeça tomou vários remédios sem resultado. Atualmente apresenta um gânglio do tamanho do caroço de milho, indolor. Verificámos uma linfocitose com atípias nucleares e protoplasmáticas; os monócitos também se apresentam com atípias; presença de Plasmócitos (0,8%).
CASO III D. M. 14 anos	1/1792 Positiva	0	1,5	17,5	44,5	0	23,0	3,5	Febre há 10 dias, somente à noite. Apresentou-se com diarreia. Por 2 vezes teve vômitos. Gânglios pequenos sub-maxilares, cerviculares e axilares. Sono irrequieto. Expulsou <i>Ascaris lumbricoides</i> algumas vezes. A grande reacção pelos Eosinófilos, devida naturalmente a uma infestação em massa de parasitos, impediu o desenvolvimento do quadro típico da Mononucleose Infecciosa.
CASO IV C. M. 62 anos	1/56	0	5,0	28,0	3,0	0	60,0	4,0	Principiou com peso na cabeça, que mais tarde se transformou em dor de cabeça muito forte. Febre de 38-39°C. nos 2 primeiros dias, baixando em seguida para 37,5-38,5°, conservando-se assim por uns 26 dias. Teve alta, mas a febre voltou a aparecer à noite. Pela manhã apirético. Anorexia. Atualmente em convalescença apresenta um gânglio cervical indolor, mas que já foi doloroso. Não apresenta baço nem figado palpáveis. Título baixo de aglutinação na 1.ª fase da R. Paul-Bunnell. A 2.ª fase da reacção porem comportou-se especificamente para a Mononucleose Infecciosa. Formas atípicas de Linfócitos (Linfócitos histióides); presença de 1 Plasmócito. Quadro característico de Mononucleose Infecciosa.
CASO V J.B.C. 25 anos	1/28	0	0,5	42,5	8,0	0	40,5	8,5	Teve pneumonia em Setembro de 1939. Em Novembro do mesmo ano passou 2 meses com a febre. Tomou remédios, sem resultado. Atualmente ainda tem febre, que aparece pela manhã e à noite. No momento de retirarmos o sangue (5-4-40) estava apirético. R. de Widal 1/200 (+). Vacinado contra febre tifóide? Falsa reacção devida à moléstia? Linfocitose acentuada com atípias nucleares e citoplasmáticas.

DO EXAME MICROSCÓPICO DO GUARANÁ EM BROMATOLOGIA (*)

J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR

Químico do Instituto Adolfo Lutz

O presente trabalho é uma contribuição de ordem técnica à elucidação de um dos dispositivos do Codex Alimentarius que, por julgarmos falho, achamos digno de ser estudado e esclarecido, propondo sua imediata e criteriosa modificação.

O nosso objetivo visa um necessário entendimento entre os técnicos analistas e os encarregados da execução das leis sanitárias quanto à alteração do artigo 168, referente ao exame microscópico do refresco e do xarope de guaraná. Nesses produtos a ausência dos elementos histológicos da "*Paullinia cupana*" tem sido a causa principal de numerosas condenações.

A nossa contribuição é baseada em conclusões obtidas de minuciosas e persistentes observações.

Que o nosso "desideratum" seja preenchido é o que almejamos.

Antes de entrarmos no assunto a que nos propomos, faremos um ligeiro estudo botânico do guaraná, seguindo-se referências ao seu uso, aplicação terapêutica, estrutura microscópica, preparação do pó, do extrato fluido e do bastão, terminando pelo exame microscópico dos produtos do guaraná e sua interpretação fundamentada na legislação em vigor.

Com o nome de guaraná (uaraná em tupí-guaraní significa *arvore*) é conhecido o fruto do uaranazeiro, arbusto, liana trepadeira, da família das Sapindaceas.

Em 1824, por ocasião da viagem dos sábios exploradores Humboldt e Bonpland às regiões equatoriais da América do Sul, a planta foi pela primeira vez estudada por Kunth, que a classificou na família das Sapindaceas, com o nome genérico de *Paullinia* e específico de *cupana*.

Dois anos mais tarde, nas imediações do Rio Negro, no vale do Amazonas, Von Martius encontrou por sua vez o guaraná, deu-lhe

(*) Recebido para publicação em 19-1-1942.

o nome de "*Paullinia sorbilis*", classificando-o igualmente na família das Sapindaceas. Em 1829, em conferência realizada na Real

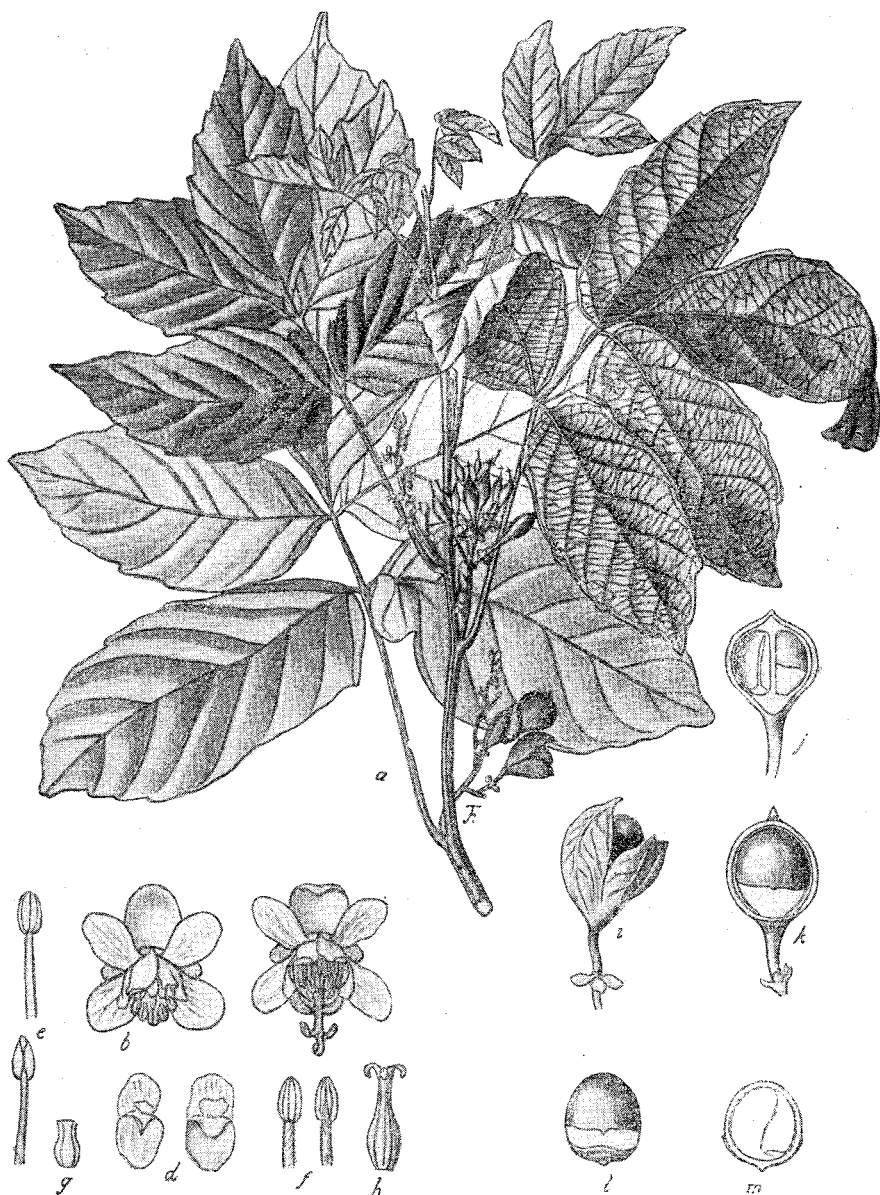


FIG. 1
 "*Paullinia cupana*"

Academia Bávara de Ciências, Von Martius tornou conhecida a sua descoberta, referindo-se à sua classificação, ao uso, indicações te-

rapêuticas e ao preparo do bastão de guaraná pelos indígenas. Pouco tempo depois, em Erlangen, num opúsculo publicado por seu irmão Theodoro Martius — que foi o primeiro a estudar quimicamente a droga — fez considerações sobre a "*Paullinia sorbilis*", nome esse que foi bastante divulgado e que figura ainda hoje em alguns tratados de botânica e compêndios.

Conhecida desde tempos imemoriais, a "*Paullinia cupana*", já era usada pelos nossos indígenas do Amazonas, de onde é originária, quando os europeus aportaram ao continente americano.

É encontrada nas proximidades das margens húmidas e quentes dos rios da zona equatorial, tendo o seu habitat geográfico no Pará, Goiás, Mato Grosso e principalmente no Amazonas, onde existe em abundância em Maués, o centro industrial por excelência e o maior exportador do bastão e das sementes de guaraná.

A "*Paullinia cupana*" (Fig. 1) é um arbusto, liana trepadeira, de pequeno porte, atingindo raras vezes altura superior a de um homem. O caule principal e os diferentes ramos apresentam sulcos profundos em número de 4 ou 5. Os ramos são pilosos na extremidade e glabros na base. Tem 4 a 8 mm. de diâmetro e sua casca é parda. O corpo lenhoso é simples. As folhas são isoladas, em disposição dística. São compostas penadas a cinco folíolos e têm 40 cms. de comprimento e de largura. O pecíolo principal tem mais ou menos 8 cms. de comprimento; os pecíolos secundários são muito curtos. Os folíolos superiores são oblongos, os inferiores ovóides, são glabros nas duas faces e possuem numerosas glândulas microscópicas. Cada folíolo tem, em média 20 cms. de comprimento e 9 cms. de largura. Em sua face inferior encontram-se utrículos latíferos ramificados. Sua nervação é peninervia; o limbo é crenado. Os ramos são pequenos e caducos. Os pedicelos das inflorescências estão situados na axila das folhas. As flores são polígamas, zigomórfas, com plano de simetria oblíqua, dispostas em cachos de cima. O cálice é composto de cinco sépalas livres, ovóides, piloso à face externa, medindo aproximadamente 3 mm.. As pétalas, em número de quatro, são oblongas e munidas na face interna de apêndices ligadores; têm 5 mm. de comprimento e possuem glândulas. O androceu é composto de oito estames. Os filetes são livres, chatos e revestidos de longos pelos. As anteras são introrsas, a quatro sacos polínicos, abrindo-se ao longo. O pistilo compõe-se de três carpelos reunidos, concrescíveis num ovário trilocular. Cada loja contém um óvulo campilótropo epinasto. O ovário termina por um estilete trifido. O fruto é uma cápsula a deiscência septicida.

de uma bela cor vermelha rutilante, quando maduro. A semente, ovóide, de mais ou menos 12 mm. de comprimento, é munida de um arilo bastante abundante antes da maturação. É desigualmente convexa dos dois lados, às vezes encimada por um curto apículo, glabra, luzidia, de cor pardo-purpurina ou pardo-negra e apresenta um largo hilo que é guarnecido pelo arilo, carnoso, membranoso e esbranquiçado, que é retirado na ocasião da dessecação da semente. O embrião, desprovido de albume, possui uma curta radícula ínfera e espessos cotilédones, desiguais, carnosos, firmes, plano-convexos.

A floração da "*Paullinia cupana*" é anual e dá-se em Julho. A frutificação começa em Setembro e Outubro, terminando a maturação somente em Novembro ou Dezembro.

A colheita se faz nesta época e uma só liana pode fornecer até 10 quilos de sementes.

Em condições propícias, cada indivíduo vive, aproximadamente, quarenta anos.

Estrutura microscópica — Examinando ao microscópico um corte transversal da semente (fig. 2) notamos, primeiramente, o tegumento seminal (episperma) que deixa ver um grosso epiderma, formado de grandes células paliçádicas, de paredes bastante espessas, as quais, vistas por cima, são sinuoso-ondeadas. Debaiixo do episperma encontra-se um parênquima pardo tendo numerosas células petreas, mais ou menos esclerosadas, de paredes espessas e caniculadas.

A amêndoa é formada por um endosperma cheio de grãos de amido, mais ou menos alterados pela torrefação da semente, notando-se, espessadamente, grupos de pequenos vasos. Revestindo a amêndoa, encontra-se, na periferia, uma camada de células cúbicas.

O uso do guaraná data de era bem remota.

Provavelmente se deve aos índios da tribo Maués a propagação das virtudes da planta brasileira a todos os recantos do paiz.

O guaraná, pelos seus efeitos, era considerado uma panacéia indispensavel, que se devia ter sempre à mão e que jamais faltava em viagens.

Ao viajante cansado por grandes caminhadas, era sempre oferecida, em certas regiões, principalmente em Mato Grosso, a legendária bebida alimentar "uaraná", de grande poder refrigerante e reparador das forças, preparada com o pó do bastão, água e açúcar.

As suas aplicações foram, outróra, as mais variadas e extravagantes possíveis, como se depreende da relação seguinte, extraída textualmente do Dicionário de Botânica Brasileira, de Joaquim de Almeida Pinto, publicado em 1873: — “indicado como refrigerante, estomacal, antifebril, afrodisíaco, excitante do sistema nervoso gastro-intestinal, tônico do coração e das artérias, diaforético, anti-bleorrhágico, para impedir a evacuação superabundante de muco, combater as cólicas flautulentas, enxaquecas, engorgitamento das vísceras abdominais, predisposições de congestões para a cabeça, como excitante sensual, com propriedades de diminuir as funções espermáticas.”

Era ainda aplicado como diurético, contra febres palustres, disenterias, hidropsias, artério-escleroses, nevralgias, metrorragias, como tônico nutritivo, adstringente, narcótico, desalterante, contra as diarréias e a epilepsia...

Os indígenas o usavam como estimulante nos combates e festas e aos seus efeitos emprestavam verdadeiro culto.

A “*Paullinia cupana*” pertence ao número dos produtos naturais à base de cafeína — chá, café, cacau, cola e mate — sendo de todos eles o que apresenta maior porcentagem do alcalóide (4,8%).

Theodoro Martius, em 1826, conseguiu extrair o princípio ativo da planta, dando-lhe o nome de *guaranina*.

É a este alcalóide, cujas propriedades terapêuticas muito se aproximam às da cafeína (Trimetilxantina), que o guaraná deve a sua ação excitante sobre as funções cerebrais, agindo como agente miostênico sobre a fibra muscular, facilitando o trabalho físico e permitindo ao homem realizar, sem fadiga aparente, um trabalho longo e árduo, sem razão suplementar.

Muito usado ainda sob a forma de tintura, extrato fluido, pó, bastão e sementes, conserva a tradição de suas virtudes, muito embora sem o entusiasmo e a convicção de outrora.

Tem atualmente, apesar de restrito, emprego em medicina e consta da Farmacopéia Brasileira sob duas formas: pó de guaraná e extrato fluido de guaraná.

E’ indicado como cardiodinâmico, antidiarréico e nas enterites disenterigênicas.

Pó de guaraná — Segundo a Farmacopéia Brasileira é assim preparado:

“Raspe o bastão de guaraná com uma lima grossa e passe o pó resultante pelo tamís n.º V. Si, em vez do bastão, quizer pulverizar a semente, pile-a grosseiramente, seque-a a 45-50°, pulverize-a e passe o pó pelo tamís n.º V. Proceda ao doseamento pelo processo indicado e adicione ao resto, si for necessário, q. s. de pó de guaraná esgotado para que o produto final contenha 4 % de cafeína. Deve conter de 3,6 % no mínimo, a 4,4 % no máximo de cafeína.”

É usado na confecção de cápsulas, comprimidos, pílulas, pós e na preparação do extrato fluido.

Caracterização — Pó de cor pardo-rósea clara, quasi inodoro e de sabor francamente adstringente e amargo.

Extrato fluido de guaraná — Denomina-se extrato fluido o soluto extrativo e titulado de consistência fluídica, obtido por intermédio de uma mistura de álcool e água, à baixa temperatura, correspondendo em centímetro cúbico ao peso da planta ou a um teor estipulado do princípio ativo medicamentoso.

Na indústria é usado o processo de evaporação no vácuo, que é rápido e praticado em aparelhos especiais, à baixa temperatura e livre do contacto do ar.

É o processo ideal para a preparação de extratos fluidos, por se obter produto de composição sempre constante, mais ativo e menos corado que o preparado a banho-maria — operação que o torna geralmente escuro.

O extrato fluido de guaraná, de acordo com a Farmacopéia Brasileira, deve ser preparado da seguinte maneira:

Guaraná em pó (tamís n.º V)	1.000 grs.
Álcool	Q.S.
Água	Q.S.

Para se obter cerca de 1.000 cm³

Prepare este extrato fluido pelo processo (A) comum de percolação, empregando como líquido extrator uma mistura de três volumes de álcool com um volume de água.

Humideça uniformemente mil gramas da droga pulverizada com q. s. do líquido extrator e deixe em maceração durante seis horas em vaso tampado; passe-se então a mistura pelo tamís n.º

III, introduzindo-a em um percolador. Junte-lhe mais líquido extrator, afim de que este, ao atravessar o pó em sua descida, acarrete as substâncias solúveis e sais do percolador, livre de substâncias insolúveis. O orifício de escoamento do percolador, antes da introdução do pó, deve ser obliterado por um pouco de algodão hidrófilo humedecido com algumas gotas do líquido extrator, para facilitar a passagem das primeiras porções do percolato, em geral muito densas. Deixe então escoar vagarosamente o líquido (10 gotas por minuto), juntando-se mais líquido extrator até completo esgotamento da droga. Separe os primeiros oitocentos cm^3 do percolato, distile o restante deste para recuperar o álcool e concentre o resíduo até consistência xaroposa em temperatura inferior a 60° , dissolva este na porção posta à parte, misture bem e proceda ao doseamento de uma fração do produto pelo processo indicado, calcule a porcentagem de cafeína no resto do líquido e junte-lhe q. s. de líquido extrator para que cada fração de 100 cm^3 de extrato fluido finalizado contenha 4 grs. de cafeína.

100 cms^3 de extrato fluido de guaraná devem conter de 3,6 grs., no mínimo, a 4,4 grs. no máximo, de cafeína.

Caracterização — Líquido castanho-escuro, cheiro pouco acentuado, lembrando o de cacau, sabor bastante amargo, e adstringente.

O extrato fluido de guaraná é usado na manipulação de porções, xaropes, etc.. Na indústria tem larga aplicação na preparação do xarope de guaraná para refrescos e da bebida refrigerante gazeificada, denominada "Guaraná".

Bastão de guaraná — O guaraná em bastão apresenta-se em cilindros duros e pesados de 10 a 30 centímetros de comprimento, aproximadamente, por 4 cms. de diâmetro, de cor pardo-avermelhada escura, externamente; sua fratura é desigual e levemente luzidia, com frissuras no centro. Internamente é de cor pardo avermelhada clara e apresenta fragmentos mais ou menos grossos das sementes e às vezes seus tegumentos pardo-negros. Seu cheiro é pouco perceptível e seu sabor fracamente adstringente e amargo, lembrando um pouco o do cacau.

O bastão de guaraná fabricado pelos indígenas é reputado o de melhor qualidade e pureza, alcançando por isso maior preço, aceitação e procura no comércio. É de aspecto grosseiro, tamanho e peso maiores e de cor mais escura do que o produto industrial,

ao qual se juntam, por vezes, cacau, farinha de mandioca e de arroz, previamente peneiradas.

A sua dureza é tal que requer o uso de uma lima ou grossa para reduzi-lo a pó. Os índios, para este fim, se utilizam do osso da língua do pirarucú que é considerado o maior peixe fluvial do Brasil.

Esse osso hióide, pelas inúmeras apófises espinhosas que possui, torna-se um ótimo ralador e é utilizado como utensílio de cozinha.

O bastão de guaraná, cuja preparação atual é baseada no método usado pelos nossos indígenas, é feito da seguinte maneira:

Os frutos, colhidos logo que estejam maduros ou quasi maduros, são tratados com água afim de tirar-lhes a parte carnosa, deixando livres as sementes que são expostas ao sol para secarem. Em seguida são estas ligeiramente torradas sobre pedras aquecidas, fornos ou em torradores cilíndricos ou esféricos giratórios, idênticos aos usados para torrar café. A torrefação se faz no mesmo dia da colheita com o fim de evitar a fermentação das sementes, devendo-se ter o máximo cuidado para que não se queimem e fiquem uniformemente torradas. São depois descascadas. operação que é feita colocando-se as sementes torradas dentro de um saco e batendo-o várias vezes contra o solo ou sovando-o com o auxílio de uma vara, sendo em seguida peneiradas. As sementes depois de limpas são trituradas em pilões de pedra ou de madeira e reduzidas a um pó, mais ou menos fino, que é humedecido com água e amassado até a obtenção de uma pasta consistente. A esta pasta são adicionadas sementes inteiras e fragmentadas, antes de serem moldados os bastões. Estes são, por sua vez, submetidos à secagem que lhes empresta uma dureza característica e lhes permite conservarem-se por muito tempo. Os secadores ou fumeiros constam de três ou mais girais sobrepostos, colocados sobre o fogo brando da lenha resinosa de muxurí, de preferência, pelo aroma e grande quantidade de fumo que desprende, e são construídos em compartimentos fechados, ao abrigo dos ventos, tendo unicamente uma porta que é aberta de quando em quando, para a renovação do ar. Os bastões são estendidos no primeiro girau, próximo ao braseiro, onde permanece por muitos dias, sendo revirados constantemente. São passados sucessivamente para os girais superiores, à proporção que vão secando e só estarão prontos depois de permane-

cerem 60 dias, aproximadamente, nesta estufa. Os indígenas gastam neste trabalho nada menos de 120 dias.

Exame microscópico — O exame microscópico presta, indiscutivelmente, inestimáveis serviços à Bromatologia na determinação e identificação das mais variadas fraudes a que estão sujeitos os produtos alimentícios.

É, por assim dizer, indispensável nas análises bromatológicas, não só como complemento aos exames químicos, como também por ser, em determinados casos, o meio único e seguro para a especificação de misturas, as mais variadas possíveis.

A fraude das farinhas, dos doces de frutas, dos condimentos e de muitos outros alimentos, somente poderá ser revelada, com exatidão, pelo exame microscópico, auxiliado pelas reações microquímicas e pelo conhecimento dos elementos histológicos característicos a cada espécie vegetal.

O fim por nós colimado e que constitue a razão de ser destas linhas, fundamenta-se na interpretação do exame microscópico do sedimento do refresco e xarope de guaraná, o que procuraremos esclarecer dentro das possibilidades ao nosso alcance, principalmente no ponto em que achamos obscuro, falho ou incongruente. Esperamos merecer o apoio dos interessados no assunto, pois que a modificação a ser proposta virá favorecer grandemente, não só o laboratório, o industrial, como também a própria lei sanitária.

O laboratório — porque não mais será forçado a rejeitar um produto, embora reconhecendo que o mesmo, pelos princípios básicos da filtração, deveria ser aprovado.

O industrial competente e escrupuloso — porque já não terá o dissabor de ver o seu produto reprovado, estando convicto de que o preparou com a mais rigorosa técnica e assepsia.

E a própria lei sanitária — porque, reparando este lapso preenchendo esta lacuna, estará exigindo a apresentação de um produto límpido, puro, sem prejuízo de suas propriedades e que satisfaz plenamente uma das mais comensais e indispensáveis operações químico-farmacêuticas — a filtração.

Para o pó da semente e do bastão de guaraná, o *Exame Microscópico* tem grande valor, sendo a sua contribuição indispensável, porque revela com precisão a presença dos elementos histológicos e ainda das impurezas, por acaso existentes.

Entretanto para o refrigerante, xarope e extrato de guaraná, este exame é de valor secundário, destituído do interesse e da importância que lhe emprestam.

Nos exames microscópicos de produtos do guaraná não encontramos no sedimento, após centrifugação, elementos histológicos da "*Paullinia cupana*", a não ser em dois únicos casos que passaremos a descrever mais adiante.

Comumente são encontradas no depósito formado (Fig. 3), leveduras, bactérias e substâncias amorfas, de aspecto resinoso, em massas ou pequenos blocos, levemente corados, que se tornam castanho avermelhados quando tratados pelo lugol.

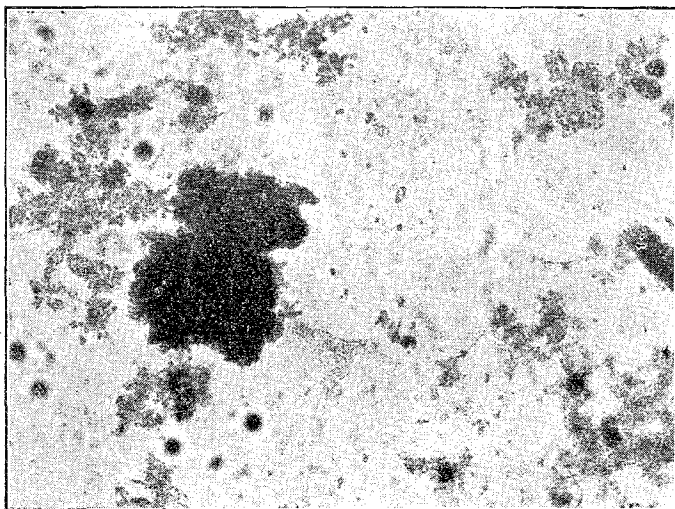


FIG. 3

Microfoto — Sedimento de refrigerante de "Guaraná" velho.

As leveduras, bactérias e cogumelos, formam, muitas vezes, no refresco, quasi que a totalidade do sedimento, revelando a falta de assepsia na manipulação do produto que, pela sua composição, favorece o crescimento de tais germes.

A substância gomosa ou resinosa, em grumos, blocos, placas e massas amareladas, amorfas, que se encontra no sedimento dos produtos de fabricação antiga, notadamente quando fermentados, é muito comum nas preparações de origem vegetal.

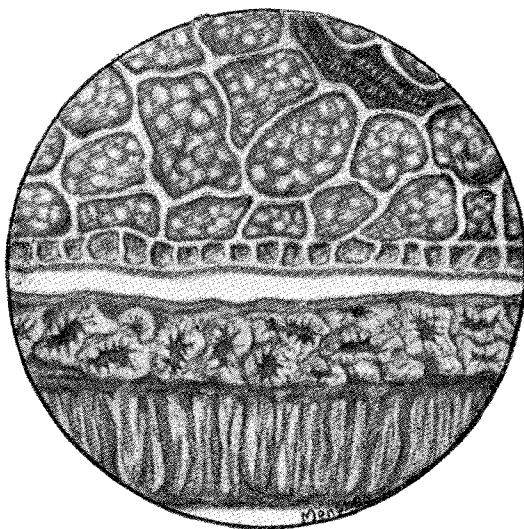


FIG. 2
Córte transversal da semente (x200).



FIG. 4
Elementos do pó de guaraná (x300)



A causa de sua formação tem sido motivo de acurado estudo, de há longos anos, não se tendo chegado, entretanto, a uma conclusão satisfatória. Este depósito é constituído, quasi sempre, de substâncias inertes, em alguns casos, porem, de pequena porção de princípios ativos, e se supõe proveniente da alteração provocada pela ação do ar e da luz à mistura de princípios imediatos com albumina, tanino, matérias corantes, diferentes glicósides, alcalóides, etc., de que se compõem os extratos e tinturas vegetais.

Os elementos do pó de guaraná são típicos, conforme se vê na fig. n.º 4, e a sua presença no centrifugado será facilmente determinada ao microscópio, entre lâmina e lamínula, em preparação a fresco.

Constam de elementos celulares do parênquima amilífero, grãos de amido esparsos, irregularmente esféricos, às vezes alongados, simples ou compostos de dois, três e quatro aglomerados; células cúbicas da superfície do embrião, dutos e ainda, células petreas e células paliádicas do tegumento de sementes não descascadas.

Estes elementos se tornam mais claros, nítidos e perfeitamente reconhecíveis quando tratados pelo soluto de hipoclorito de sódio e montados entre lâmina e lamínula com uma gota de solução concentrada de hidrato de cloral.

De Janeiro a Novembro de 1941, foram efetuadas pela Sub-Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, 48 análises microscópicas de produtos do guaraná, assim discriminadas:

Análises fiscais:

Refrigerantes	30
Xaropes	3

Análises prévias:

Refrigerantes	9
Xaropes	1
Extratos	5

Total 48

PRESENÇA DE GERMES

(Exames microscópico e bacteriológico)

a) REFRIGERANTES:

Análises prévias:

Leveduras, cogumelos e bacilos esporulados Gram positivos com vitalidade	1
Leveduras e bacilos Gram positivos esporulados com vitalidade	23
Leveduras com vitalidade	4
Bacilos esporulados Gram positivos com vitalidade ..	1
Germes sem vitalidade	1

Análises fiscais:

Leveduras e bacilos esporulados Gram positivos com vitalidade	1
Leveduras, cogumelos e bacilos esporulados Gram positivos com vitalidade	1
Leveduras com vitalidade	3
Germes sem vitalidade	4

b) XAROPES

Análise prévia:

Germes sem vitalidade	1
-----------------------------	---

Análises fiscais:

Leveduras, cogumelos e bacilos esporulados Gram positivos com vitalidade	1
Leveduras e cogumelos com vitalidade	1
Leveduras com vitalidade	1

ELEMENTOS HISTOLÓGICOS DE GUARANÁ:

Xaropes:

Prévias — ausência	3
Fiscal — ausência	1

Refrigerantes:

Prévias — ausência	29
presença (contendo também amido de mandioca)	1
Fiscais — ausência	9

Extratos:

Fiscais — ausência	4
Fiscal — presença de amido (semelhante ao do guaraná e do cacau)	1
Total	48

Notamos, pela relação acima, que nos produtos de guaraná a ausência dos seus elementos histológicos é quasi absoluta.

Em 48 amostras examinadas somente duas os apresentaram e assim mesmo com resultados pouco satisfatórios. Uma dessas amostras era de refrigerante e outra de extrato de guaraná.

No refrigerante, análise prévia, foi constatada a presença de raríssimos elementos histológicos de guaraná e, ainda, de grande quantidade de amido de mandioca (*Manihot utilissima*) e número elevado de germes com vitalidade. Seu sedimento era abundante.

Podia tratar-se do caso de um produto mal filtrado, contendo extrato ou infuso, preparados com o bastão de guaraná de qualidade inferior, ao qual comumente são adicionadas substâncias amiláceas, ou de ter sido juntado, intencionalmente, o pó do bastão de guaraná ou o aludido amido, com o fim de serem encontrados no exame microscópico e permitir a sua aprovação, de acordo com a vigente lei. O fabricante porem se esqueceu que o amido de "*Manihot utilissima*" difere não só na forma como em tamanho do amido da "*Paullinia cupana*" e que, ao microscópio não é difficil differença-los.

A outra amostra era de um extrato de guaraná, análise fiscal, na qual verificámos a presença de grãos de amido semelhantes aos da "*Paullinia cupana*" e "*Theobroma cacao*", e ausência absoluta dos demais elementos histológicos da semente do guaraná.

O depósito branco, pulverulento, formado no fundo do recipiente, chamou-nos logo a atenção ao recebermos a amostra, pois contrastava nitidamente com a cor castanho avermelhada do líquido.

E' evidente o intuito do fabricante adicionando, posteriormente à filtração do produto, o amido em questão. O aspecto deste depósito, entretanto, era ainda bem mais toleravel do que o apresentado pelos elementos totais do pó, cuja cor pardo-avermelhada dar-nos-ia logo a impressão de impureza ou alteração.

O extrato fluido de guaraná, como todos os extratos fluidos de origem vegetal, logo após sua preparação, devem apresentar-se límpidos, isentos de substâncias insolúveis e detritos da planta.

Tivemos ocasião de visitar vários laboratórios farmacêuticos e fábricas de extrato de guaraná e nos certificamos de que o processo de preparação por eles usado, não permite a obtenção de um produto turvo que, conseqüentemente, formaria depósito e seria rejeitado pelo consumidor.

Diversas amostras de extrato de guaraná, de várias procedências e de recente fabricação, foram examinadas ao microscópio, após centrifugação pelo espaço de tempo de uma hora, não revelando a presença de seus elementos histológicos.

Estas amostras, expostas à ação da luz e do ar, foram examinadas mais tarde e apresentaram um sedimento castanho avermelhado escuro, constituído por pequenos blocos irregulares, de aspecto esponjoso, parcialmente solúveis no álcool, restando outros completamente insolúveis, granuloso e escuro, constituídos talvez por tanatos insolúveis.

O “vermelho de guaraná”, matéria corante existente em grande quantidade nas sementes e no episperma e em pequena porção em vários órgãos da planta, foi objeto de atencioso estudo de nossa parte. Completamente solúvel no álcool, precipita-se em presença da água destilada, do eter, do clorofórmio, da benzina e do eter de petróleo, parecendo dever-se a ele a formação de uma grande parte do depósito existente nos extratos de fabricação antiga. E' de constituição ainda não bem definida e apresenta verdadeira analogia com a matéria corante da noz de cola e do cacau. E' um corpo amorfo, de função fenólica, faz parte do grupo das catequinas, não se precisando porem, si é de natureza glicosídica como se faz supor — o que, aliás, tem sido já contestado.

Sendo a “*Paullinia cupana*” rica em resinas, goma, tanino, óleo graxo e principalmente de “vermelho de guaraná”, está o seu extrato fluido sujeito à oxidação dessas substâncias com ulterior formação de depósito. Este, porem, não tem relação nem semelhança com o constituído pelos inconfundíveis elementos histológicos típicos da semente como acabamos de ver (Fig. n.º 4).

À farmacologia, terapêutica e bromatologia, interessa unicamente que o extrato fluido de guaraná apresente integralmente os princípios imediatos da droga. A presença dos seus elementos histoló-

gicos, portanto, é absurda e desnecessária porque, não aumentando em absoluto as propriedades gerais do extrato, pois constitue um pó já esgotado, leva à certeza de que o produto não foi convenientemente manipulado.

A filtração neste caso é operação que se torna indispensavel, afim de se obter um produto límpido, higiênico e apresentavel.

Pelo método da percolação, de uso official, obtem-se o extrato fluido isento de substâncias insolúveis e impurezas, pois que o percolador, pela sua forma especial, em cone, tendo internamente a massa da planta pulverizada, ligeiramente comprimida contra suas paredes e o orifício de escoamento obliterado com algodão hidrófilo, funciona como um verdadeiro filtro.

Quando preparado por maceração, método usado por muitos fabricantes de refresco de guaraná, o macerato é submetido à filtração sobre amianto antes de ser evaporado. Com este produto, depois de devidamente titulado, prepara-se o refresco sem necessidade de nova filtração.

Desde que os elementos histológicos de guaraná não melhoram as qualidades do extrato fluido, por que exigir a sua presença neste produto si eles lhe dão mau aspecto e pode ser até a causa de sua fermentação?

Si o extrato fluido obtido por qualquer um dos processos mencionados não revela a presença de tais elementos, é obvio que o refrigerante e o xarope de guaraná, jamais os deverão apresentar.

São raríssimos, entre nós, os fabricantes que ainda preparam o refresco com o infuso de guaraná.

Tivemos oportunidade de preparar com as sementes trituradas de guaraná e o pó do bastão, extratos hidro-alcoólicos e infusos que, depois de filtrados devidamente e submetidos à centrifugação, não revelaram a presença de elementos histológicos.

As fábricas de bebidas bem instaladas usam filtros modernos de grande rendimento, a vácuo ou pressão, cuja filtração se processa atravez de fios de amianto ou de massas filtrantes especiais. Por esse método, que aliás devia ser adotado por todo industrial caprichoso, toda e qualquer substância insolúvel, por pequena que seja, é retida, obtendo-se um filtrado completamente puro e transparente sem alterar suas propriedades anteriores.

Entretanto si este produto for submetido a análise prévia, será forçosamente condenado por não revelar em exame microscópico a presença de elementos histológicos da "*Paullinia cupana*".

Somos de opinião que no caso do refresco de guaraná e do xarope, somente à Química competiria a sua aprovação ou condenação, dosando-lhes os componentes, principalmente a guaranina (trimetilxantina), nunca, porem, à Microscopia que os iria condenar precisamente quando se apresentavam com todas as características de ótimo produto.

A Microscopia só deveria decidir quanto à presença de impurezas, de cogumelos, de leveduras e de germes com vitalidade, auxiliada pela Bacteriologia.

Este é precisamente o ponto que julgamos falho e no qual se estribou a legislação em vigor para redigir o artigo referente aos refrigerantes denominados "guaranás".

No trabalho "Da Química Bromatológica do Guaraná", apresentado ao 2.º Congresso Brasileiro de Química e ao 3.º Congresso Sul Americano de Química, o ilustre químico F. Albuquerque, Diretor do Laboratório Bromatológico do Rio de Janeiro, lembra e salienta, entre outras sugestões apresentadas em seu projeto, a necessidade de serem encontrados no Exame Microscópico dos produtos de guaraná, os elementos histológicos da "*Paullinia cupana*".

Acreditamos que a dificuldade então existente na determinação e diferenciação da guaranina, considerada como isomera da cafeína, a estabilização de sua porcentagem e da dosagem das demais substâncias, fez com que se incluísse a presença dos elementos histológicos, afim de facilitar a conclusão em laudo de análise de produtos manipulados com a "*Paullinia cupana*".

O exame químico sendo, portanto, a via mais segura e ainda a prova mais satisfatória e racional no caso em apreço, deve ser o fator principal na decisão do resultado.

Algumas dúvidas existentes estão sendo estudadas nos Laboratórios do Instituto Adolfo Lutz e novos processos analíticos adotados, afim de que se tenha conseguido, oportunamente, normalizar o estado dúbio dessas provas com métodos seguros empregados para o exame químico dos produtos de guaraná.

Sobre o exame químico da "*Paullinia cupana*" está sendo publicado neste número da "Revista do Instituto Adolfo Lutz" um interessante trabalho de autoria do talentoso e competente colega Nelson

Cagno, que muito virá contribuir para a elucidação de falhas que ainda giram em torno do delicado problema do exame bromatológico dos produtos de guaraná.

O exame microscópico não deve nem pode, logicamente, prestar a sua contribuição para servir de argumento decisivo no resultado das análises destes produtos, enquanto não for modificado o artigo 168, do Regulamento do Policiamento da Alimentação Pública que tem o teor seguinte:

“Só poderá ser vendida com o nome de “Guaraná” a bebida refrigerante gazeificada ou não que contiver *não só* os princípios ativos *como os elementos histológicos* da “*Paullinia cupana*” e cuja porcentagem de guaranina (Trimetiloxantina) não for inferior a vinte miligramas (0,020), permitido, no máximo 0,5% (meio por cento) de álcool em volume”.

Devem ser excluídas desta frase as seguintes palavras sublinhadas: — *não só* — *como os elementos histológicos* — ficando com o teor seguinte:

“Só poderá ser vendida com o nome de “Guaraná” a bebida refrigerante gazeificada ou não que contiver os princípios ativos da “*Paullinia cupana*” e cuja porcentagem de guaranina, etc.”.

Excluída a exigência da presença dos elementos histológicos de guaraná, ter-se-á evitado o seguinte paradoxo:

— Si o produto for filtrado será positivamente condenado pelo Regulamento.

— Si não o for ou sofrer a adição posterior do pó, será aprovado de acordo com a lei, porem condenado pelo consumidor que o rejeitará, por considerá-lo, mui justamente, um produto inferior, de mau aspecto, com grande depósito e lembrando a alteração.

O refrigerante de guaraná deve ser preparado, segundo as respectivas fórmulas, com o extrato fluido de guaraná de boa qualidade.

Este extrato, obtido por maceração ou percolação somente *acidentalmente* poderá revelar a presença de elementos histológicos da semente de “*Paullinia cupana*”. A prova de filtração, por que passa, retém toda e qualquer partícula insolúvel em suspensão, restando o líquido completamente límpido e encerrando o teor máximo de princípios imediatos da droga.

Portanto, o refrigerante preparado com este extrato não se apresenta com depósito e não revela a presença de elementos histológicos de guaraná. Quando velho, este produto acusa um sedi-

mento vermelho escuro que, como já tivemos ocasião de referir, provem da oxidação de substâncias várias de que se compõe o extrato, submetido à ação do ar e da luz.

Ainda quando filtrado, o produto pode turvar-se e apresentar depósito, depois de algum tempo, ocasionado pelo crescimento de bactérias e leveduras, o que vem provar a falta de conhecimento técnico-científico na manipulação do produto.

O legendário mérito atribuído às múltiplas e benéficas propriedades da "*Paullinia cupana*" fez surgir entre nós a primeira fórmula do refresco efervescente, gaseificado, de guaraná, cabendo essa primazia ao eminente médico patricio Dr. Luiz Pereira Barreto.

Mais tarde, o saudoso e veneravel químico, professor Pedro Batista de Andrade, fez tambem uma fórmula da mesma natureza, que alcançou grande sucesso, sendo até hoje uma das mais conhecidas, divulgadas e de maior aceitação.

Várias fórmulas surgiram depois.

Hoje o comércio está repleto de um número infinito de marcas deste produto, na sua maioria, infelizmente, de qualidade inferior, apresentando visível fermentação, pela absoluta falta de assepsia na sua obtenção.

Daremos de um modo sucinto a preparação do refresco de guaraná, alguns conselhos úteis e indispensáveis na sua manipulação, esterilização, etc., afim de que uma grande parte dos industriais, no gênero, possa corrigir ou melhorar a técnica para a apresentação de um produto de classe.

Os componentes da fórmula comum dos refrigerantes de guaraná devem ser todos de ótima qualidade e pureza.

Na sua preparação, empregar-se-á, de preferência, o extrato fluido de procedência idônea, para se ter a facilidade de dosar a quantidade de guaranina (0,020%), podendo, entretanto, ser usados infusos, extratos ou solutos hidro-alcoólicos, etc., devidamente titulados e filtrados. Os demais ingredientes são dissolvidos em uma porção conhecida de água potavel, filtrados, sendo juntado, por fim, o xarope simples, tambem previamente filtrado. Tem-se assim uma mistura em cuja composição os ingredientes de uma fórmula (300 cc.) foram calculados e contidos num determinado volume da referida mistura (50 cc. por exemplo), que são colocados em cada garrafinha, completando-se esta com q.s. de água saturada de gás carbônico. Depois de fechadas devem ser submetidas à esterili-

zação, que pode ser feita a banho maria, por tindalização ou pasteurização, afim de destruir os germes vivos existentes no produto. O vasilhame, recipientes e garrafinhas devem ser muito bem lavados, passados em água fervente, ou submetidos à ação do vapor sob pressão. Existem hoje aparelhos modernos que facilitam extraordinariamente este trabalho de limpeza, lavagem e esterilização, economizando tempo e apresentando com eficiência e perfeição um serviço bastante penoso e de grande importância, com um reduzido número de operários. Poderemos, portanto, resumir em poucas palavras o método de preparação de um refresco de guaraná, isento de impurezas e fermentações:

- a) Usar ingredientes puros.
- b) Fazer filtração perfeita.
- c) Usar vasilhame, garrafinhas e recipientes limpos.
- d) Esterilizar o produto logo após seu fechamento.

Para terminar faremos, em resumo, as seguintes

CONCLUSÕES

- 1º) Os elementos histológicos de guaraná são típicos e facilmente indetectáveis ao microscópio.
- 2º) Os extratos de guaraná, devidamente filtrados não apresentam estes elementos, são completamente límpidos e transparentes.
- 3º) A presença dos elementos histológicos da "*Paullinia cupana*" não aumenta o teor dos princípios imediatos desses extratos. É, portanto, desnecessária, absurda e prejudica o aspecto do produto.
- 4º) Expostos à ação do ar e da luz, os extratos de guaraná se tornam opalescentes, turvos e adquirem, por vezes, depósito volumoso, devido a oxidação e precipitação de alguns de seus princípios mais ou menos alteráveis.
- 5º) Examinado ao microscópio este sedimento não revela a menor semelhança com os elementos histológicos da semente do guaraná.
- 6º) O refrigerante de guaraná, preparado com o extrato, não revelará a presença de tais elementos. Si os apresentar,

é porque o produto não foi filtrado ou foi preparado com infuso ou extrato, em cuja obtenção não foram seguidas as regras da técnica farmaco-química.

- 7º) O refrigerante de guaraná ou, separadamente, seus componentes, devem ser previamente filtrados, isentos portanto de substâncias insolúveis e de impurezas.
- 8º) O produto filtrado pode somente apresentar depósito:
 - a) quando submetido a uma esterilização imperfeita, dando lugar ao crescimento de germes e leveduras;
 - b) quando se tratar de produto de fabricação antiga, provindo, neste caso, o depósito, do extrato de guaraná, devido a combinações de natureza bio-química, ulteriores ao engarrafamento do produto.
- 9º) A ausência de elementos histológicos nos produtos de guaraná foi quasi absoluta em 48 amostras examinadas durante o ano de 1941, pela sub-seccção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.
- 10º) O exame microscópico não pode decidir do resultado das análises destes produtos, pois os irá condenar pela ausência de elementos histológicos, de acordo com a lei vigente, quando se fazia necessária a sua aprovação. A Microscopia só deverá opinar quanto à presença de impurezas e de leveduras e germes com vitalidade — neste caso — auxiliada pela Bacteriologia.
- 11º) Ao exame químico deverá competir a aprovação ou condenação dos produtos de guaraná, pela pesquisa e dosagem dos seus componentes, principalmente da guaranina (trimetilxantina).
- 12º) À vista do exposto, o artigo nº 168 do Regulamento do Policiamento da Alimentação Pública deve ser alterado, excluindo-lhe a exigência da presença dos elementos histológicos da "*Paullinia cupana*" nos refrigerantes denominados "Guaranás".

ABSTRACT

- 1º) The histologic elements of Guaraná are typical and can be easily identified by the microscope.

- 2º) The extracts of guaraná, duly filtered do not show these elements, being completely clear and transparent.
- 3º) The presence of histologic elements of the "*Paullinia cupana*" does not increase the value of the immediate principles of these extracts. It is, therefore, unnecessary, absurd and prejudices the aspect of the product.
- 4º) When exposed to the air and light, the extracts of guaraná turn opaline, troubled and sometimes form a voluminous deposit, because of the oxidation and precipitation of some of their more or less alterable principles.
- 5º) When examined under the microscope, this precipitation does not present the smallest likeness with the histologic elements of the seed of guaraná.
- 6º) The guaraná used as a refrigerant, prepared with the extract, will not show the presence of such elements. If it does, it is because the product has not been filtered or it was prepared with infusion or extract, in the preparation of which the rules of the pharmaco-chemical technique were not followed.
- 7º) The guaraná refrigerant, or separately, its components must be previously filtered, being therefore free of insoluble and impure substances.
- 8º) The filtered product may only present a deposit:
 - a) when the sterilization was not complete, giving the germs and yeasts a chance to grow.
 - b) when the product of fabrication is old, and in this case the deposit of the extract of guaraná is due to the bio-chemical combination, posterior to the bottling of the product.
- 9º) The absence of histologic elements in the products of guaraná was almost absolute in 48 samples examined during the year of 1941, by the "Sub-seção de Microscopia alimentar" of the "Instituto Adolfo Lutz".
- 10º) The microscopic examination cannot decide about the result of the analysis of these products; as they will be condemned by it because of the absence of histologic elements, according to the laws in force, when they should be approved. The microscopical examination has only

value when impurity and yeasts and living germs are present, in this case, helped by the bacteriology.

- 11º) The chemical examination is to approve or condemn the products of guaraná, by analysing and dosing their components, specially of the guaranine (Trimetilxantine).
- 12º) In conclusion, the article n.º 168 of the "Regulamento do Policiamento da Alimentação Pública". must be changed, excluding the exigence of the presence of histologic elements of the "*Paullinia cupana*" in the refrigerants named "Guaranás".

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Dr. Francisco — Da Chimica Bromatologica do Guaraná
- CARNEIRO, Paulo E. de Berredo — Le Guarana et *Paullinia cupana* H. B. & K.
Contribution a l'Etude des Plantes a Cefeine.
- CORRÊA, M. Pio — 1909, *Flora do Brasil*, pg. 94.
- FARIA e SOUZA — 1912, *Chácaras e Quintais*, v. V, n.º 6.
- HOENE — Plantas Medicamentosas e venenosas do Brasil.
- HUMBOLDT et BONPLANT — 1821, *Nova genera et species*.
- MARTIUS, C. F. P. — 1843, *Systema Materiae Medicæ Vegetabilis Brasiliensis*.
- MENEZES, J. A. Cardoso — *Rev. da Associação Com. do Amazonas*, XVIII, n.º 157.
- MOREIRA, Dr. A. A. Santos — Formulário de Terapêutica Infantil
- PECKOLT, Th. — 1886, *Guarana oder Uarana — Sitzungsberichte de Kais. Akadem. Zuwien*.
- PINTO, Joaquim de Almeida — 1873, *Dicionário de Botânica Brasileira*, pg. 222.
- RICHAUD, A. — 1921, *Precis de Therapeutique et Pharmacologie*.
- RIEDEL, Farm^{co}. Oswaldo — 1936, *Revista da Flora Medicinal*, II, p. 440.
- SILVA, Rodolpho Albino Dias da — *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*.
- TSCHIRCH — Finn Kolle — 1918, *Schweizerisch Apotheker Zeitung*, n.º 35, pg. 445.
- VASCONCELLOS, J. M. de — 1905 — *Elementos de Pharmacia*.

SOBRE ALGUNS ASPÉCTOS IMPORTANTES DO GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*) (*)

(Estudo e caracterização do seu alcalóide)

NELSON CAGNO

Técnico de laboratório do Instituto Adolfo Lutz

INTRODUÇÃO

O Guaraná, vegetal nativo tipicamente americano, é característico da zona Norte da América do Sul. Medra particularmente em zonas de terras húmidas, da região do Vale do Orenoco, Venezuela, do Baixo Amazonas e nas margens do Madeira inferior.

Foi quasi que simultaneamente estudado por Humboldt e L. Martius. Entretanto, a denominação dada por Humboldt tem atualmente preferência sobre a *Paullinia sorbilis*.

O Guaraná é uma Dicotiledônea da família das Sapindáceas, estudada com o nome de *Cupana* no gênero das *Paullinias*.

Segundo umas notas obtidas com A. Cownlay Slater (E. E. M.) o vegetal atinge muitas vezes 10-12 metros de altura. Esta é a razão pela qual o referido autor apresenta a sugestão de que as culturas orientadas do Guaraná devem ser feitas em lugar descampado para que haja maior eficiência.

A planta, desenvolvida da semente, necessita em média de 4-5 anos para produzir o fruto. No entanto, uma muda tirada diretamente de outra árvore, tendo um tratamento adequado, pode produzir a primeira colheita em dois anos.

O solo propício para o cultivo do Guaraná deve ser húmido e argiloso, tal como é nas regiões dos Maués.

O fruto acha-se localizado dentro de um tegumento, do qual pode ser retirado facilmente.

(*) Recebido para publicação em 14-2-1942.

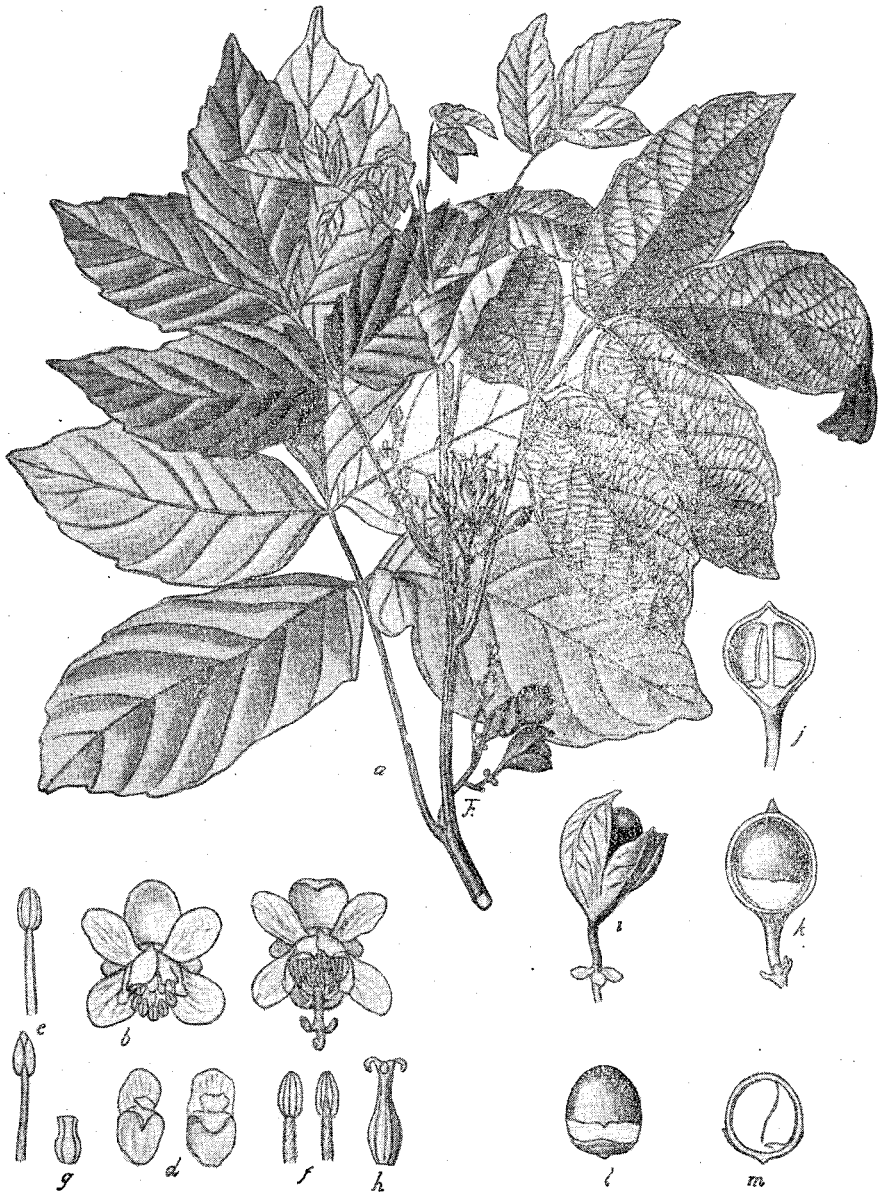


FIG. 1
"Paulinia cupana"

Planta do guaraná com detalhes botânicos.

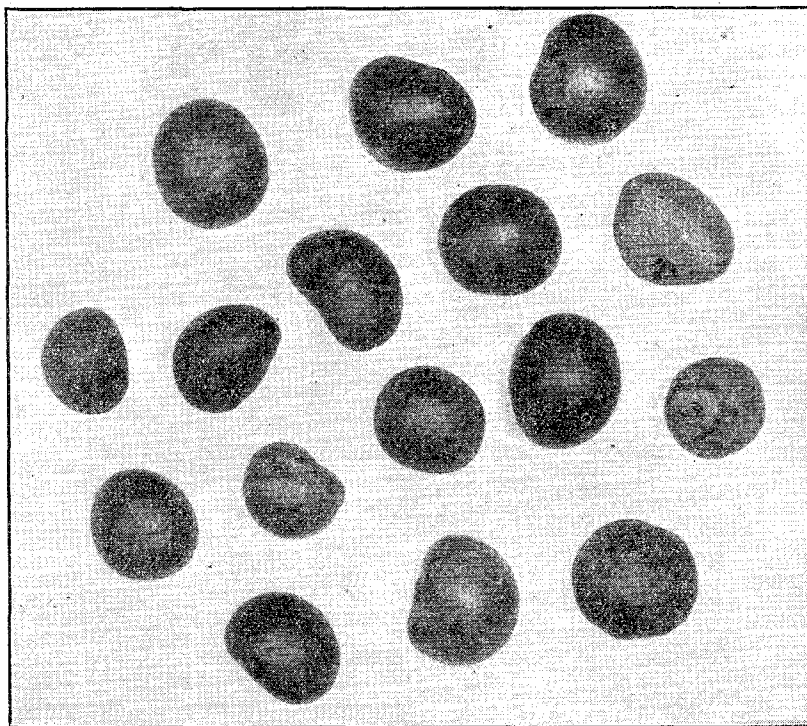


FIGURA 1
Fruto do Guaraná.
1:1,5.

As primeiras notícias do exame químico do Guaraná foram dadas por Théodor Martius, o qual retirou uma substância branca, amarga, cristalizada em agulhas e que possuía notável ação fisiológica. A este composto ele deu a denominação de Guaranina.

Posteriormente, Berthemot e Deschastelus estudaram a Guaranina de Martius. Após uma série de experiências, concluíram os referidos autores, que a Guaranina nada mais era que a Cafeina, visto os referidos alcalóides apresentarem as mesmas características.

Martius, entretanto, continuando suas experiências, procedeu a análise elementar. Os resultados obtidos foram comparados com a Cafeina e observou Martius que eles eram idênticos. Este fato o levou a supor que os referidos alcalóides eram isômeros.

As primeiras dosagens do alcalóide foram feitas por Stenhouse (1857), Peckolt (1865), Greene (1877), Feemster (1883)...

Schär, em 1890, assinalou um alcalóide que se assemelhava à morfina. Nierestein, em 1910, noticiou a presença de um alcalóide diferente da Cafeina, Teobromina, etc., o qual denominou β Guaranina.

Neste trabalho estudaremos com algum detalhe a parte físico-química e química do fruto do Guaraná, porem analisaremos mais detidamente a parte referente ao alcalóide presente.

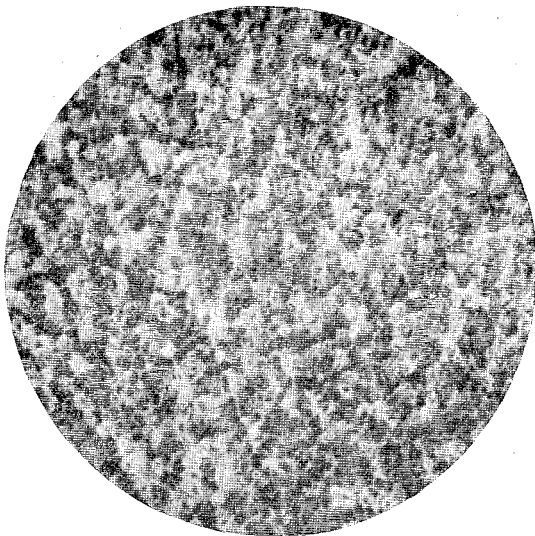


FIGURA 2

Corte longitudinal do fruto do guaraná com 200 aumentos obtido no banco metalográfico de Reichert.

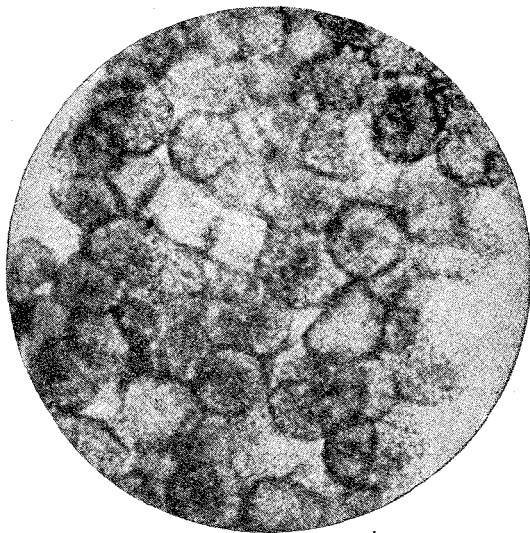


FIGURA 3

Corte transversal do fruto, fotografado por transparencia. aumento 1:200.

CORANTE DO GUARANÁ

Nas partes vegetais da planta do Cacau, Nós de Cola e do Guaraná, foi assinalada há algum tempo a presença de um corante vermelho, que se apresenta na forma de uma substância amorfa, de sabor adstringente, muito pouco solúvel no éter etílico, insolúvel no éter de petróleo e clorofórmio, porém bastante solúvel nos alcoóis.

O corante do Guaraná deriva de uma substância mãe incolor, que se transforma facilmente no corante vermelho, quando se aquece com ácido clorídrico em solução alcoólica.

Isto se verifica, possivelmente devido a um fenômeno de hidrólise. Os corantes encontrados no Cacau, na Nós de Cola e no Guaraná são bastante semelhantes e, possivelmente, possuem a mesma constituição química.

Hilge e Lazzarus atribuem ao corante do cacau a fórmula $C^{17}H^{40}(OH)^{10}$. De maneira análoga ao Guaraná, forma-se no Cacau e na Nós de Cola uma substância marron.

Enquanto que o corante é muito solúvel no álcool produzindo uma coloração vermelho escuro em meio ácido, violeta em meio nêutro, e esverdeado em meio alcalino, a substância marron é pouco solúvel no álcool, sendo porém bastante solúvel em meio aquoso ligeiramente alcalino.

E' importante assinalar que as partes mais ricas em cafeína são justamente as que fornecem maior quantidade do corante.

Berredo Carneiro indica várias técnicas para a extração do referido corante, sendo que todas elas se processam a frio, pelo sistema de percolação. Nós, extraímos o corante baseados no mesmo princípio físico, porém a quente. A técnica por nós usada foi a seguinte:

Num aparelho de Soxhlet, carregámos um cartucho com Guaraná em pó e procedemos a extração com éter etílico das substâncias resinosas, clorofila, etc., durante 6 horas. Retirámos o solvente, secamos o aparelho e procedemos nova extração com clorofórmio durante 6 horas, afim de eliminar o alcalóide. Finalmente, usámos como solvente do corante uma solução de ácido clorídrico a 3% em álcool etílico absoluto.

Procedemos a extração e obtivemos como produto final um belo corante vermelho carregado, precipitável pela água e redissolúvel pelo álcool.

Supõe-se que o corante forma-se concomitantemente com o alcalóide e, nestas condições, será importante estudar a relação existente entre a porcentagem do alcalóide e a do corante.

As pesquisas microscópicas referentes a essa questão estão sendo feitas pelo ilustrado colega J. B. Menezes Júnior.

Traçámos no Fotômetro de Pulfrich Zeiss uma curva de transparência, usando cubetas de 2-, 1-, 0,5 cms., operando em todos os filtros, conforme indica figura infra.

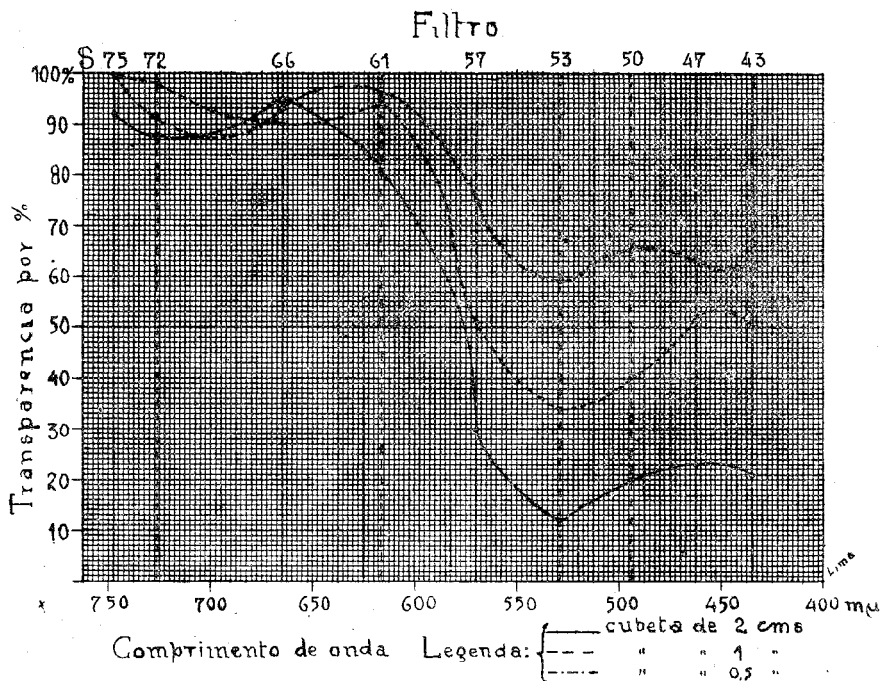


FIGURA 4

PESO MÉDIO DAS SEMENTES

Para determinação do peso médio, usámos a seguinte técnica:

— Tomámos 1.000 gramas da semente e fizemos um monte circular tão uniforme quanto possível; em seguida, separámos o monte em duas partes e cada parte pela sua metade. Tomámos as quartas partes opostas pelo vértice e fizemos um monte único. Repetimos a operação acima descrita por mais quatro vezes.

Procedemos, em seguida, a pesagem das sementes em grupos de cinco. Obtivemos os seguintes resultados:

Pesagem	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.	8a.	9a.	10a.	11a.	12a.	13a.	14a.	15a.
Relação	0,3313	0,4584	0,4067	0,4081	0,4269	0,4964	0,5298	0,4801	0,3804	0,5032	0,4843	0,5014	0,3913	0,4813	0,5000
Peso $\frac{1}{5}$ gr.															

Peso Médio 0,457 grs. *Peso Máximo* 0,529 grs.

Peso Mínimo 0,331 grs.

$$\text{Diferença entre: } \frac{P}{MA} - \frac{P}{MI} = 0,198$$

DENSIDADE MÉDIA

A densidade do fruto foi feita pelo método do Picnômetro.

O processo para a preparação da amostra obedece ao mesmo critério que a usada para o cálculo do peso médio.

Calculamos a densidade com relação à água a 20°C..

$$\begin{array}{r} \text{RESULTADO} \\ \text{Densidade} \quad \text{—————} \quad 1,24 \\ \text{H}_2\text{O} \end{array}$$

MARCHA DAS OPERAÇÕES

Todas as determinações Físico-químicas e Químicas foram realizadas com guaraná oriundo do Amazonas, maduro, descascado e em forma de pó bastante fino, obtido em moinho de aço.

ÁGUA E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS A 100°C. — CINZAS

10 grs. de guaraná foram pesadas numa cápsula de porcelana, seca e previamente tarada e colocada numa estufa a +100°C., durante 8 horas. Findo esse lapso de tempo, a cápsula foi transferida para um secador, a Cl²ca onde permaneceu 6 horas e, em seguida, pesada. Obtivemos então o resultado correspondente à água e substâncias voláteis a +100°C..

A cápsula contendo o guaraná seco foi calcinada, primeiramente num Bico de Mécher, e, posteriormente, levada para o forno elétrico na temperatura de 550 — 600°C..

Pesámos e determinámos as cinzas totais.
Verificámos também a alcalinidade das cinzas solúveis.

RESULTADOS

Água e substâncias voláteis a +100°C.	10,56%
Cinzas totais	1,80%
Cinzas insolúveis na água	0,88%
Cinzas insolúveis na água e por diferença	0,92%
Alcalinidade das cinzas avaliada em C03K2	0,48%

COMPOSIÇÃO DAS CINZAS

Procedemos nas cinzas do guaraná as pesquisas referentes aos elementos metálicos e metalóidicos por via espectrométrica.

Operando debaixo das mesmas condições procedemos a obtenção de cinzas do café, mate e chá preto, imprimimos os respectivos espectogramas numa mesma chapa e comparámos os resultados.

O Espectógrafo usado é marca Zeiss, modelo III para químicos, com objetiva de foco 60 cms., para radiações que atinge a parte média da chapa — 2.500 U. A., o feixe emergente cobre uma extensão de 16 cms. aproximadamente, abrangendo a região espectral que vai de 2.000 até 5.000 Å. O sistema dispersivo é constituído por 2 prismas de 30° um de quartzo direito e outro esquerdo, colados, por uma face (Prisma de Cornu).

A objetiva do colimador tem uma distância focal de 403 mms., e a fenda é constituída de duas lâminas móveis, permitindo uma abertura da ordem de alguns microns.

Junto da fenda foi adaptado o diafragma de Hartman para dividir o feixe luminoso.

Procedemos os espectogramas por duas maneiras:

- A) Espéctro de Faisca;
- B) Espéctro de Arco.

No primeiro processo operámos debaixo das seguintes condições:

Voltagem	12.000 kV
Capacidade	5.700 cm.
Tempo de exposição	5 segs.
Tempo na revelação	5 minutos

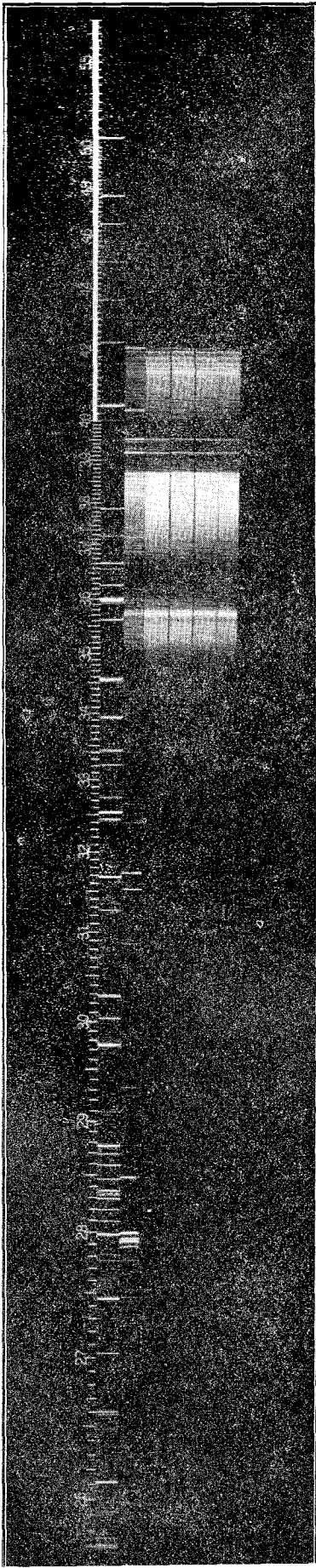


FIGURA 5
Espectrograma de faisca.

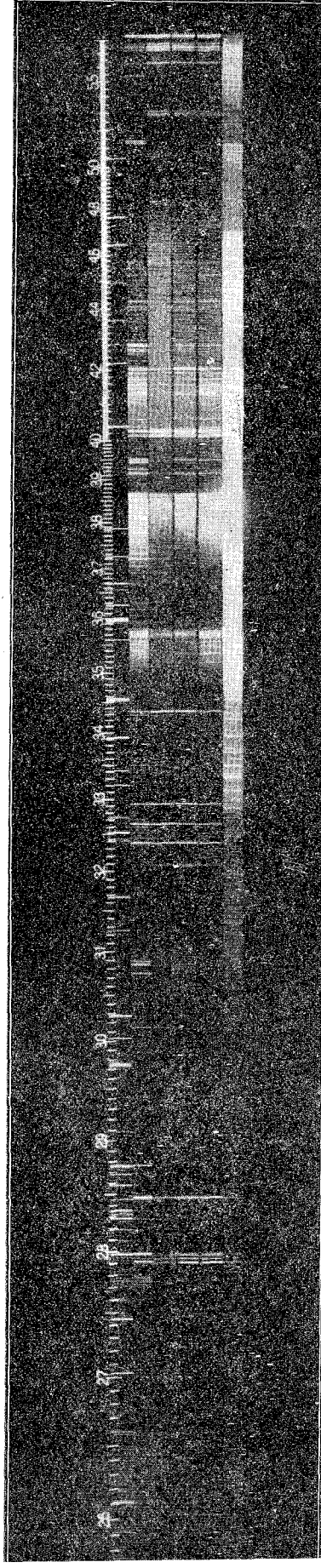


FIGURA 6
Espectrograma de arco.

Serviram de electrodos, carvões especiais para exame espectrográfico. Esse processo, entretanto, não nos satisfez, visto notarmos ausência de grande número de raias.

Procedemos posteriormente o espectrograma de arco, operando debaixo das seguintes condições:

<i>Espectro — N°</i>	<i>Material do Electrodo</i>	<i>Tempo</i>
1	Liga de referência	5 segs.
2	Guaraná	" "
3	Café	" "
4	Chá preto	" "
5	Mate	" "
6	Carvão	" "

Abertura da fenda { Liga .. 0,02 mms. Chapa — Iso Crom
 Ensaios. 0,015 mms. Tempo de revelação = 5 minutos

ELEMENTOS ENCONTRADOS

<i>Produto</i>	<i>Em apreciavel quantidade</i>	<i>Em quantidade regular</i>	<i>Vestígios</i>
Guaraná .	Al — Ca — Cu — Mg K — Na — Si — P — Ti	B — Mn — Sr	Fe
Café ...	Cu — K — Na	P — B — Ca	Si — Fe
Chá preto	Cu — K — Na	B — Sr — Ca — Ti	Mg — Mn — P Fe — Al
Mate ...	Cu — K — Na	B — Sr — Ca — Mg	Fe — P — Si

Para a caracterização dos elementos, usamos a técnica de Oscar Bergstrom Lourenço do I. P. T..

Dos quatro compostos, o guaraná é o que qualitativa e quantitativamente apresenta resíduo mineral mais rico, sendo interessante notar o elevado teor de Fósforo e Titânio presentes.

ACIDEZ TOTAL

Técnica Sampaio Mello

Para a determinação da acidez total, usámos a seguinte técnica: Num balão volumétrico de 200 cc., colocámos 10 grs. de guaraná e completámos o volume com álcool nêutro a 90°, agitámos o frasco durante 15 minutos e deixámos em repouso durante 24 horas. Após a filtração, pipetámos 10 cc., colocámos 3 gotas de solução alcoólica de fenolftalina a 1% e titulámos com OH Na N 1/100.

RESULTADO

Acidez total em soluto normal por cento 21,0

NITROGÊNIO TOTAL

A dosagem do nitrogênio total foi feita pelo processo de Kjeldahl, operando-se sobre 1 grama do produto.

Procedemos uma série de 5 determinações e obtivemos os seguintes resultados:

<i>Dosagens</i>	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a
<i>Resultados</i> ...	2.76	2.74	2.75	2.73	2.74

Média aritmética 2,74% *Resultado máximo* 2,76%
Resultado mínimo 2,74% *Diferença Rma — Rmi* . 0,02%

LIPIDIOS

Observámos quando tentámos a separação do corante do guaraná, pelo éter de petróleo, um depósito gorduroso, amarelo-esverdeado, emulsionavel pela água quente.

Igualmente, quando procedíamos a dosagem do alcalóide do guaraná, usando como solvente o clorofórmio, observámos novamente que, juntamente com o alcalóide, aparecia entre outras substâncias, um corpo graxo que a impurificava.

Para a separação e a dosagem dessa substância graxa, usámos a seguinte técnica: “20 grs. de guaraná foram submetidas à extração com éter de petróleo no aparelho de Soxhlet, durante 12 horas em baixa temperatura. Terminada a operação, evaporou-se o éter de petróleo. O resíduo era composto de cafeína e substâncias graxas.

Tratou-se por água quatro vezes, para separar por solubilidade a cafeína das substâncias graxas. Em seguida, filtrou-se em filtro molhado. Lavou-se rapidamente o balão do aparelho com um pouco de éter de petróleo para retirar os restos de matérias graxas, e passou-se para o filtro. Em seguida, lavou-se o filtro com 50 cc. de éter de petróleo, recolhendo-se os extratos etéreos numa cápsula tarada. Eliminaram-se os últimos traços de água e éter por uma corrente de CO₂ previamente seca. Em seguida, secou-se e pesou-se.

Procedemos posteriormente a determinação da densidade e índice de refração.

RESULTADO

Substâncias graxas	2,75 grs.%
Índice de refração a 25°C. ..	1,475
Densidade	0,832

DOSAGEM DO ÁCIDO PAULINO TÂNICO

Técnica de TAYLOR'S — A duas grammas de guaraná finamente pulverizado, adicionámos dez cc. de água e homogeneisámos durante uma hora.

Adicionámos 25 cc. de álcool a 90° e homogeneisámos por mais 30 minutos. Filtrámos e lavámos com álcool a 90°. Levámos o filtrado com o lavado (\pm 50 cc.) à ebulição e adicionámos 6 cc. de uma solução saturada de acetato de chumbo.

Separámos o precipitado de Paulino-tanato de chumbo por uma centrifugação, decantando o líquido através de um filtro tarado.

Repetimos o tratamento da centrifugação duas vezes com álcool a 90°, decantando cada vez, através do filtro. Transferimos o precipitado para o filtro e lavámos de modo a eliminar o excesso de sal de chumbo. Lavámos com éter, secámos a 100°C e pesámos.

O peso multiplicado pelo fator de transformação do Paulino-tanato de chumbo em ácido Paulino tânico que é 0,516 nos deu o teor por cento do ácido Paulino-tânico.

RESULTADO

Ácido Paulino tânico	8,72 grs.%
----------------------------	------------

ESTUDO CRISTALOGRAFICO DO ALCALÓIDE DO GUARANÁ

Isolámos o alcalóide do Guaraná por quatro processos diferentes, processos esses que serão posteriormente descritos.

O estudo comparativo das cristalizações de vários compostos, embora não apresente isoladamente uma condição "sine qua non", para a conclusão definitiva, no estabelecimento da identidade química de uma substância, possui entretanto grande valor, desde que esteja associado a outros métodos específicos.

A cristalização se efetua, quando as moléculas do corpo se reúnem em ordem regular, formando sólidos que afetam diferentes formas geométricas.

A teoria matemática da cristalização é uma das ciências físicas mais bem fundamentadas.

Partindo do princípio que a estrutura cristalina reside no agrupamento molecular, foi possível estabelecer uma perfeita classificação cristalográfica, bem como também, as propriedades comuns a cada grupo de cristais.

As direções das faces dependem da disposição molecular.

É por esse fato que apenas os corpos simples ou compostos perfeitamente definidos formam cristais.

A estrutura externa que condicionam as formas cristalinas não se supõe ser a da molécula química, mas sim a de um agrupamento molecular, abrangendo um certo número de moléculas químicas.

Aplicámos em nosso trabalho o estudo comparativo das cristalizações do alcalóide do Guaraná com Cafeína.

Para isto, empregámos técnicas diferentes, para a obtenção de um mesmo composto.

É justamente debaixo desse prisma que encarámos nossos trabalhos.

Si, por caminhos diferentes, chegámos a um mesmo ponto, é portanto evidente que esse ponto é comum a todas as trajetórias.

Isto é a corroboração do nosso trabalho.

Usámos para a preparação das lâminas dois processos:

1.º) Por sublimação.

2.º) Por solubilização e evaporação lenta do solvente.

Os dois processos ofereceram bons resultados e tivemos oportunidade de bater micro-fotografias por ambos os métodos.

Usámos um microscópio Reichert modelo grande com iluminação elétrica, e, em todas as operações usámos filtros verdes e amarelos, visto oferecerem estes maior relevo.

Primeiramente sublimámos diretamente numa lâmina uma cafeína quimicamente pura.

A operação foi conduzida o mais lentamente possível, afim de fornecer cristais maiores.

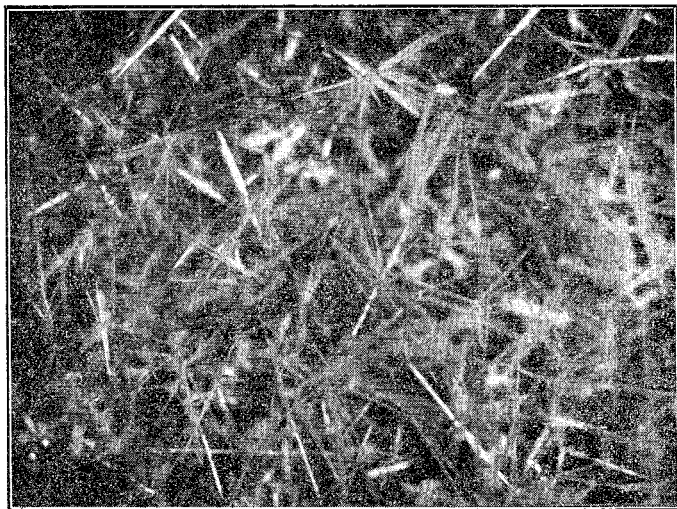


FIGURA 7

Obtivemos assim um belo aglomerado de cristais.

Com aumento de 10 diâmetros obtivemos os cristais que mostram a forma seguinte: (Fig. 7).

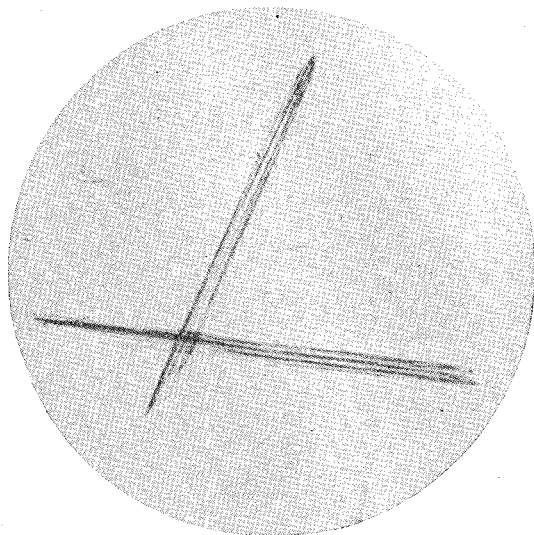


FIGURA 8

Do aglomerado de cristais de cafeína, obtido por sublimação, separámos cuidadosamente dois cristais, colocámos no Bálsamo de Canadá e, com um aumento de 75 vezes, obtivemos o seguinte aspecto: (Fig. 8).

Posteriormente, sublimámos numa lâmina uma pequena quantidade do alcalóide do Guaraná. Examinámos cuidadosamente, usando luz amarela e, com 75 aumentos, obtivemos o que se vê no cliché seguinte: (Fig. 9).

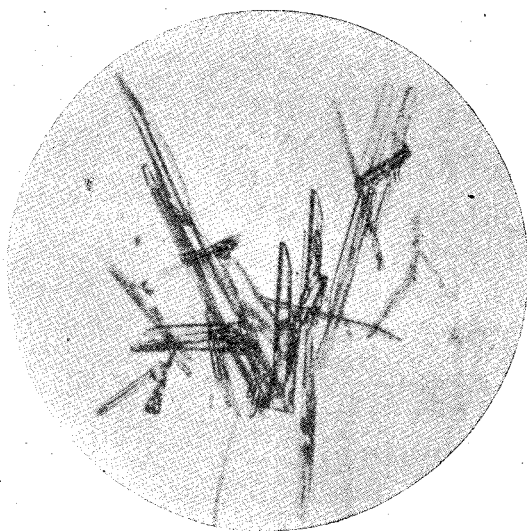


FIGURA 9

Procedemos em seguida à preparação de uma nova série de lâminas, obtendo entretanto a cristalização por meio de solventes e conseqüente evaporação lenta.

Usámos como solvente o clorofórmio.

Afim de que a evaporação fosse bastante lenta, colocámos as lâminas com as soluções saturadas de alcalóide, numa atmosfera saturada de vapores de clorofórmio.

Tivemos assim uma cristalização bastante satisfatória.

Examinámos ao microscópio com luz amarela, com 75 aumentos, para o alcalóide do Guaraná, a 50 aumentos para a cafeína, como se vê abaixo:

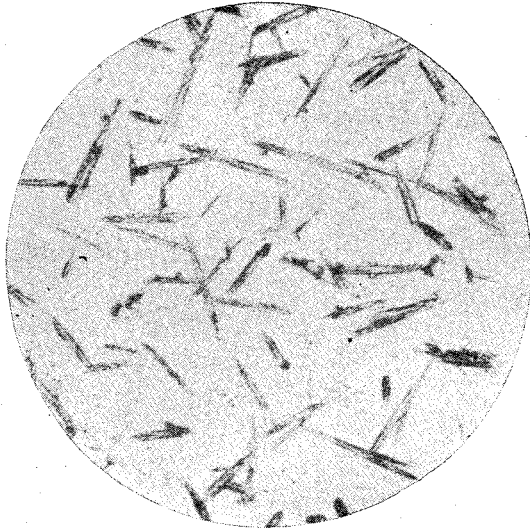


FIGURA 10
Alcalóide do guaraná.

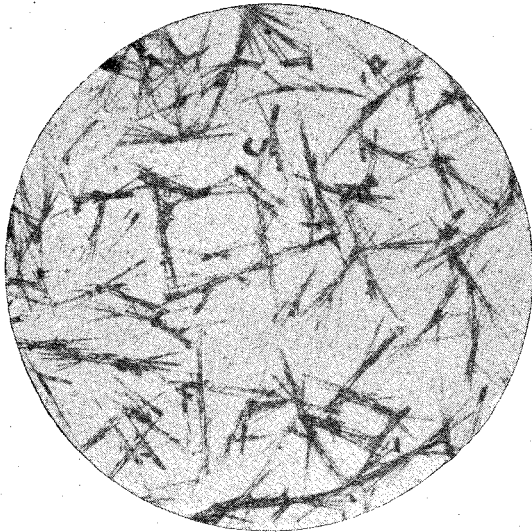


FIGURA 11
Cafeína.

Examinámos cuidadosamente ao microscópio os cristais de ambos os alcalóides, variando as condições, tais como: com e sem luz polarizada, variação de filtros, etc..

O exame cristalográfico comparativo, entre a cafeína e o alcalóide extraído do Guaraná, não revela como vimos diferença entre os cristais.

Pelo exame cristalográfico, verificou-se quer tratando-se do alcalóide-cafeína, ou daquele extraído do Guaraná, ser a mesma substância ou, na hipótese de se estar em presença de substâncias diferentes, elas se comportam de maneira absolutamente idêntica.

Mais adiante, mostraremos que outras propriedades coincidem também, e de tal modo, que estamos inclinados a supor tratar-se de substâncias idênticas.

CONFRONTO ESPECTRO-ABSORÇÃO ENTRE O ALCALÓIDE POR NÓS EXTRAÍDO DO GUARANÁ E CAFEÍNA QUIMICAMENTE PURA

Operámos em solução aquosa a 0.010 grs. por cento. Verificámos que soluções mais concentradas não se prestavam a determinações espectrográficas, trabalhando com espectros de absorção na zona ultra-violeta, compreendida entre 2.200 a 4.000 Å.

Usámos como fonte excitadora, luz de tungsteno.

Os espectros foram imprimidos em chapa 13x18, Anti-Halo, ortocromática Kokak. Imprimimos o espectro de Tungsteno durante 6 segs..

Operámos em ambos os casos, nas mesmas condições, isto é: em uma mesma chapa imprimimos 23 espectros, sendo o 1º e o último tão somente de tungsteno.

Os outros 21 espectros foram obtidos com a mesma fonte de excitação, porem intercalados de cubetas de 0,2 até 10 cms. usando as respectivas cubetas de compensação.

Em todos os casos os elementos usados foram os seguintes:

Voltagem	12.000 kv
Capacidade	6.000 cms.
Fenda	0,02 mms.

Tempo de exposição { Para as soluções 60 segs.
 { Para o Tu 6 segs.

Setor rotativo — 120 revoluções por minuto, com 10% de absorção.

Tempo de revelação — 5 minutos.

Os espectrogramas obtidos foram os que se seguem:

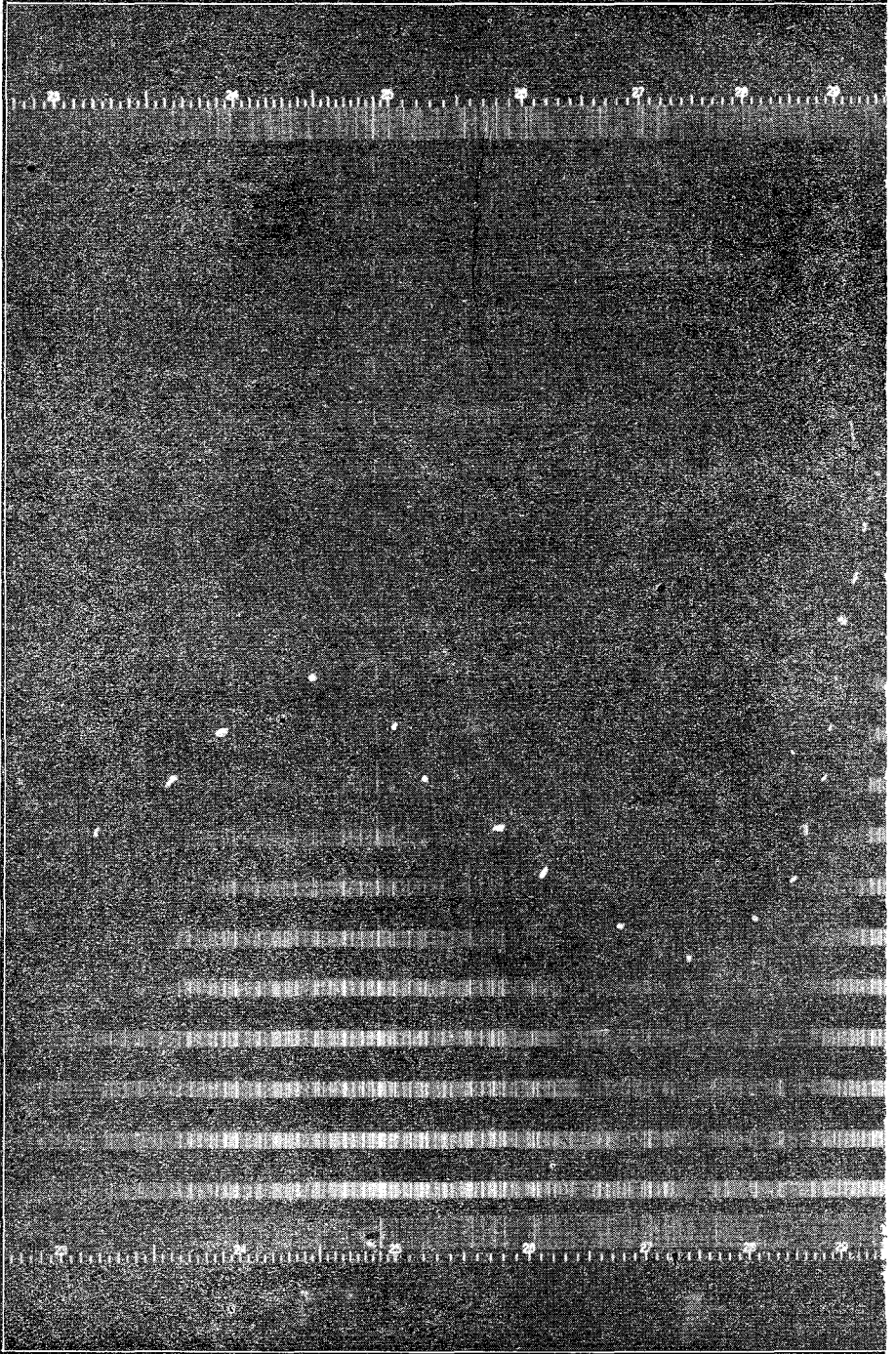
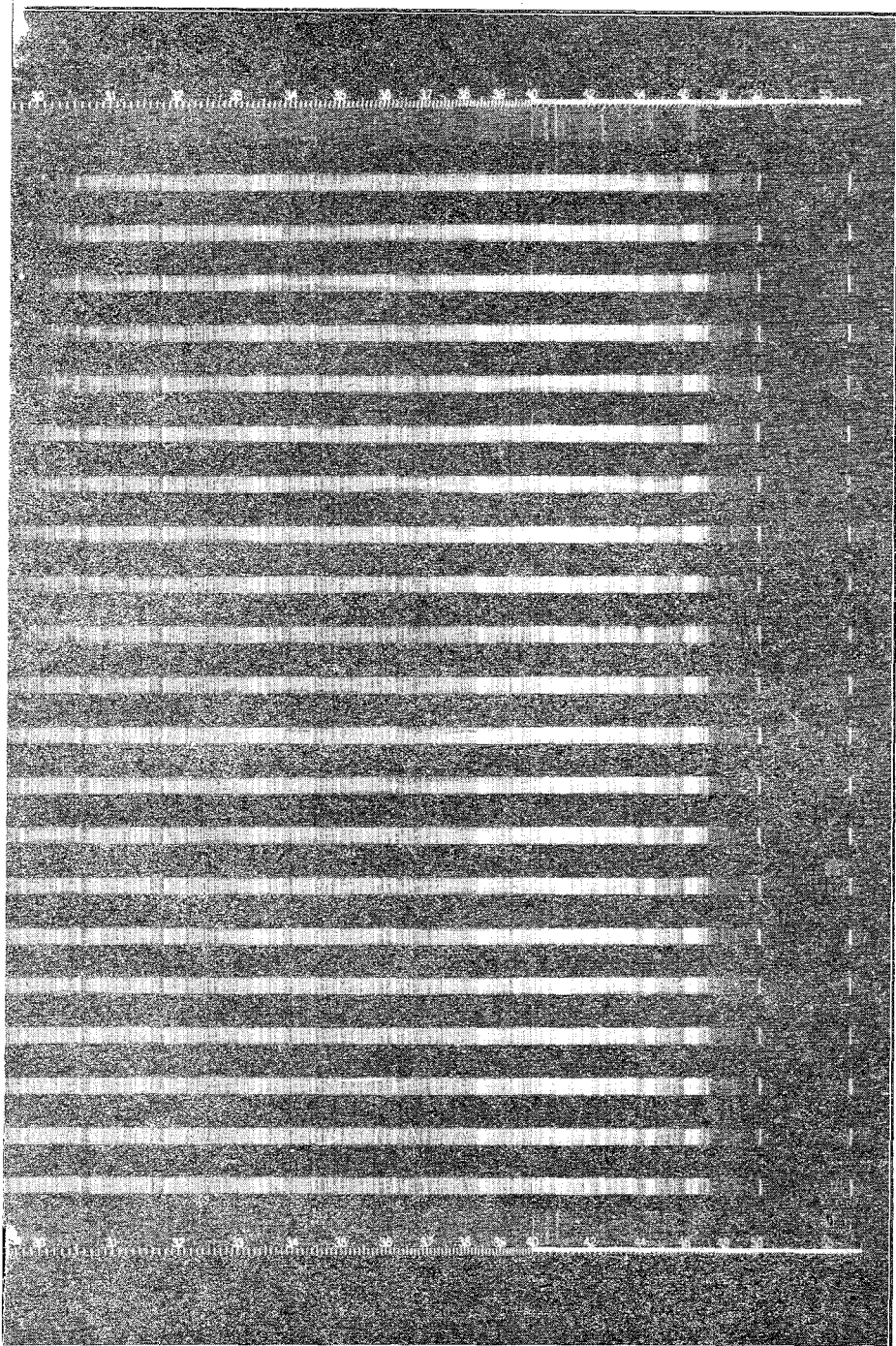


FIGURA 12
Guaraná



A simples observação das fotografias acima nos mostra claramente que há absoluta semelhança entre o espectro obtido com a cafeína pura e o extraído do Guaraná, senão vejamos:

Em ambos os casos e conformação das curvas é idêntica e, o que é mais importante, em ambos os casos o máximo das curvas estão colocadas sobre a ordenada de 2.450 \AA , e o mínimo na ordenada de 2.730 \AA . Esses valores correspondem a um máximo e um mínimo de absorção, segundo os elementos fornecidos pelas chapas.

É sabido que pequenas modificações na constituição de um corpo acarretam grandes modificações na curva espectrográfica, quando examinado sob o aspecto da absorção.

Ora, no caso presente, deparamos com dois espectrogramas absolutamente semelhantes.

SOBRE UM ALCALÓIDE ASSINALADO POR NIERESTEIN

Nierestein, procedendo algumas experiências, sobre o Guaraná, assinalou a presença de um alcalóide que, pelas suas propriedades gerais, diferia da cafeína.

Este fato o levou a supor que se tratava de um outro tipo de alcalóide, que se formava concomitantemente com a cafeína.

Posteriormente, Berredo Carneiro procedeu, na Faculdade de Ciências de Paris, experiência referentes ao citado alcalóide. Operando sobre o mesmo método, chegou a um produto final cujo ponto de fusão acusou $222^{\circ} - 223^{\circ} \text{ C.}$

Nierestein obteve este composto cristalizável em agulhas e com um ponto de fusão igual a $217^{\circ} - 219^{\circ} \text{ C.}$

Entretanto, observando e procedendo o método por ele empregado, deduzimos que o mesmo não se preocupou em levar a cabo uma purificação mais cuidadosa e um maior número de determinações das constantes físicas.

Essa alcalóide foi descrito por Nierestein com o nome de β -Guaranina.

Berredo levou a cabo a purificação do composto obtido pelo método de Nierestein, determinou o ponto de fusão, procedeu a reação de murexida e comparou com a cafeína.

	<i>Ponto de fusão</i>	<i>Reação de Murexida</i>
Cafeína	$235^{\circ} - 236^{\circ} \text{ C.}$	positiva
β -Guaranina ..	$235^{\circ} - 236^{\circ} \text{ C.}$	positiva

O referido autor concluiu muito bem, supondo que Nierestein tivesse operado em presença de impurezas.

Nós, igualmente, empregamos a técnica de Nierestein, que era a seguinte:

20 gramas de Guaraná finamente pulverizados são digeridos por três vezes sucessivas ao banho-maria, com 50 cc. de álcool a 95°, contendo 1/2 cc. de ácido clorídrico concentrado.

Os extratos fortemente coloridos de um belo vermelho são reunidos e neutralizados cuidadosamente, após o resfriamento, por amoníaco.

Finda essa neutralização, observa-se que um produto marron-avermelhado se deposita. Separa-se por centrifugação e redissolve-se em álcool fervente. A essa solução colorida adiciona-se carvão animal. Deixa-se ferver durante 15 minutos, filtra-se e evapora-se até um terço do volume inicial.

Nota-se a deposição de cristais em forma de agulhas. Eles são amarelados, com gosto amargo, solúveis em água e precipitáveis pelos reativos gerais dos alcalóides. Ao chegarmos a esse ponto, separámos os cristais, secámos cuidadosamente, determinámos o seu ponto de fusão.

Ponto de fusão 224° — 225° C..

Posteriormente, purificamo-lo sucessivamente com clorofórmio e por sublimação e determinámos os ensaios para a comparação com uma cafeína quimicamente pura.

<i>Ensaios</i>	<i>Ponto de fusão</i>	<i>Fluorescência</i>	<i>Reação de Murexida</i>	<i>Exame micro-cristalográfico</i>
β - Guaraina	234° — 236°C.	Característica da cafeína	Positiva	Igual ao da cafeína
Cafeína	235° — 236°C.	Característica	Positiva	Característico

Como Berredo, concluímos que realmente a β - Guarainina de Nierestein nada mais é que a Cafeína.

DOSAGEM DO ALCALÓIDE

Técnica de Grandval Lajoux, modificada por Mário S. B. Pen-teado.

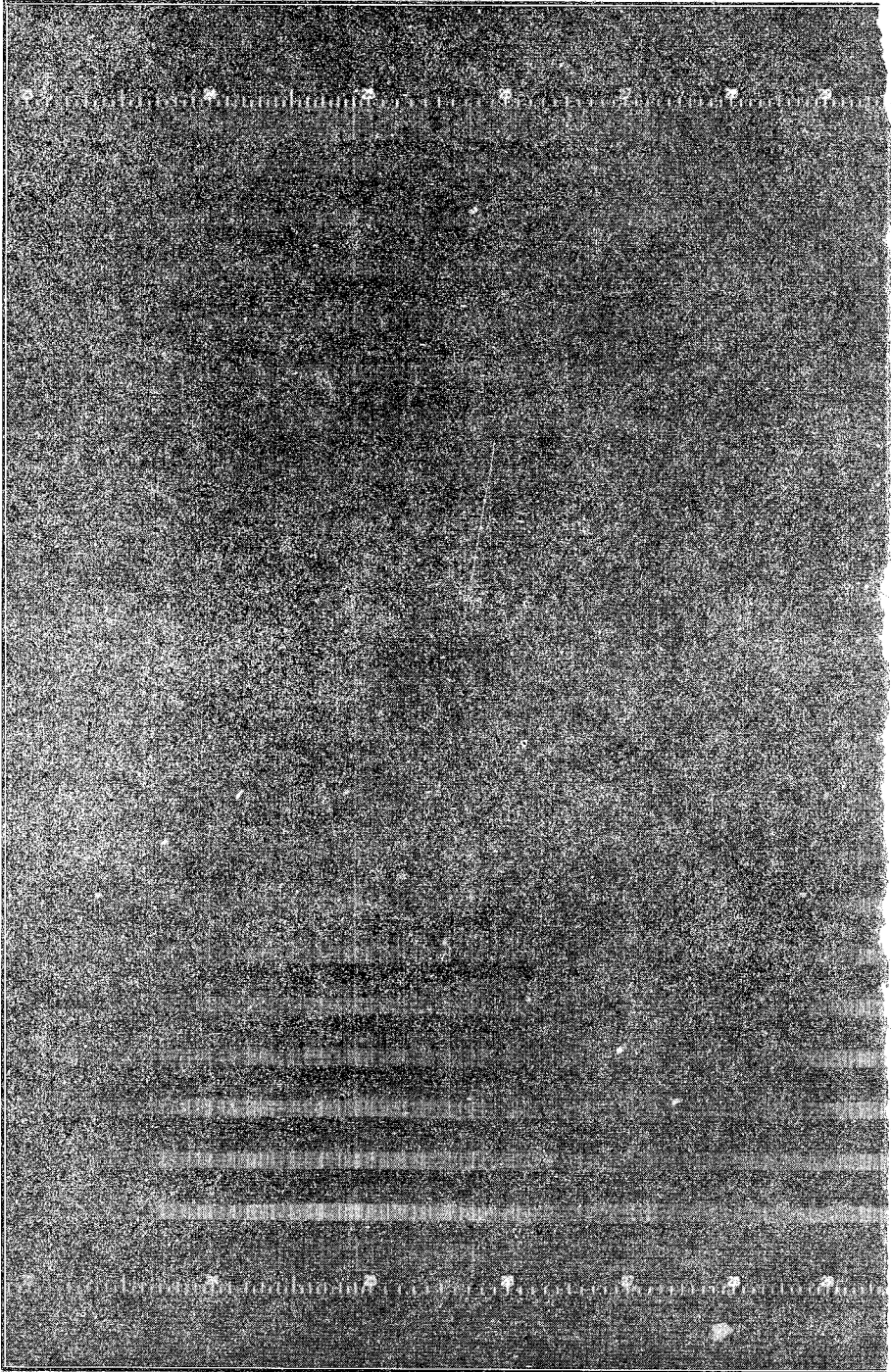
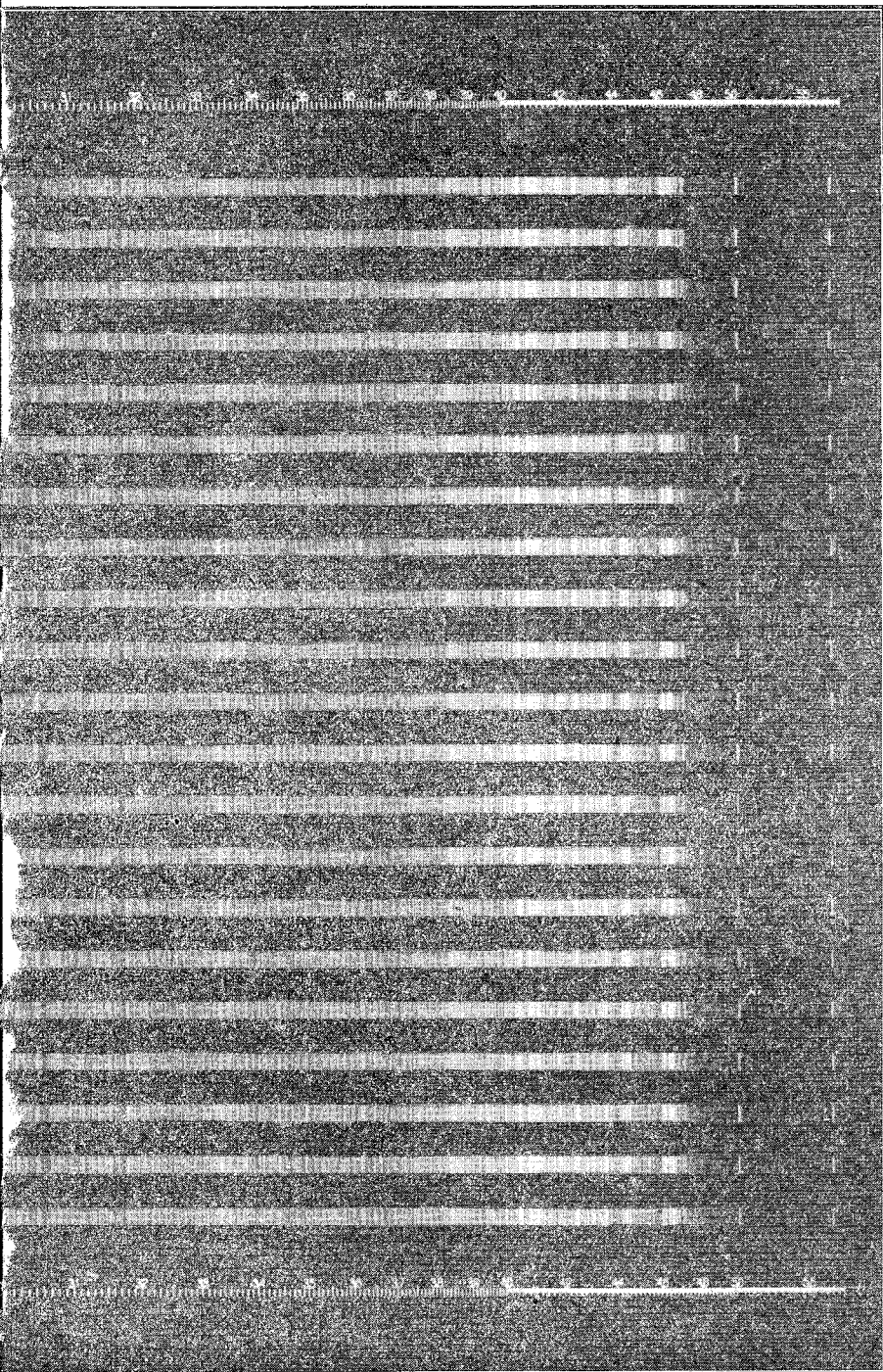


FIGURA 13



Pesam-se 5 grs. de Guaraná seco em pó, juntam-se 6 cc. de uma mistura constituída de 5 cc. de éter sulfúrico e 1 cc. de amoníaco a 24° Bé. Impregna-se completamente o pó e passa-se para o cartucho do aparelho de Soxhlet. Esgota-se com clorofórmio durante 6 horas em baixa temperatura. Terminada a operação, evapora-se o clorofórmio até resíduo seco, junta-se 1 cc. de ácido sulfúrico a 10% e lava-se várias vezes com água quente e filtra-se.

A esse líquido aquoso o ácido, junta-se amoníaco em pequeno excesso, e numa cápsula de porcelana evapora-se no banho-maria a 60-70° C..

O resíduo é lavado várias vezes com clorofórmio, evaporado e pesado.

NOTA — No processo supra-citado, procedemos o ensaio por duas maneiras: primeiramente, nos orientámos seguindo o processo à risca; posteriormente, antes de levarmos o pó para o cartucho do aparelho de Soxhlet, misturámos com 1,5 vezes o seu peso, com carvão animal.

Finda a operação, constatámos os seguinte resultados:

<i>Sem carvão:</i> CAFEINA	4.12%
<i>Com carvão:</i> CAFEINA	3.80%

As cápsulas contendo alcalóide foram submetidas à prova de fluorescência numa lâmpada de quartzo (Filtro Wood).

Observámos que quasi toda a superfície das cápsulas apresentava a fluorescência característica, porem nas últimas camadas periféricas notava-se a ausência absoluta do fenômeno.

A cápsula que continha o alcalóide separado com carvão apresentava nos bordos, analogamente, uma ausência de fluorescência porem em menor grau que a anterior.

Isto nos levou a concluir que estavamos operando com impurezas (substâncias Resinosas, principalmente), junto da cafeina.

Tentámos a purificação, baseando-nos no princípio da solubilidade da cafeina e insolubilidade das substâncias resinosas na água.

Obtivemos:

<i>Sem carvão:</i> CAFEINA	3.65%
<i>Com carvão:</i> CAFEINA	3.55%

O exame de fluorescência ainda acusou presença de substâncias estranhas.

Procedemos ainda mais duas purificações.

Obtivemos:

<i>Sem carvão</i> : CAFEINA	3.50%
<i>Com carvão</i> : CAFEINA	3.49%

Para nós, esse resultado constituiu o término das operações, visto acharmos o alcalóide com suficiente grau de pureza.

Técnica de S. COBERT — “5 gramas de Guaraná são pesadas num tubo de centrifugação de vidro. Juntam-se 5 cc. de hidróxido de amônia a 22 Bé e deixam-se durante 15 minutos em contacto remexendo sempre.

Procedendo a extrações com éter acético, homogeneizando sempre e empregando cada vez 25 cc. de líquido.

Após a centrifugação e decantação do líquido, num pequeno erlenmayer, distila-se o éter acético, tendo-se o cuidado de juntar 1/2 grama de parafina. Este resíduo é submetido três vezes a extração com água fervente (50 cc.), deixando digerir alguns minutos sobre o banho-maria. Remexem-se os líquidos de extração num becker de 400 cc. e aquece-se à ebulição com tela de amianto.

Após o resfriamento, o filtrado é tratado com 20 cc. de uma solução de permanganato a 1%. Deixa-se 20 minutos em contacto e separa-se o manganês com ajuda de uma solução de água oxigenada a 12 volumes, tendo 1% de ácido acético glacial.

Aquece-se durante 15 minutos no banho-maria e filtra-se, tendo-se porem o cuidado de lavar o precipitado com água fervente. Após a evaporação, o resíduo é dessecado 15 minutos a 100°C.. Esgotar três vezes com 75 cc. de clorofórmio, cobrindo o becker e colocando sobre a placa do banho-maria.

Filtra-se num recipiente tarado, lavando-se cada vez com 15 cc. de clorofórmio. O clorofórmio é destilado com muito cuidado e o resíduo posto a secar durante 30 minutos numa estufa a 100°C.. Passa-se para um dessecador onde permanece durante 6 horas, sendo então pesado”.

Por esse processo não tivemos inicialmente um alcalóide puro. Os cristais apresentavam-se algo amarelados, denotando presença de impureza. Procedemos a purificação do resíduo quatro vezes, fizemos o exame de fluorescência para constatar as impurezas e posteriormente pesámos,

RESULTADO

Cafeina	3,98%
---------------	-------

Após esta operação determinámos o seu ponto de fusão.

Técnica de UGLOW — SCHAPIRO — O princípio deste método é baseado no fenômeno da precipitação das matérias albuminóides, pigmento, resinas e outras substâncias, pelo hidróxido de cobre ao estado nascente, seguido da agitação do líquido em clorofórmio.

A marcha da operação é a seguinte:

“10 gramas de Guaraná em pó fino são aquecidas à ebulição durante 30 minutos, em 400 cc. de uma solução de carbonato de sódio a 4%.

O volume é mantido constante na ebulição pela adição de água.

Após o resfriamento do líquido a 60-70°C., as matérias tânicas, albuminóides, etc., são precipitadas por uma solução saturada de sulfato de cobre.

O resfriamento a 60-70°C. tem por finalidade tornar mais branda a reação de precipitação. A uma temperatura mais elevada o desenvolvimento de CO₂ é muito vivo e o líquido é projetado.

Continua-se a precipitação até o aparecimento de uma reação fracamente ácida ao turnesol.

Após um ensaio à parte, pode-se verificar si a reação de precipitação foi completa. Em seguida a massa total é transvasada para um balão de boca esmerilhada. O vaso onde foi feita a precipitação é lavado com água e introduzido num balão até 500 cc..

Após a agitação de maneira a deixar a solução homogênea, deixa-se o balão em repouso durante 20 minutos.

Retiram-se 300 cc. do líquido e agitam-se com 80 cc. de clorofórmio numa bola de decantação. Realizam-se 4 operações. Reunem-se as soluções clorofórmicas num balão tarado e distilam-se a uma temperatura que não passe de 60°C.. Secam-se à temperatura de 80°-90°C. e pesam-se. O peso multiplicado por 16,6 dá a porcentagem de Cafeína.

Esse processo nos satisfaz bastante. Primeiro, devido à rapidez e velocidade do trabalho. Segundo, por fornecer um alcalóide mais ou menos puro.

Como no processo anterior, procedemos o exame de fluorescência e observámos que o alcalóide não se apresentava totalmente

puro. Procedemos a purificação por duas vezes consecutivas. Após os ensaios de purificação, fizemos a verificação pela sua fluorescência, sendo esta satisfatória. Pesámos e calculámos.

RESULTADO

Cafeína	4,18%
---------------	-------

Em seguida determinámos o seu ponto de fusão.

PROCESSO DO BENZOATO DE SÓDIO

“5 gramas do Guaraná foram misturadas a um décimo de seu peso de cal recentemente extinta. Juntam-se aos poucos 250 cc. de solução a 5% de benzoato de sódio, homogeneisando-se muito bem. Filtra-se, e o filtrado é alcalinizado com uma solução de carbonato de sódio.

Passa-se a solução para uma bola de bromo e extrae-se o alcalóide durante 4 vezes, com 50-60 cc. de clorofórmio. Passam-se as soluções clorofórmicas por uma cápsula tarada, evapora-se o clorofórmio, seca-se e pesa-se o alcalóide.

RESULTADO

Cafeína	3,74%
---------------	-------

Determinámos o ponto de fusão e procedemos o exame de fluorescência e o cristalográfico.

<i>Processo</i>	<i>Ponto de fusão</i>	<i>Polarização rotatória</i>	<i>Cafeína em Grs. %</i>
Grandval-Lajouse, modificado por M. S. B. Penteadó	235 — 236°C.	Oticamente inativo	3,50
Unglow-Schapiro	234 — 236°C.	Oticamente inativo	4,18
S. Gobert	232 — 233°C.	Oticamente inativo	3,98
Benzoato de sódio	236 — 237°C.	Oticamente inativo	3,74

De todos os processos, o que mais nos satisfaz, quer pelo tempo gasto na operação, quer seja por oferecer inicialmente um alcalóide mais puro e, ainda mais, por fornecer o alcalóide em teor mais elevado, foi o processo de Uglow-Sehapiro.

Pelo exame cristalográfico, pelo ponto de fusão, pelo comportamento polarimétrico, pelo exame espectro-absorção e outras verificações já podemos afirmar que o alcalóide encontrado no Guaraná é a Cafeína, ou seja Trimetil 1-3-7, dioxi 2-6 Purina.

— Os exames espectrográficos foram realizados no Instituto de Pesquisas Tecnológicas e Instituto de Higiene de São Paulo.

Deixamos aqui os nossos agradecimentos pela acolhida carinhosa que nos foi dispensada pelos Drs. Adriano Marchini e Oscar Bergstron Lourenço, respectivamente, Diretor e Químico chefe do Departamento de Espectrografia, e aos Drs Geraldo Paula Souza, Borges Vieira e Alexandre Wancolle, Diretores e Químico chefe do Instituto de Higiene.

Em particular, consignamos os nossos agradecimentos aos Drs. Oscar Bergstron Lourenço e Alexandre Wancolle, pela orientação técnica que recebemos a propósito.

CONCLUSÕES

Do exposto, é lícito concluir:

1.º) Que o alcalóide existente no Guaraná (*Paullinia cupana*) é a própria Cafeína.

2.º) Que é notável o teor em elementos contido no Guaraná, notadamente o Titânio e Fósforo.

Comparado o Guaraná ao Café, Mate e Chá, constata-se que é o Guaraná muito mais rico de elementos minerais do que aqueles.

3.º) Dos métodos empregados, o mais recomendável para a extração quantitativa da cafeína do Guaraná é o de Uglow-Schapiro.

SUMÁRIO

O autor começa por mostrar que a classificação botânica mais usada para a planta do guaraná é a *Paullinia cupana*.

Em seguida, faz um ligeiro histórico dos estudos realizados em algumas das substâncias químicas encontradas no guaraná,

principalmente sobre o corante em confronto com outros vegetais, e o alcalóide.

Mostra o autor a composição das cinzas, cuja análise foi feita pelo método espectrográfico, salientando a riqueza em elementos minerais, principalmente em Titânio e Fósforo. Estuda depois o guaraná com relação ao teor de Lípicos, Ácido Paulino-tânico, Nitrogênio total, etc..

Passa depois a estudar o alcalóide extraído do guaraná, sob o aspecto cristalográfico. Mostra ainda o referido autor que os espectros de absorção, obtidos com o alcalóide extraído do guaraná e com cafeína quimicamente pura, são idênticos.

Estuda o alcalóide extraído do guaraná e cafeína quimicamente pura, sob o aspecto do ponto de fusão e fluorescência, verificando a coincidência de ambos.

Passa em seguida a dosar o alcalóide por vários métodos.

Conclue o Autor que o alcalóide do guaraná é a cafeína, e que o teor médio encontrado é 4,18 gr. %.

SUMMARY

The author begins by explaining that the botanic classification most commonly used for the "guaraná plant" is the *Paullinia cupana*.

Then he gives a historic outline of the studies about that specie and a few of the chemical substances found in it as well as the coloring materials in comparison with the other plants, and its alcaloides.

The analisis of the asher was made by the spectrographical process wich showed great richness in mineral substances, especially Titanius and Fosforus. The following studies were made as to the quantity of Lipides, Paulino tanic acid, the total quantity of nitrogen, etc..

He then studied the alcaloid extracted from the guaraná under a spectrographical view.

He also shows that the absorption specturm, obtained with the alcaloid extracted from the guaraná and with chemically pure cafein are indentical.

He studies the alcaloid extracted from the guaraná in comparison with chemically pure cafein noting the coincidence of fluorescence and melting point.

Next he doses the alcaloid by various methods.

The author concludes that the alcaloid from the guaraná is cafein and that the average quantity found is 4,18 gr. %.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser beginnt, indem er zeigt dass in der Botanik die guaraná-Pflanze als "*Paullinia cupana*" bezeichnet wird.

Darauf folgend macht er eine kleine, Beschreibung der Studien die gemacht wurden, um die characteren der verschiedenen chemischen Zusammensetzungen, die in guaraná gefunden werden zu bestimmen; hauptsächlich Studien des Farbstoffes und des Alcaloiden.

Der Verfasser zeigt die Zusammensetzung der Asche, deren analyse durch spectrografische methoden gemacht wurde den Reichtum in mineralien, hauptsächlich Titan und Phosphor, hervorhebend.

Er beschreibt später die guaraná-Pflanze in verhältniss zu den Fettstoffen, der Paulin-tanische Soeure, und im verhältniss zum stickstoff.

Weiter studiert er das alcaloid das aus seiner crystallografischen form.

Nach diesem abschnitt folgt eine Beschreibung des Absortions — Spectrums des guaraná-Alcaloiden, das dem Spectrum des Kafeins gleicht.

Der Verfasser zeigt das Verhältniss zwischen den alcaloiden des guaraná und Kafein in ihren Fusionspunkten und ihrer fluorescence.

Dan folgt ein Studium der verschiedenen Dosier-Methoden.

Er schliesst indem er zeigt dass das Alcaloid der guaraná-Pflanze ist und im durchschnitt 4,18 gr. % des Gewichtes der Pflanze betraegt.

BIBLIOGRAFIA

Actos y trabajos de la Cuarta Reunion de las Sesiones Químicas Argentinas, 1939,

Accepted foods and their Nutritional significance. American Medical Association.

BALLION, H. — Dictionnaire de Botanique, 3 vols.

CARNEIRO, PAULO E. DE BERREDO — Le Guaraná et *Paullinia cupana*.

CALVET, E. — Química General Aplicada, 4 vols.

GRIGNARD, V. — Traité de Chimie Organique.

HOEHNE — Plantas Medicamentosas e Venenosas do Brasil.

LEACH, A. and WINTON, A. — Food Inspection and Analysis, 1 vol.

ODDO, BERNARDO — Química Farmacêutica e Toxicológica, 2 vols.

RONDONI, P. — 1939, Compêndio de Bioquímica.

SAEZ, P. E. VITORIA — La Catalisis Química, 1 vol.

SHERMAN, HENRY C. — 1941 — Food Products, 1 vol.

THORPE, EDWARD — Enciclopédia de Química Industrial, 6 vols.

TERRA, BARROS, 1936, Química Orgânica Teórica.

ULLMANN, FRITZ — Enciclopédia de Química Industrial, 14 vols.

Boletim do I. P. T.

INVESTIGAÇÕES SOBRE PRODUTOS DE TOMATE (*)

ARIOSTO BULLER SOUTO

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

OLIVIA DE GODOY

Química do Instituto Adolfo Lutz

Com o intuito de realizar estudos sistemáticos da flora de determinados alimentos, bem como de certas doenças, no Instituto Adolfo Lutz foi organizada uma nova Secção englobando as antigas sub-secções de microscopia, bacteriologia de alimentos e outras, com a denominação de Secção de Controles Biológicos.

Afim de nos colocarmos ao par do que já se fazia nos países estrangeiros, fomos comissionados para estudar "in loco" a organização sanitária de vários deles.

Como delegados oficiais à "Primera Reunión Argentina de Agronomía" (1941), tivemos oportunidade de verificar a extensa série de pesquisas que se realizam presentemente sobre os alimentos argentinos e indústrias agro-pecuárias correlacionadas.

Da série de estudos sistematizados realizados e, em curso de realização, na recém-organizada Secção de Controles Biológicos, vários resultados estão sendo apresentados.

* * *

As investigações que vem sendo realizadas desde há vários anos sob a orientação de J. B. Howard, na Divisão Microanalítica, transferida em 30 de Junho de 1940 para a Agência Federal de Segurança, trouxeram grande contribuição ao aperfeiçoamento dos controles das substâncias alimentícias.

(*) Recebido para publicação em 3 de Março de 1942.

Na Argentina o casal Soriano, após um estágio de vários anos nos Estados Unidos da América do Norte, durante os quais foram visitados centros dedicados a esses contrôles, com o auxílio de técnicos de grande capacidade como os Drs. M. Cataldi e L. Garassini, vem realizando obra básica e fundamental.

No Brasil, procuramos igualmente conduzir agora estudos de larga amplitude. Nesta nota estuda-se o estado sanitário dos produtos derivados de tomate, existentes no mercado brasileiro e procura-se, através desses estudos, fornecer ao Governo dados que permitam estabelecer legislação adequada. Escolhemos este assunto devido à crescente procura desses produtos no mercado interno e de exportação.

O presente trabalho compreende os capítulos seguintes:

- I — Introdução
- II — Regulamentação oficial
- III — Agentes causais de deterioração do tomate e produtos derivados
- IV — Métodos de contrôle
- V — Críticas aos métodos
- VI — Adulterantes
- VII — Resultados
- VIII — Discussão
- IX — Conclusões.

Apêndice (em separado):

Projeto de lei que fixa o limite de filamentos de cogumelos nos produtos de tomate destinados ao mercado interno e à exportação.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O estudo microscópico sistematizado dos alimentos tende a tomar cada vez maior importância.

Dados decisivos podem ser obtidos pela verificação da estrutura histológica das substâncias alimentícias. O exame microscópico é um complemento indispensável no contrôle sanitário dos alimentos.

O exame microscópico direto revela a presença de bactérias, sejam vivas ou mortas. A contagem do número das mesmas fornece clara noção do estado higiênico dos alimentos. Em geral as elevadas numerações microbianas correspondem aos alimentos elaborados com matéria prima total ou parcialmente alterada. Alimentos enlatados em estado de completa deterioração poderão estar absolutamente estéreis, no entanto a contagem bacteriana demonstrará as precárias condições sanitárias do alimento em questão. Essa comprovação vem evidenciar que, com o evoluir dos métodos de controle, será muito difícil não só a fabricação de produtos alimentícios adulterados e falsificados como, sobretudo, o emprego de matéria prima de má qualidade na sua elaboração.

Esses métodos, cada vez mais aperfeiçoados, irão permitir uma sistemática análise retrospectiva da matéria prima utilizada na manufatura das substâncias alimentícias. Da possibilidade de certos industriais não estarem suficientemente informados sobre o estado de decomposição da matéria prima empregada, ou da evidente deshonestidade de outros que as empregam mesmo nas mais precárias condições, surge a necessidade de o Estado intervir para salvaguardar, tanto os interesses do público consumidor, como os da indústria honesta. É difícil, sinão impossível, em certos casos, ao consumidor, distinguir por simples degustação os produtos bem elaborados daqueles em que se empregou matéria prima alterada, o que é certo é que tais alimentos seriam prontamente rejeitados si isto fosse conhecido. Assim, industriais que trabalham honestamente, sofrem a concorrência desleal dos que, empregando matéria prima alterada, estão por esta mesma circunstância em condições de produzir por menor custo.

A contagem microbiana direta é o meio mais simples e mais prático para se determinar o estado sanitário dos molhos, dos extratos, da gelatina, das carnes defumadas, das linguças, dos leites em pó e das massas de tomate. Um elevado número de filamentos de cogumelos, esporos, leveduras e bactérias, corresponde geralmente a demoras da matéria prima na fabricação, durante as quais se originam fermentações que tornam o produto de qualidade inferior. Em regra é possível afirmar que cada 20.000.000 de germes por cc. corresponde a cerca de 1% em peso de material alterado. Esta relação se mantém proporcional até aos 20%.

Embora as numerações baixas, nem sempre correspondem aos alimentos elaborados com matéria prima sã, ao contrário, as altas contagens bacterianas indicam invariavelmente que foram utilizadas matérias primas decompostas ou alteradas.

A contagem dos cogumelos e das leveduras fornece também índice e, dos mais seguros, sobre o estado da matéria prima utilizada.

As contagens de cogumelos, bactérias e leveduras, nas conservas de tomate, são de inapreciável valor no controle sanitário. Permitem ter noção muito exata da qualidade da matéria prima empregada. Permitem comprovar o emprego de tomates alterados, mal lavados ou submetidos a outras deficiências de elaboração, tais como a falta de higiene, as demoras na concentração da polpa e a má esterilização. Fornecem dados para um controle progresso muito eficiente. As contagens altas correspondem, geralmente, a extratos elaborados com elevada proporção de tomates, total ou parcialmente alterados. Evidenciando que, para se obterem produtos de boa qualidade, com contagens baixas, devem ser empregados tomates sãos, isentos de toda decomposição e fabricados sob orientação técnica adequada. “Muitos industriais apesar da sua boa vontade não conseguiram introduzir nas fábricas processos modernos de classificação, limpeza e transporte do tomate, não tanto pelas dificuldades econômicas ou ausência de iniciativas progressistas, como por desconhecerem a influência prejudicial que a falta de uma adequada seleção e lavagem exercem sobre a qualidade sanitária e higiênica do extrato elaborado. Nas condições atuais, a falta de uma conveniente fiscalização bacteriológica do produto entregue ao consumo, retarda a introdução desses melhoramentos que logicamente aumentam o custo da elaboração, o que colocaria aos industriais que as praticassem em inferioridade de condições com relação aos que não as adotassem”. Estas considerações do engenheiro agrônomo Rivas (1937), antes da regulamentação argentina, são perfeitamente aplicáveis às nossas condições atuais.

CAPÍTULO II

REGULAMENTAÇÃO OFICIAL

O Congresso dos Estados Unidos da América do Norte, em 7 de Julho de 1932, converteu em lei a classificação de alimentos enlatados, organizada pelo Departamento de Agricultura, Divisão

de Economia Agrícola, a ser oficialmente usada no serviço de classificação de frutos e vegetais enlatados. A 16 de Janeiro de 1933, aprovou o padrão de classificação para tomates enlatados. Em 25 de Junho de 1934, dispôs sobre o padrão provisório para a classificação da polpa de tomate enlatado e o produto denominado "Catsup". A 29 de Agosto de 1939 tornou extensivas tais disposições ao suco de tomate.

O padrão provisório de 25 de Junho de 1934 estabeleceu o exame microscópico, usando o método de Howard para conhecer a quantidade de filamentos de cogumelos, leveduras e de bactérias.

As amostras só poderão ser consideradas como boas quando preencherem, como tolerância máxima, os requisitos seguintes:

50% de campos positivos, com filamentos de cogumelos

100 milhões de bactérias por cc.

125 leveduras ou esporos por 1/60 de mm.³

O Código de Agricultura dos Estados Unidos (artigo 752, anc 1935) estabeleceu as condições que requerem os tomates para serem utilizados nos estabelecimentos de enlatamento. Ficou além disto estabelecido que no enlatamento dos tomates se deverá ter em conta uma série de exigências relacionadas com o peso do tomate, coloração, grau de maturação, características do recipiente, rotulagem, etc..

Não poderão ser considerados aptos si contiverem resíduos de raminhos e outros, não retirados pela lavagem simples com água, de maneira a estar de acordo com as tolerâncias permitidas pelo estabelecido, de modo geral, na lei americana de alimentos, drogas e inseticidas.

Na República Argentina o decreto n.º 70.150, de 2 de Novembro de 1936, que modificou o decreto n.º 51.226, de 7 de Novembro de 1934, sobre conservas de tomate, estabeleceu a análise microscópica para a determinação de filamentos de cogumelo, limitando sua quantidade ao máximo de 50% de acordo com a escala de Howard.

A lei n.º 113.497, de 4 de Setembro de 1936, regulamentou a matéria da maneira seguinte:

ART. 1.º — Os extratos de tomates destinados ao consumo interno a partir da próxima colheita 1937-1938 serão submetidos, além da análise química, à análise microscópica para determinação dos filamentos de cogumelos, limitando sua quantidade máxi-

ma, de acordo com a escala de Howard ao seguinte: 75% no 1.º ano; 65% no segundo ano; 50% no terceiro ano e seguintes, para exportação. A tolerância será de 50% como limite máximo.

ART. 2.º — Os que infringirem as determinações do presente decreto sem prejuízo da multa que disponha a autoridade municipal do lugar em que se encontre a mercadoria com excesso de cogumelo, serão passíveis das penalidades que estabelece o artigo 8., da lei 11.275.

ART. 3.º — Solicita-se dos Governos provinciais a cooperação necessária, afim de que o presente decreto tenha aplicação nas zonas cuja vigilância está sob a sua jurisdição.

Posteriormente, tendo em vista que os fabricantes de extrato de tomate solicitavam elevar a 60% o limite de filamentos de cogumelos até o ano de 1942 e descer posteriormente a 55%, e no ano de 1945 a 50%, o Governo argentino convocou uma reunião especial do Departamento de Agricultura. Tendo em conta as conclusões chegadas foi promulgado o decreto n.º 79.832, de 18 de Dezembro de 1940 que, considerando:

que o decreto n.º 70.150, de 2 de Novembro de 1935, que estabeleceu o limite máximo de 50% (segundo a escala de Howard) de filamentos de cogumelo para os extratos de tomate foi modificado anualmente neste ponto a pedido dos industriais demorando-se assim o estabelecimento definitivo da porcentagem de filamentos de cogumelos a espera de que a indústria pudesse, sem inconvenientes, adaptar seus produtos às normas estabelecidas;

que atualmente os industriais melhoraram sensivelmente seus processos de seleção e limpeza do tomate, pelo que chegou o momento de impor uma medida limite definitiva para os cogumelos do extrato, que evite os inconvenientes das constantes prorrogações e modificações, que só trazem prejuízos ao prestígio do industrial do ramo, e que seja ao mesmo tempo uma garantia da qualidade do fruto empregado: são, maduro e limpo;

que não obstante o progresso da indústria mencionada, é evidente que existem zonas do país que devem esperar ainda um progresso maior nestas culturas, o qual está dependente do Poder Executivo por meio de suas repartições técnicas de colonização e ensino;

que, com o fim de evitar novos pedidos de modificação a escala descendente solicitada, de 60% a 50%, e com a idéia de que ao melhorar as condições expressas na representação dos fabricantes

de extratos, deve-se esperar o máximo empenho da indústria para a obtenção de um produto que aumente o prestígio da produção argentina de extrato de tomate, convem fixar o limite definitivo e terminante em 60% de cogumelos (segundo a escala de Howard).

Em vista dessas considerações foi decretado:

ART. 1.º — A partir da colheita de 1940-41, e nos anos seguintes, os extratos de tomate destinados ao consumo interno, não poderão conter mais de 60% de filamentos de cogumelos, calculados pelo sistema de Howard.

ART. 2.º — Para a exportação, mantem-se 50% de filamentos de cogumelos.

ART. 3.º — O Departamento do Interior requererá das autoridades provinciais que adotem suas disposições em relação aos termos do presente decreto, para seu melhor cumprimento no interior do país.

O "Regulamento Bromatológico" da Província de Buenos Aires, na 2.ª edição de 1937, estabeleceu:

ART. 410 — As conservas de tomates, além de corresponderem às exigências do presente Regulamento Bromatológico, examinadas ao microscópio pelo método de Howard e Stephenson, não acusarão um número de filamentos de cogumelos maior do que 50% de campos observados.

Antes da expedição do decreto dispendo sobre a tolerância máxima de cogumelos os exames realizados em 7 fábricas por A. Soriano, na República Argentina, demonstrou um mínimo de 58% e um máximo de 96% de campos positivos. Após o decreto os por cento de campos com filamentos de cogumelos está oscilando entre um mínimo de 4% e um máximo de 60%. Entre 12 fábricas controladas, somente 6% das amostras estavam fora do limite de tolerância e 2% no limite. Isto é uma excelente contribuição demonstrativa da necessidade de ser expedida no Brasil a regulamentação adequada. Foi a 1.ª Conferência Bromatológica Nacional, reunida em Santa Fé, de 3 a 6 de Julho de 1935, que forneceu os dados seguros para elaboração das leis adequadas. Aquela conferência estabeleceu como tema oficial a necessidade de complementar as especificações para elaboração dos produtos de tomate, com o estabelecimento de cifras limites para bactérias, leveduras, esporos e cogumelos, baseadas nos métodos de Howard. Recomendou, além disto, que não fosse permitida a presença de amido dosi-

ficavel nas conservas de tomate. Tornou recomendavel fazer a dosificação do íon potássio, a relação do extrato seco, da matéria orgânica e as observações relativas ao escurecimento das massas e extratos.

CAPÍTULO III

AGENTES CAUSAIS DA DETERIORAÇÃO DO TOMATE E PRODUTOS DERIVADOS

Os principais agentes causais da deterioração dos tomates são os cogumelos, as leveduras e as bactérias, parasitos ou saprofitos. Esses micro-organismos podem atacar o fruto antes da colheita, durante o crescimento e a maturação; ou então após a colheita, durante as demoras de elaboração, quando os frutos expostos ao sol e às poeiras sofrem ações fermentativas, na falta de armazens de conservação, refrigerados, adequados. Howard no trabalho: "Outlines for instruction in tomato microscopical methods" fornece excelente contribuição sobre esses vários agentes causais da deterioração.

1.º) BACTÉRIAS

As bactérias esporuladas aeróbias ou anaeróbias, estritas ou facultativas, gosam papel essencial como agentes causais da deterioração dos produtos enlatados de tomate. A fraca tensão de oxigênio oferece condição ideal para a proliferação de certos anaeróbios gosogênicos como o *Clostridium sporogenes* e o *Clostridium welchii* ocasionando o estufamento das latas. Esses anaeróbios podem produzir cheiro pútrido desagradavel. Entre os esporulados aeróbios o *B.subtilis*, *B.ramosus*, *B.ruber*, *B.prodigiosus* e o *B.viscosus* desempenham importante papel no estufamento das latas. Alguns resistem ao aquecimento a 120° C. e mais. Certos termófilos estritos produzem CO₂ e H₂ nos produtos de tomate enlatados, são em geral anaeróbios muito resistentes ao aquecimento.

Outros agentes bacterianos de deterioração do tomate e de seus produtos são: o *Clostridium butyricum* que "rancifica" os concentrados, dando cheiro e gosto desagradaveis muito característicos; o *Cl. amylobacter*, os lactobacilos que "azedam" os concentrados, assim como os germes do grupo coliforme. A presença da

E. coli e dos coliformes "citrato-negativo" poderá ser indicativa da contaminação fecal dos concentrados.

Nos tomates podres algumas das principais formas de deterioração são produzidas por bactérias. Produzem amolecimento dos tecidos do tomate. Ao microscópio esses microorganismos aparecem sob a forma de bastões curtos ou longos, finos ou grossos, isolados ou em cadeias, e de cócos isolados ou agrupados. As bactérias aumentam muito nos produtos colocados em barricas de madeira ou expostos ao ar e às poeiras. Os produtos de tomate não são suscetíveis de sofrer esterilização alta, assim é conveniente protegê-los o mais possível de todas as possíveis fontes de contaminação durante as fases de elaboração. É indispensável proibir a venda dos produtos de tomate em embalagem acima de 5 quilos em pacotes, em barricas de madeira ou em latas. Geralmente a esterilização é feita mergulhando as latas já fechadas em água em ebulição, durante 40 a 60 minutos, a temperatura no interior das latas alcança entre 65-70°C.

É evidente que a esta temperatura numerosos germes podem resistir, principalmente os esporulados. Dentre estes merecem a atenção é o "*Clostridium botulinum*". O "*Cl. botulinum*" é um anaeróbio esporulado, grande, Gram positivo com esporos ovais sub-terminais. Cresce bem ao meio de Van Ermengem a 28°C. Produz nas conservas alteradas um cheiro butírico penetrante e abundante gás. As provas de toxicidade dos alimentos suspeitos são feitas em cobaias ou camundongos brancos. Os sintomas típicos aparecem dentro de 24 horas e a morte sobrevém si existe muita toxina. Nos produtos de tomate, em virtude do valor do pH, a tendência é formar quantidade muito moderada de toxina botulínica e, isto mesmo, só após incubação muito prolongada e contaminação massiva do produto. Cruess (1938) referindo-se a casos de botulinismo escreve que "Tomato sauce of pH 4,4 caused one outbreak, as did also, in one case, home brew made of home-canned fruits, sugar, water, home-canned tomatoes, etc."

2.º) LEVEDURAS

São de grande importância como produtores de deterioração de produtos hortícolas. Variam muito as leveduras encontradas nos produtos de tomate, no tamanho e na forma; em geral são elípticas, quasi esféricas, lembrando os esporos de certos cogumelos.

As cadeias são raras em virtude da agitação que sofrem durante a elaboração. As leveduras produzem amolecimento dos tecidos do tomate, formando uma camada branca sobre a mesma. Fábricas em condições higiênicas deficientes apresentam nos produtos de tomate grande quantidade de leveduras associadas a cogumelos (principalmente do gênero *Oidium*) e a bactérias. São de difícil identificação. Na Secção de Contrôles Biológicos, em colaboração com os Drs. F. Almeida e C. S. Lacaz, O. Barros (1941) publicou recentemente uma chave que facilita em muito a classificação das leveduras.

3.º) COGUMELOS

Os cogumelos são altamente responsáveis pela deterioração de muitas substâncias alimentícias. Atacam a matéria orgânica, onde se desenvolvem muito bem. São constituídos por filamentos delgados, os micélios, que substituem as raízes e os talos dos vegetais superiores. Sobre o micélio se desenvolvem esporos de diferentes cores, brancos, cinzentos, pardos, negros, amarelos ou verdes. Os cogumelos diferem uns dos outros principalmente nos métodos de produção de esporos e conídios. Os cogumelos que mais frequentemente produzem a deterioração dos tomates são: (a) *Alternaria*, (b) *Colletotrichum*, (c) *Fusarium*, (d) *Mucor e Rhizopus*, (e) *Oidium*, (f) *Penicillium*, (g) *Aspergillus* e (h) *Botrytis*. Destes os 3 primeiros são distintamente espécies do campo, parasitando o fruto ainda na planta; enquanto que os demais o contaminam depois da colheita.

a) *Alternaria* — (Família *Dematiaceae*).

É uma das espécies que produzem a deterioração do tomate no campo. Causa o enegrecimento dos tecidos produzindo a “podridão negra” (black rot ou podredumbre negra). O micélio é septado e de espessura média. Os conidióforos são bastante escuros, curtos às vezes alongados. Os conídios são septados transversalmente, sendo os segmentos em muitos casos divididos por septos longitudinais. Os conídios são dispostos em cadeias, sendo o mais velho e o mais desenvolvido o elemento basal; o elemento apical é pequeno e não completamente septado. Como as cadeias de conídios são fracas, podem se fragmentar facilmente. Esta é mais uma das dificuldades encontradas na diagnose dos elementos deste gênero, principalmente

porque este é um carater genérico que separa os 2 gêneros: *Alternaria* e *Macrosporium*. No gênero *Macrosporium* os conídios estão sempre isolados e jamais em cadeias. O gênero *Alternaria* é o gênero mais importante em relação à produção da deterioração dos tomates na planta.. Principalmente dos tomates que no campo apresentam-se fendidos ou crestados pelo sol. *Fig. 1*

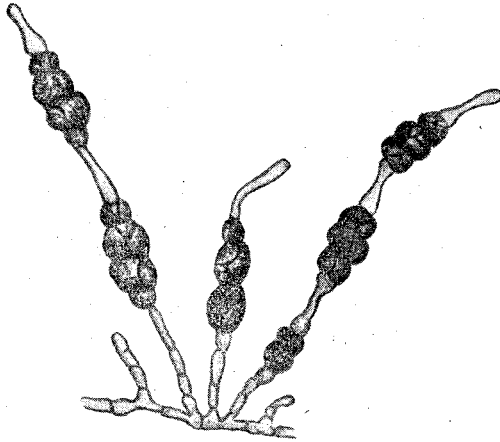


FIG. 1

Alternaria — Cadeia de conídios (Saccardo)

b) *Colletotrichum* — (Família *Melanconiaceae*).

Os cogumelos deste grupo produzem a “antracnose” (anthracnose spots) do tomate, enfermidade comum que se inicia sobre o fruto verde. Caracteriza-se pelas manchas circulares, amarelo-avermelhadas, algo deprimidas e com os bordos elevados. Por baixo destas manchas a polpa fica mole e entra em decomposição sob a influência bacteriana. Esta forma de cogumelo é caracterizada pelo crescimento de micélio e dos esporos, que se faz exclusivamente debaixo da pele, não chegando a se aprofundar na polpa. O micélio é fino e sem cor. Os filamentos micelianos têm menor diâmetro de que qualquer outro cogumelo que infesta os tomates. Os esporos são pequenos e elípticos. *Fig. 2*

c) *Fusarium* — (Família *Tuberculariaceae*).

Produzem a “gangrena” ou “podridão apical do tomate”. Esta doença exclusiva dos frutos, se inicia com uma mancha deprimida pardo verdosa, pálida, que se localiza no ápice ou nas suas proxi-

midades, sempre na metade oposta e da inserção do pedúnculo, e, se estende paulatinamente em zonas concêntricas, que podem chegar a ocupar um terço da superfície do tomate verde ou maduro.

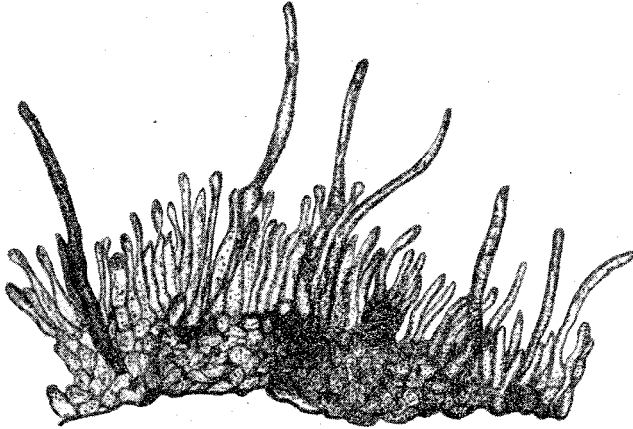


FIG. 2

Colletotrichum (Southworth).

A porção aérea do micélio é formada por hifas delgadas hialinas, tabicadas, ramificadas, entrelaçadas, que apresentam engrossamentos laterais ou clamidospóros, piriformes, ovais, contínuos ou tabicados. Os esporos são de forma lunar divididos transversalmente por septos em 2 ou mais segmentos.

Fig. 3

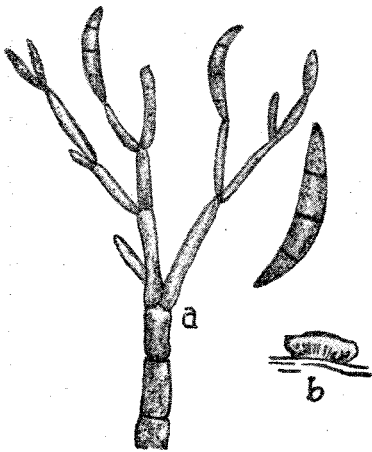


FIG 3

Fusarium. — a) detalhes dos conidióforos e conídios; b) esporodóquio (Saccardo).

d) *Mucor e Rhizopus* — (Família *Mucoraceae*).

Produzem as “fendas” do tomate (bakers ou goteras), porque quando invadem a polpa provocam a saída de suco, com cheiro mais ou menos desagradável. Esses 2 gêneros são agrupados, pois pela sua aparência, modo de crescimento e efeito sobre os tomates são muito similares. O micélio não é septado, contendo grânulos grossseiros.

A porção aérea é frouxa com aparência de algodão. Os esporos são produzidos em pequenos esporângios em forma de bola,

que a olho desarmado se apresentam como pintas negras disseminadas sobre micélios de algodão. Os esporos contidos no esporângio são pequenos corpos, esféricos, parduscos. (*Fig. 4 e 5*). Este cogumelo invade prontamente o tomate após a colheita, sendo necessárias a lavagem e a seleção rigorosa.

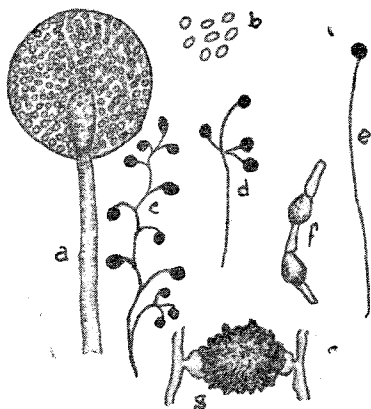


FIG. 4

Mucor — a) Esporangio com columela e esporangióforo; b) esporos; c. d) esporangióforos ramificados; e) esporangióforo simples; f) clamidosporos; g) zigosporo. (Buch).

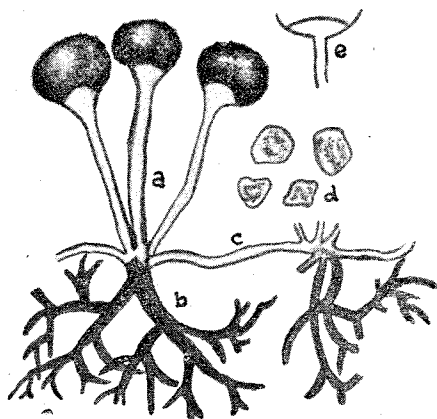


FIG. 5

Rhizopus — a) esporangióforos, esporangia; b) rizoides; c) estolone; d) esporos; e) columela e apófise (Buchanan).

e) *Oidium* — (Família *Moniliaceae*).

Certas espécies deste gênero produzem o “polvilho” do tomate. Existe principalmente nas fábricas e usinas de produção dos concentrados de tomate, sendo das espécies mais resistentes à destruição. Sua presença em grande quantidade indica deficiências no trabalho, más instalações e falta de higiene. No tomate produz micélio compacto, muito branco e algo alaranjado. A porção aérea, na qual crescem os esporos, tem aparência aveludada e não cresce na superfície em extensão grande. Sobre os utensílios da fábrica forma capa viscosa delgada e cheiro característico. O micélio superficial de hifas delgadas e curtas algo tabicadas, de conteúdo violáceo ou verde amarelento. Não tem corpo frutífero especial; os esporos se formam sobre prolongamentos das hifas vegetativas, que se segmentam ou desarticulam, produzindo células cilíndricas, ovóides ou fusiformes, isoladas, denominadas oidios, sendo relativamente facil de identificar por sua forma e tamanho quando os extratos são observados no microscópio. *Fig. 6*.

O vasilhame poluído por este cogumelo apresenta cheiro característico fétido, particular, facilmente assinalado por aqueles

que estão familiarizados com ele. Esse cheiro se transmite ao produto contaminado.

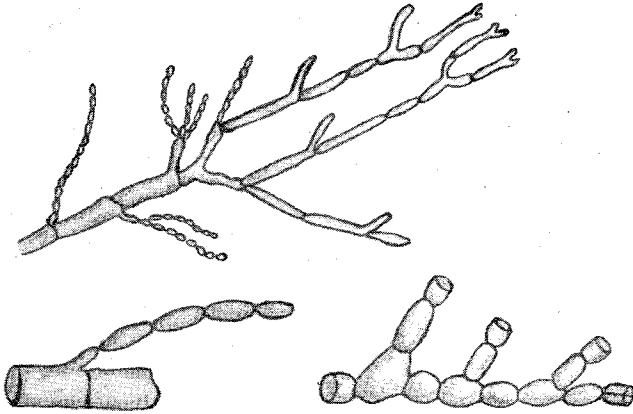


FIG. 6

Oidium — Formação de oídios, (Buchanan).

f) *Penicillium* — (Família *Aspergillaceae*).

São muito frequentes e produzem grandes danos. No Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Thom fez um completo estudo do g.*Penicillium*. Os cogumelos deste grupo são encontrados em substâncias contendo açúcar, tais como frutos, sucos, gélias. Crescem bem entre 15 a 25.,C.. Sobre tomates ou extratos guardados um certo tempo produzem uma camada verde, azul grisácea e cheiro e gosto de bolor muito desagradáveis. Micélios pouco extensos, brancos, que quando aparecem os esporos adquirem coloração verde opaca ou azul grisácea,

onde o nome de *Penicillium glaucum* ou *P. expansum*. Os esporos ovóides ou elípticos no interior de conidióforos formados em uma hifa fértil erecta, que dá verticilos de esterigmata, às vezes em camada única, outras vezes em camadas superpostas. Esses conidióforos ramificados na extremidade com 4 a 10 ramificações, dão ao conjunto aspecto típico de pincel

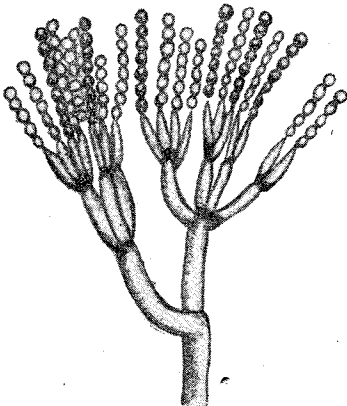


FIG. 7

Penicillium — Conidióforo e conídios (Brefeld)

Fig. 7.

g) *Aspergillus* — (Família *Aspergillaceae*).

Não é comum no tomate, apesar de ser dos que mais contribuem para alterações das substâncias alimentícias. Não produz gosto e cheiro de bolor. O micélio é de consistência mais debil que do *Penicillium*, os esporos estão agrupados em cachos esféricos, em conidióforos de coloração negra, como no *A. niger*, ou marron, *A. glaucus*, e, às vezes, amarelo alaranjada. A reprodução assexuada dos *Aspergillus* é sempre por meio de conidióforos, com aspécto constante para cada espécie. Esses conidióforos são formados por hifa eretil que se inicia ao longo do filamento miceliano, em célula especial de paredes mais espessas e que se denomina célula podal.

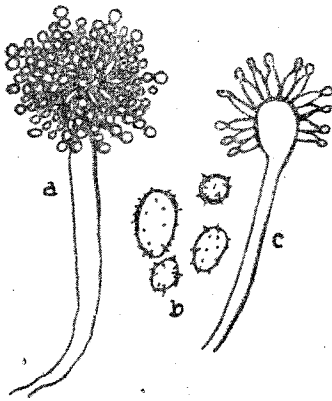


FIG. 8

Aspergillus — a) conidióforo e cabeça de *Aspergillus*; b) conídio; c) detalhe da cabeça. (Buchanan).

A célula podal tem forma de T e Y. Dela sae a estipe, ora contínua, ora septada, que se dilata na porção terminal para formar a *vesícula*; esse vesícula dá origem em toda sua superfície, ou só na região apical, a uma série de células que, dispostas radialmente, se denominam esterigmata. De cada uma dessas esterigmata, nascem os novos esterigmata, chamados secundários ou diretamente cadeias simples de conídios. O conjunto da vesícula com os esterigmata e o conídeo denomina-se cabeça de *Aspergillus*. Fig. 8.

h) *Botrytis* —

São raramente encontrados como causa da terioração dos tomates, embora sejam comuns em alguns outros tipos de deterioração de frutas. O micélio forma uma massa branco acinzentada. Os esporos nascem das ramificações do micélio como cachos de uva. Estes esporos são elíticos e individualmente se assemelham a células de levedura no tamanho e na forma. Fig. 9.

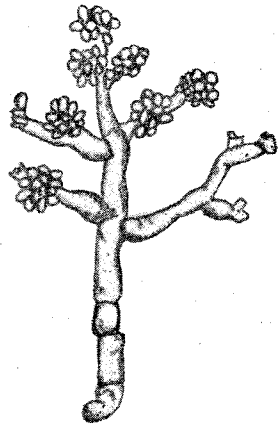


FIG. 9

Botrytis — Conidióforos, e conídios. (Frank).

CAPÍTULO IV

MÉTODOS

A lei americana sobre o controle de alimentos baseia o controle dos produtos de tomate no método de análise microscópica de Burton J. Howard e Charles H. Stephenson, da Divisão Microanalítica, da Federal Security Agency. Este processo que permite não só o controle sanitário, como verificar as condições da matéria prima utilizada, se baseia na contagem dos cogumelos, bactérias e leveduras considerados como os agentes principais da deterioração.

Certas técnicas têm sido sugeridas com o fim de melhorar o método original de Howard e Stephenson; assim Ch. Vincent propôs a contagem das bactérias em lâminas coradas pelo azul de Loeffler, Bertarelli propôs a filtração prévia da emulsão destinada à preparação. São pequenas modificações que não lograram entrar na prática corrente. Assim é sobre o processo original dos autores americanos que se têm baseado todas as legislações referentes ao assunto.

Além do método de Howard para contagem de cogumelos, leveduras e bactérias são aqui descritos os métodos de Ch. Vincent, para contagem de bactérias, o método de Smith para verificação de cogumelos em suco de tomate e em produtos enlatados contendo produto de tomate e o processo de Howard para determinação de fragmentos de insetos nos produtos de tomate.

Contagem de cogumelos

Material necessário:

- 1) Microscópio equipado com platina à charriot, aumento compreendido entre 80 e 120 diâmetros e tubo extensível para poder focalizar um campo circular de 1,5 milímetros quadrados.
- 2) Objetoivo micrométrico de 2' mm. dividido em 200 partes para medir o diâmetro do campo de observação que deverá ter 1,382 mm..
- 3) Câmara de Howard para a contagem de filamentos micelianos. Formada por uma lâmina grossa, em cujo centro, um pouco deprimido, encontra-se um disco polido de diâmetro de 19 mm., tendo dois cavaletes que servem de assento à lamínula, dispostos de

tal maneira que, entre o disco e a lamínula, permaneça um espaço de 0,1 mm., no qual se colocará uma camada de extrato a examinar.

- 4) Proveta graduada de 10 cc..
- 5) Espátula ou bisturi de tamanho médio.
- 6) CORANTES:

Solução de azul de algodão, preparada do seguinte modo:

Lactofenol (partes iguais de fenol, ácido láctico, glicerina e água)	100 cc.
Azul de algodão (Baumwolblaw)	0,1 gr.

Modo operatório: 1) Diluir a amostra na proporção de 1/3, homogeneizando bem. Howard indica a diluição com água; nós empregamos a técnica de Rivas, com o fim de facilitar o reconhecimento de cogumelos, fazendo a diluição com solução de azul de algodão, que, ao corar o protoplasma do cogumelo, torna mais visíveis as paredes e tabiques do micélio.

O azul de algodão não cora os protoplasmas velhos, pelo que, antes de anotar um campo negativo, é necessário aprofundar a observação do mesmo, para constatar si não ficou algum cogumelo por corar. É preciso notar que o azul de algodão cora também al-



MICROFOTO 12

Blóco de filamentos micelianos encontrado em conservas de tomate (orig.)

guns elementos anatômicos do tomate, como as células pilíferas desprendidas ou isoladas que, por sua forma, são fáceis de diferenciar dos cogumelos. *Fig. 10, 11 e 12.*

2) Estender, com a espátula, uma gota da diluição sobre a câmara de Howard e colocar a lamínula, de modo a obter uma camada uniforme do material e examinar. É muito importante para a exatidão dos resultados que a mistura seja bem homogênea e, que, sobre a câmara, seja colocada a quantidade justamente necessária de amostra para ocupar todo o disco sem extravassamento lateral; os anéis de Newton deverão ser visíveis. (Formam-se, quando se ajustam os cristais de superfícies polidas e são devidos à decomposição da luz).

3) Levar a preparação ao microscópio e observar com aumento aproximado de 100 diâmetros, 25 campos diferentes de $1\frac{1}{2}$ mm. quadrados, contando os positivos ou negativos pela presença ou ausência de cogumelos. Para que um campo se considere positivo é necessário que o comprimento do cogumelo, ou as pontas dos cogumelos visíveis, si houver vários, excedam a $\frac{1}{6}$ parte do diâmetro do campo. O disco micrométrico deverá ser usado para essas verificações.

4) Carregar novamente a câmara e repetir a contagem.

5) Somar os campos positivos das duas observações multiplicando por 2, para referir os resultados a 100% de campos positivos.

A *Fig. 15* mostra também uma vista lateral, em detalhe, de câmara de Howard. A área chata circular A, as áreas de contacto B e a lamínula de 33×33 mm. aí estão bem visíveis. Estas áreas deverão ser rigorosamente limpas antes do uso da câmara. Deve ser usado o ácido clorídico forte para esta limpeza. Lavar depois perfeitamente com água destilada, com álcool e, finalmente com acetona afim de retirar todas as partículas de poeira.

A câmara foi construída de modo a ter uma camada de líquido com a altura de 0,1 mm., quando a lamínula estiver em contacto suficiente para produzir os discos de Newton. Os discos aparecem entre as superfícies em contacto. Estes discos ou anéis coloridos, como já referimos acima, são um bom critério da exatidão do contacto. A dificuldade em obter esses discos é indicação da insuficiente limpeza das superfícies em contacto. O diâmetro do campo de 1.382 mm. é mais facilmente obtido com objetiva de 16 mm. e a

(*) As figs. coloridas acham-se no final do artigo.

ocular 10X, devendo o tubo do microscópio ser estandardizado de modo a ser obtido o campo desejado. Como só são considerados na contagem os filamentos que têm aproximadamente $1/6$ do diâmetro do campo, usamos com muito proveito o "Disco micrométrico de Howard" que deve ser ajustado no interior da ocular.

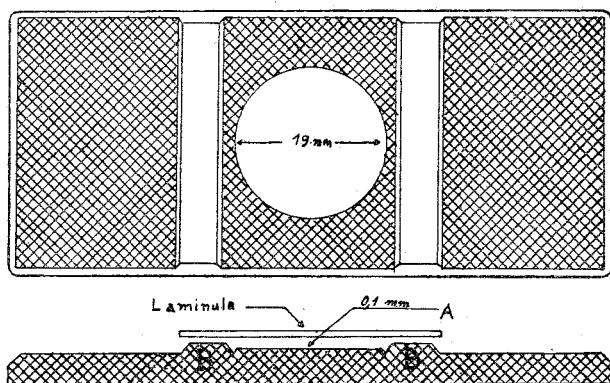


FIG. 13

Camara de Howard para contagem de micélios de cogumelos e, vista lateral, em detalhe.

O "Disco micrométrico de Howard" é um disco de vidro gravado com um quadrado grande e de tamanho tal, que se adapta exatamente ao diâmetro do campo. Está dividido em 6 partes, em ambas direções, formando 36 pequenos quadrados iguais. Os filamentos para serem incluídos na contagem deverão exceder o tamanho de um pequeno quadrado. *Fig. 13a.*

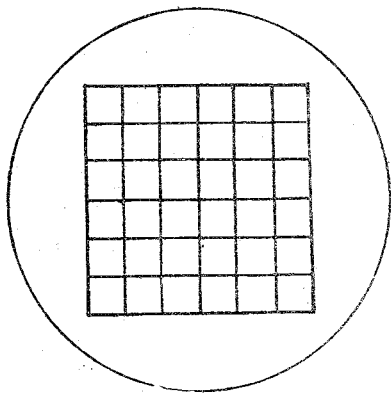


FIG. 13a

Disco micrométrico de Howard.

Contagem de leveduras e esporos

Material necessário:

1) Microscópio, como indicado anteriormente, equipado com os elementos necessários para obter aumento de 200 diâmetros em observação direta.

2) Lâmina de Thoma para contagem de sangue. Seu retículo ocupa uma superfície de 1 mm. quadrado, dividido por linhas tri-

plas, em 16 quadrados medianos de 0,0625 de mm. quadrados, que por sua vez estão subdivididos por linhas simples em 25 quadrados pequenos, de 0,0025 mm. quadrados, ou seja 1/400 mm. quadrados. Uma vez colocada a lamínula fica entre esta e a lâmina um espaço de 0,1 mm. de altura, formando uma câmara de 0,1 mm. cúbico.

- 3) Uma proveta de 30 c.c., uma de 100 c.c. e outra de 200 c.c..
- 4) Um Erlenmeyer de 100 c.c. e outro de 250 c.c..
- 5) Uma espátula pequena.
- 6) Um bastão de vidro com ponta redonda e grossa.
- 7) CORANTES:
- a) Solução de azul de metileno alcalino de Loeffler:

Solução alcoólica saturada de azul de metileno 1 vol.
 Solução aquosa de hidrato de sódio a 1:10.000 2 vol.

- b) Fucsina fenicada de Ziehl:

Fucsina 1,0
 Ácido fênico cristalizado 5,0
 Alcool absoluto 10 cc.
 Água destilada 90 cc.

Em gral de vidro dissolver a fucsina e o ácido fênico, juntan-do-se álcool, gota a gota; juntar 60 c.c. de água, passar para vidro escuro e lavar o gral com o restante de água. Filtrar depois de 48 horas.

- c) Solução de formalina a 40%.
- d) Água destilada.

Modo operativo: 1) Na proveta graduada colocam-se 10 c.c. de água destilada e a amostra a examinar até que o líquido chegue a marcar 15 c.c..

Mistura-se bem e passa-se para um Erlenmeyer, lavando-se a proveta com pequenas porções de água destilada.

2) Juntar 60 gotas de solução de azul de metileno e ferver durante 3 minutos, suavemente.

3) Juntar 60 gotas de fucsina de Ziehl e ferver durante 3 minutos,.

4) Deixar esfriar lentamente.

5) Juntar 8 a 10 gotas de formol para precipitar o excesso de corante e facilitar a conservação do preparado.

6) Levar o volume a um múltiplo de 15, com água destilada, diluindo a maior volume, à medida que aumente o conteúdo microbiano.

7) Agitar bem, deixar repousar 3 a 5 segundos e retirar uma gota grossa com bastão de vidro, a qual é colocada sobre o retículo da câmara de Thoma, cobrindo-se com lamínula. A preparação será correta quando aparecerem os anéis de Newton e não houver derrame lateral de líquido, apesar de ocupar todo espaço existente entre a câmara e a lâmina.

8) Levar a lâmina ao microscópio, deixar repousar 15 minutos, para que os germes permaneçam em um mesmo plano e contar as leveduras e espóros em 8 quadros grandes, que correspondem à metade da câmara. Contam-se somente os espóros e leveduras que por sua forma e tamanho sejam facilmente identificáveis. *Fig. 14.*

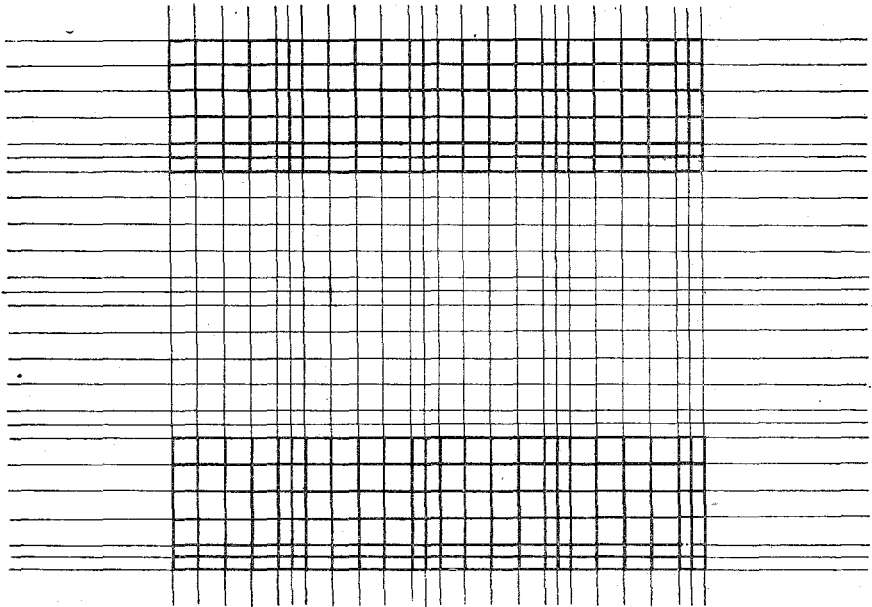


FIG. 14

Reticulo da camara de Thoma, estando marcados com linhas mais grossas os quadradinhos onde deverão ser contadas as leveduras e espóros. (Seg. Rivas).

Contagem: O volume total da câmara é de $1/10$ mm. cúbicos ($1 \times 1 \times 0,1$ mm.) é como só são contados os germes da metade, o número obtido correspondente a $1/20$ de cúbido. Para ter o volume de amostra a que corresponde o número de leveduras e espóros encontrados, sobre a diluição com que se carregou a câmara, ter-se-á que dividir $1/20$ pela diluição empregada.

Supomos haver encontrado 56 leveduras e esporos em uma amostra diluída 9 vezes (5 de extrato 4,0 c.c. de água), temos que esse número está contido em 1/20 dividido por 9,0 que é igual a 1/180 mm. cúbicos da amostra, donde deduzimos que 1 mm. cúbico conterà:

$$56 \times 180 = 10.080 \text{ leveduras e esporos; em 1 c.c. terá:}$$

$$10.080 \times 1,000 = 10,080.000 \text{ leveduras e esporos.}$$

Howard refere suas numerações a 1/60 mm. cúbicos da amostra porque esse é o volume da amostra a que corresponde a numeração, quando se carrega a câmara com uma diluição ao terço (5 c.c. de extrato em 10 c.c. de água). para referir as quantidades obtidas de numeração com outras diluições múltiplas de 15, a 1/60 mm. cúbicos da amostra, é suficiente multiplicar a quantidade de leveduras e esporos encontrada pelo quociente resultante da divisão da diluição por 3.

No exemplo citado: $\frac{3}{9} = 3$; $56 \times 3 = 168$, que é o número de leveduras e esporos correspondente a 1/60 mm. cúbicos da amostra examinado.

FATORES PARA DETERMINAR O NÚMERO DE LEVEDURAS E ESPOROS ENCONTRADOS EM 1/2 CÂMARA A 1/60 MM. CÚBICO E A 1CM³ DA AMOSTRA DE TOMATE ANALISADA:

Diluições	N.º de esporos e leveduras em:	
	1/60 mm. ³	1 cm. ³
1/3 (5 c.c. amost. e 10 c.c. água)	n x 2	60.000
1/6 " " 25 "	n x 2	120.000
1/9 " " 40 "	n x 3	180.000
1/12 " " 55 "	n x 4	240.000
1/15 " " 70 "	n x 5	300.000
1/18 " " 85 "	n x 6	360.000
1/21 " " 100 "	n x 7	420.000
1/24 " " 115 "	n x 8	480.000

n: significa número de leveduras e esporos em leitura direta.
amost.: significa amostra.

Observações: 1) No método clássico de Howard a contagem de leveduras e esporos se faz diretamente, sobre a amostra diluída com água sem empregar corantes. Desta forma, em extratos ricos de germes, como os que examinamos, o método nos resultou embaraçoso pelas dificuldades encontradas em individualizar os germes.

Por esta razão é vantajosa a modificação sugerida por H. Miller, que consiste em corar as leveduras, espóros e bactérias com azul de metileno e fucsina, conforme foi anteriormente indicado.

2) Ao fazer a contagem o analista deve evitar de contar duas vezes os germes que estiverem sobre as linhas divisórias dos quadrinhos da lâmina, para o que é conveniente acostumar-se a registrar os localizados unicamente sobre dois lados, sempre os mesmos em cada quadrado; por exemplo: o superior e direito de cada quadrinho.

Contagem de bactérias

Material necessário:

1) Microscópio, indicado anteriormente, equipado com elementos necessários para conseguir um aumento de 500 diâmetros em observação direta.

2) Carrega-se a câmara de Thoma com o mesmo material e em idêntica forma que para a contagem de leveduras e espóros e deixa-se repousar 15 minutos.

3) Contam-se as bactérias em forma de bastõesinhos contidos em 5 retângulos de 5 quadrinhos cada um, distribuindo-os de modo que estejam em posição equidistantes — um em cada canto da lâmina e outro próximo do centro. *Fig. 15*

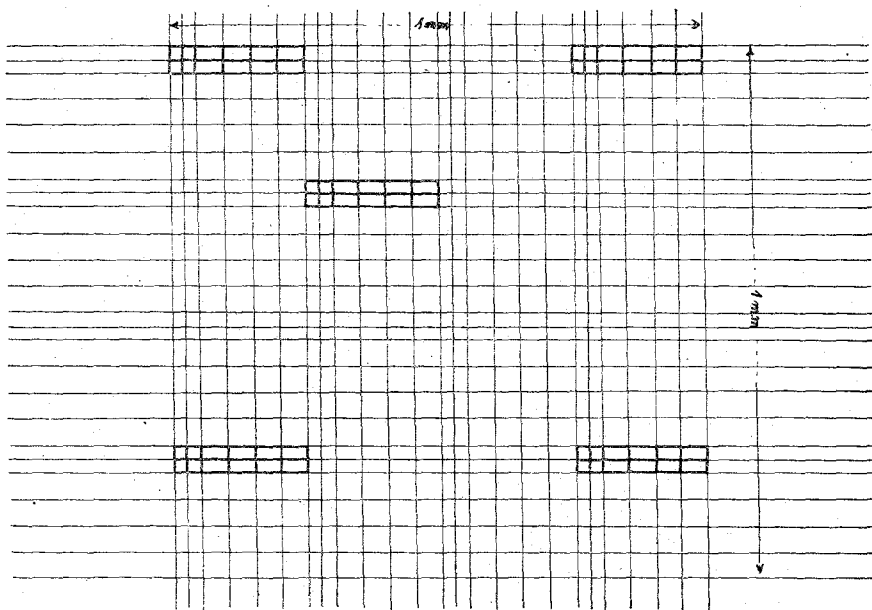


FIG. 15

Reticulo da camara de Thoma, indicando com linhas mais grossas os quadradinhos onde deverão ser contadas as bactérias. (Seg. Rivas).

Contagem: O número n de bacilos encontrados, corresponde a $1/160 \text{ mm.}^3$ de diluição. Com efeito, a câmara completa, composta de 400 quadrinhos contem $1/10 \text{ mm.}^3$; um quadrinho terá: $1/10$ dividido por 400, o que equivale a $1/4.000 \text{ mm.}^3$. 25 quadrinhos: $1/4000 \times 25 = 1/160 \text{ mm.}^3$.

O número n de bacilos determinado em $1/160 \text{ mm.}^3$, multiplicado por 160, pela diluição empregada e por 1.000, dará as bactérias em forma de bastonete em 1 cm.^3 de extrato.

FATORES PARA DETERMINAR O NÚMERO N DE BACTERIAS DE $1/160 \text{ MM.}^3$ DE DILUIÇÃO EM 1 CM.^3 DA AMOSTRA

Diluição		N.º de bactérias em 1 cm.^3 da amostra		
1/3	$n \times$	480.000	$(160 \times 3 \times 1.000)$	
1/6	$n \times$	960.000	" 6	"
1/9	$n \times$	1.440.000	" 9	"
1/12	$n \times$	1.920.000	" 12	"
1/15	$n \times$	2.400.000	" 15	"
1/18	$n \times$	2.880.000	" 18	"
1/21	$n \times$	3.360.000	" 21	"
1/24	$n \times$	3.840.000	" 24	"

Observações: 1) Só se computam as bactérias bem caracterizáveis com forma de bastão, que tenham um comprimento mínima de $1\frac{1}{2}$ vezes sua *espessura*; não são contados os cócos e os diplocócos.

2) Os bacilos se movem na camada líquida e por isso às vezes aparecem momentaneamente como cócos, sendo necessário fazer detida observação para estabelecer o verdadeiro caracter dos cócos suspeitos.

3) A observação deve ser feita com luz artificial.

Método de Ch. Vicent para contagem de bactérias: A contagem microbiana em câmara de Thoma Zeis é substituída pela contagem em lâmina fixada e corada. Diluir o concentrado com duas partes de água esteril, tomar 1 centésimo de cúbico do material, dispor sobre um quadrado previamente marcado de 1 cc. . Deixar secar, fixar em álcool, corar com azul de metileno de Loeffler, examinar com imersão contando os germes em campos com o diâmetro $0,205 \text{ mm.}$. Multiplicar por 300.000 e obtem-se o resultado do número de germes por cc. .

Bertarelli e Micheli (1920) propuzeram também pequena modificação. Colocar 2 cc. do concentrado em água e homogenei-

sar bem com espátula. Juntar água destilada até completar 50 cc. Agitar bem com pérolas de vidro afim de destacar as bactérias dos fragmentos. Passar por filtro quádruplo de gaze, lavando esta com mais 50 cc. de água destilada, que será adicionada aos outros 50 cc. Com este processo somente de 15 a 20% dos germes são retidos na gaze.

Método para verificação de cogumelos em suco de tomate e em produtos enlatados contendo produtos derivados de tomate (Método de F. Smith).

Material necessário:

- 1) Solução saturada de KOH
- 2) Tubos centrifugadores de 50 cc.
- 3) Centrifugador
- 4) Solução aquosa saturada de violeta de genciana
- 5) Bastões agitadores de vidro
- 6) Bechers pequenos
- 7) Câmara de Howard para contagem de cogumelos
- 8) Microscópio binocular
- 9) Ácido fosfórico a 50%
- 10) Metil-etil-acetona.

Em virtude das diferenças nas técnicas aconselháveis para os diversos produtos, elas foram divididas em 3 grupos. Contudo, mesmo assim, as amostras de cada grupo variam na consistência, em tal extensão, que esses agrupamentos são somente aproximados, devendo o analista fazer uso de sua habilidade própria na solução de cada caso, aplicando métodos especificamente adaptáveis a eles.

Exame do suco de tomate

Este controle apresenta atualmente, no Brasil, certo interesse, dada a intensa campanha que a Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo (1937), vem desenvolvendo no sentido de incrementar a indústria e o consumo dos sucos de tomate. O rápido amadurecimento de toda safra, a ligeira superprodução durante o verão e, sobretudo, a fácil deterioração do tomate depois de amadurecido, são fatores que deveriam estimular a fabricação deste produto. Nos Estados Unidos esta indústria do suco de tomate, relativa-

mente nova, sofreu grande incremento; passou de 154.000 caixas de garrafas em 1929, para 1.386.000 em 1930, 3.441.000 em 1931 e a 4.450.000 em 1932; ocupando as respectivas plantações 15.000 hectares de terras e dando trabalho a milhares de trabalhadores que, antes não contavam com mais esse ramo novo de atividade.

A principal dificuldade no exame de certos produtos deste tipo é a presença de grande quantidade de material amidado como farinha de rosca e farinha de trigo.

No caso de sucos espessos, é melhor colocar a lata em água quente por alguns minutos, até ficar homogeneamente aquecida. Facilita-se isto, agitando-se a lata. Em produtos mais fluidos é dispensável o aquecimento prévio.

Colocar 10 cc. do suco perfeitamente misturado, em um tubo centrifugador largo, de 50 cc., ou maior, e adicionar 3 cc. de uma solução de KOH; um pouco mais não prejudicará. (Si fôr necessário adicional 10 a 15 cc. de metil-etil acetona para retirar a gordura. Após agitar bem, a acetona que se eleva à superfície fica colorida de vermelho, devendo ser rejeitada. Si, porém, bastar a KOH para saponificar a gordura, é desnecessária a adição da acetona).

Agitar por alguns minutos até dissolver o amido do suco e clarear os tecidos. Adicionar água suficiente para encher o tubo e centrifugar.

Nos sucos concentrados, o amido muitas vezes interfere com a sedimentação dos sólidos, durante a centrifugação.

Si o líquido permanece opaco, é necessário rejeitar a amostra e iniciar outra vez com 5 cc. de suco, em vez de 10 cc., procedendo como habitualmente com os 3 cc. de KOH.

Quando o líquido sobrenadante ficar perfeitamente claro e as partículas sólidas depositarem-se, o líquido deve ser transvasado, verificando si contem fragmentos de cogumelos.

Si nenhum filamento de cogumelo fôr encontrado nesse líquido sobrenadante, adicionar água suficiente ao resíduo do tubo centrifugador para restabelecer o volume primitivo de suco, misturar e fazer a contagem pelo método usual de Howard.

Para facilitar o exame, algumas gotas de violeta de genciana podem ser adicionadas. A violeta de genciana, colorindo os filamentos. Será conveniente neutralizar o KOH com algumas gotas de

Será conveniente neutralizar o KOH com algumas gotas de ácido fosfórico a 50%.

Isto deverá ser feito após o líquido sobrenadante ter sido rejeitado, e antes de ter sido adicionada a água para restabelecer o volume original de 10 cc.

*Exame da carne enlatada e de outros produtos enlatados
contendo produtos de tomate*

Estes produtos são tratados de modo idêntico.

A conserva enlatada ainda fechada é colocada em água quente e aquecida até o conteúdo ficar homogeneamente amornado. Este aquecimento preliminar não condensa o molho de tomate, permitindo separar mais prontamente as porções sólidas do produto. A conserva é então aberta e o conteúdo esvasiado em uma peneira medianamente grossa, de 6 malhas.

Em alguns produtos, o molho atravessa a peneira prontamente, mas, no caso de alguns feijões e spaghetti, pode demorar 10 ou mais minutos.

Deve-se esgotá-lo ao menos até que a maior parte do líquido tenha passado.

Misturar bem o molho, colocar 10 cc. em um tubo centrifugador e proceder como para o suco de tomate.

Na contagem de produtos contendo carne, deve-se ter cuidado para não confundir filamentos de cogumelos e filamentos dos músculos que apresentam semelhança superficial, embora os filamentos dos músculos sejam mais espessos e as estriações frequentemente perceptíveis.

Exame de sardinhas ou outros peixes em produtos de tomate

O exame destes produtos apresenta dificuldade devido à grande quantidade de gordura e óleo. O molho contém em geral pouco óleo adicionado, o óleo aí presente provem do próprio peixe.

Por esta razão, é possível rejeitar o óleo sem afetar partes essenciais do molho original. A conserva é aquecida em água fervente e o molho é escoado como em outros produtos.

O molho é então bem misturado e uma parte é colocada em um tubo centrifugador, sendo centrifugado até o óleo ascender à superfície. Sendo o óleo rejeitado, tratar 10 cc. do molho com 3 cc. de KOH, como em outros produtos.

Em arenques ou outros produtos em que há pouco óleo, não há necessidade de removê-lo.

Deve-se tomar a maior cautela no exame, afim de distinguir os filamentos de cogumelos, dos filamentos de tecidos do peixe.

Determinação de fragmentos de insetos nos produtos de tomate

Este método foi imaginado por Howard e baseado no processo de Wildmann para exame de pequenos insetos em vegetais enlatados.

Material necessário:

- 1) Frasco de Erlenmeyer de 2 litros
- 2) Rolha de borracha de tamanho tal que possa ser introduzida com dificuldade no interior do frasco. A rolha deverá ser mantida no interior do frasco por meio de uma haste firme que passe além da altura do frasco. *Fig. 16*
- 3) Funil de Buchner de 7 cc., munido de papel de filtro rápido de 7 cc..
- 4) Um disco de 6 cm. munido com tela de arame com 60 malhas.
- 5) Microscópio binocular capaz de dar um aumento de 10 a 30 diâmetros.

Accessórios:

- 1 lapis indelevel, de ponta fina, para indicar sobre o papel de filtro a colocação de cada inseto.
- 1 anel de metal ($8\frac{1}{2}$ cm. de diâmetro), contendo fios de arame muito finos ou cabelo humano, com intervalos de 7 mm.. Este é fixado sobre o papel de filtro, colocado dentro de uma placa de Petri, para conveniência de exame. Os arames servem de guia para pesquisa metódica dos fragmentos de insetos.
- 1 agulha fina de separação, feita pela inserção do fundo de uma agulha de costura n.º 12, em um cabo de madeira branda. Esta é usada para manipulação dos fragmentos de insetos sobre o papel de filtro.
- 1 aro de borracha de mais ou menos $\frac{3}{16}$ de polegada é cortado com diâmetro proporcional ao funil de Buchner. É colocado no fundo do funil e sobre uma faixa marginal do papel de filtro, da largura de $\frac{1}{4}$ de polegada. Esta borracha é mantida firmemente no lugar em contacto com o

papel de filtro, por um cilindro de vidro apropriado, ligeiramente mais comprido do que a altura do funil, e conservada no lugar por uma fina mola de latão com grampos que têm uma abertura de 1 polegada, no centro, através o qual passa o pé do funil. Os dois braços são dobrados de tal maneira, que as extremidades adaptam-se sobre ângulo superior do cilindro de vidro. Afim de removê-lo é necessário somente soltar as extremidades para desprender o círculo de vidro. A tensão das partes formando os traços deve ser tal que forneça uma pressão moderada, sem ser tão forte que chegue até a arrebentar o vidro. *Fig. 17*

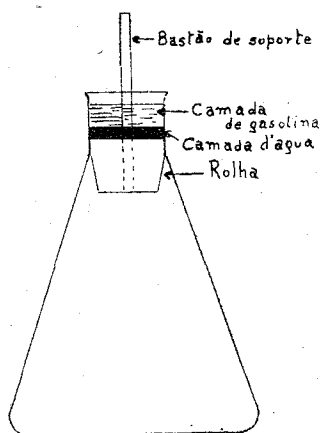


Fig. 16

Diagrama do frasco de Wildmann usado para retirar fragmentos de insetos em produtos de tomate. (seg. Howard).

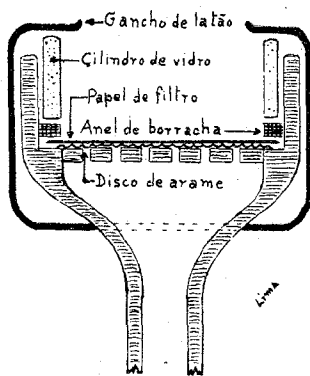


Fig. 17

Funil de Buchner segundo as indicações do texto (vista lateral). (seg. Howard).

Técnica do Método: — A rolha, sustentada pelo bastão, é imprensada para dentro do frasco de Erlenmeyer.

No caso de massa, de “catsup”, etc., 200 cc. do produto a ser examinado são colocados no frasco e adicionando-se 20 cc. de gazolina. Amostra em exame e a gazolina são perfeitamente agitados.

A água da torneira, mais ou menos à temperatura ambiente, é lançada no frasco de modo a ocasionar vigorosa agitação; o conteúdo deverá ascender até o gargalo do frasco até o ponto em que a rolha possa ser levantada.

Deixar repousar 5 ou 10 minutos, efetuando um brando movimento giratório por meio da rolha e bastão, para facilitar que as partículas mais leves cheguem ao gargalo.

Finalmente, levantar vagarosamente a rolha, até ajustar-se firmemente ao gargalo do frasco, de maneira a apanhar a camada de gazolina e pequena porção da sub-camada aquosa, não devendo apanhar além de 3/16 de polegada. *Fig. 16*

O analista não deve apanhar da camada aquosa mais do que o necessário afim de não reter material celular do tomate aí em suspensão, o que viria interferir com a filtração e tornar mais difícil a subseqüente pesquisa das partes de inseto.

Como guia a este respeito, é bom determinar por tentativas o ponto, no gargalo do frasco, em que a camada aquosa deve ser interrompida, para atingir os melhores resultados. Após a rolha ter sido levantada até o ponto conveniente adicionam-se 10 ou 15 cc. de água pura à porção aí aprisionada, para aumentar ligeiramente o seu volume.

Derramar depois cuidadosamente a porção de líquido apreendido sobre o filtro de Buchner, munido de papel de filtro e sobre o qual foi colocado o disco de arame.

Enxaguar o gargalo do frasco para remover alguns fragmentos de insetos aí remanescentes, e adicionar ao material que está sobre o papel de filtro.

Retirar o papel de filtro e pesquisar os fragmentos de insetos, com auxílio do microscópio, anotando o número de fragmentos de cada espécie encontrada e marcando as suas localizações com lapis indelevel. É de grande auxílio o uso de um foco de luz forte.

Enquanto a pesquisa de fragmentos estiver sendo feita, é conveniente conservar o papel de filtro levemente humedecido.

No caso de pasta, são usados 50 ou 100 cc. do produto, conforme a sua concentração.

Antes de ser adicionada a gazolina, a pasta deverá ser misturada com 200-300 cc. de água. Após a prova ter sido completada, os resultados superiores a 200 cc. são calculados de acordo com a quantidade usada na prova.

Na possibilidade de apanhar muito material celular, assim como da dificuldade na filtração, algumas provas preliminares podem ser feitas, apanhando uma quantidade de líquido retido no gargalo um tanto maior, e colocando-a dentro do frasco de Erlenmeyer de 500 cc., provido com rolha e bastão semelhante ao frasco grande.

No pequeno frasco de Erlenmeyer é feito idêntico tratamento desta 1.^a porção antes de ser lançado sobre papel de filtro. Este processo permitirá reduzir o material celular retido.

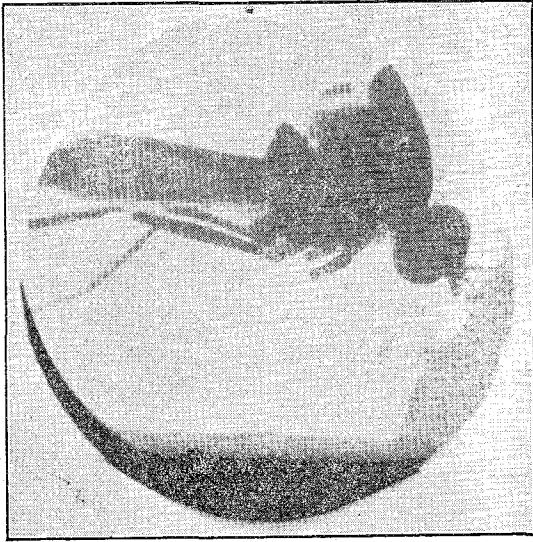


FIG. 20

Inseto adulto encontrado em concentrado de tomate de fabricação clandestina (orig.)

A tolerância admitida pela "Federal Food and Drug Administration" é de um máximo de 20 fragmentos, por 200 cc. da amostra de produto examinada.

Encontramos algumas massas com grande proporção de insetos adultos inteiros, fragmentos de insetos, larvas e outras sujidades. *Figs. 18, 19 e 20.*

CAPÍTULO V

CRITICAS AOS MÉTODOS

Cabe à Divisão Microanalítica, da "Food and Drug Administration", pertencente à "Federal Security Agency" e sob orientação de J. B. Howard, todo o mérito de haver estabelecido as técnicas microscópicas para o controle sanitários dos produtos de tomate.

São facilmente calculadas as dificuldades encontradas para estabelecer sistemas exatos de controle, em substâncias onde jamais se haviam praticado controles realmente eficientes e, nas quais, parecia totalmente impossível que pudessem vir a ser praticados.

As dificuldades iniciais foram julgadas quasi que intransponíveis, pois os analistas americanos deveriam estabelecer um sistema de controles que estivesse dentro das possibilidades práticas e acima de numerosas críticas. Com efeito, uma vez publicado e adotado pelo Governo Norte-americano, sobre esse método foram feitas

muitas críticas, não só dentro do país como principalmente nos países interessados na exportação dos concentrados de tomate para os Estados Unidos da América do Norte.

Apesar da guerra de que foi alvo por mais de 20 anos, por deficiências facilmente compreensíveis em se tratando de assunto tão complexo, nada existe até o presente, de melhor.

Dentre as dificuldades com que o método se defronta na prática corrente, algumas merecem realmente consideração. Tais reparos porém não diminuem, em absoluto, o valor do mesmo. Dentre os inconvenientes apontados, destacam-se os referentes à contagem e observação dos cogumelos, à contagem das bactérias vivas ou mortas e à dificuldade de controle das leveduras e esporos. Analisemos rapidamente essas críticas:

A — *Quanto à contagem de filamentos micelianos:*

1.º) *Concentração do produto em exame.* A crítica mais forte é de ser aplicado o mesmo critério na contagem dos filamentos de cogumelos, a produtos muito diversos, tanto em conteúdo como em apresentação. A crítica procede, em parte, porém as soluções propostas não lograram aceitação. Como o erro é sistemático, os resultados são comparáveis e os limites de tolerância já estabelecidos podem ser mantidos sem inconveniente.

2.º) *Obstáculos na contagem.* A observação dos filamentos micelianos poderá ser prejudicada. Os preparados, ainda que feitos com o máximo cuidado e esforçando para obter densidade constante, poderão apresentar em certos pontos do campo microscópico uma visão pouco clara. É assim impossível obter uma distinção rigorosa entre as substâncias observadas, como seria o desejável. Isto ocorre tanto em materiais pobres como nos mais ricos.

3.º) *Critério uniforme.* O critério uniforme adotado, nas contagens, pode ser causa de conclusões dispares. Para efeito das contagens, considera-se positivo todo o campo que apresente filamentos de cogumelo maiores do que $1/6$ do campo padronizado do microscópio. Tanto vale, para os efeitos de contagem, observar no campo microscópico um só e pequeno fragmento de micélio que mal atinge $1/6$ do campo, como grande entrelaçamento de numerosos filamentos micelianos, constituindo verdadeira massa. Este critério acarreta dúvidas sobre índice de contaminação. Nada existindo de melhor e como nenhuma sugestão razoável foi lembrada para afastar esse inconveniente, deverá prevalecer o critério. O seu em-

prego sistemático permitirá a avaliação comparativa dos limites de tolerância.

B — *Quanto à contagem das bactérias:*

1.º) *Contagem de bactérias vivas ou mortas.* Um dos inconvenientes apontados ao método é de não poder ser feita a distinção entre bactérias vivas ou mortas, sendo contadas indiferentemente umas e outras.

2.º) *Obstáculos na contagem.* Os mesmos inconvenientes apontados na contagem dos cogumelos são também aqui apontados. Além disto, os fragmentos do concentrado de tomate poderão ocupar uma certa extensão do campo microscópico, ocultando parte dos germes que deveriam ser computados. Bertarelli (1920) procurou resolver esse inconveniente aconselhando a que se fizesse a filtração prévia do concentrado, diluído a 100 cc. de água.

3.º) *Morfologia dos germes.* O processo só é aplicável aos microorganismos com a forma de bastonete. Os germes em forma de cócos escapam à contagem, assim como os bastonetes quando observados pelos seus pólos. E' sem dúvida um obstáculo a exata apreciação do índice de contaminação, subtraindo à contagem numerosos germes. A técnica de Ch. Vincent procura remover esta deficiência afastando alguns inconvenientes apontados.

C — *Quanto à contagem de leveduras e esporos:*

A tendência é abandonar estas contagens, devendo o contrôlle se restringir às duas outras contagens. Isto, em virtude da dificuldade de serem obtidos resultados comparáveis. E' raramente conseguida correspondência entre duas contagens de leveduras e esporos. Por outro lado a contagem dos esporos dos ifomicetos não apresenta um interesse maior desde que já são contados os filamentos. Assim será de melhor alvitre suprimir esta contagem que pode acarretar certas causas de erro dificilmente removíveis.

Nas críticas de ordem geral os microscopistas estão de acordo que se deveria dispensar uma maior atenção à *concentração* do produto em exame. Os limites estabelecidos deveriam estar relacionados com os concentrados simples, para os concentrados duplos e triplos deveriam ser estabelecidos outros limites de tolerância. Assim, por exemplo, os limites deveriam se relacionar com concentrados de não mais de 20 a 22% de resíduo, para os concentrados

duplos ou triplos as cifras poderiam ser aumentadas para 1/5 e 1/4, respectivamente.

Os limites de tolerância podem ser estabelecidos para os produtos de exportação; os trabalhos realizados provam que o aumento das bactérias, quando vivas nas latas, raramente vai além de 1 a 1,5%, mesmo após a incubação das mesmas na estufa a 37°C. por tempo mais ou menos longo. É necessário admitir certa proliferação, porque a esterilização radical não é exequível. Os industriais, seguindo orientação técnica adequada, poderão perfeitamente conseguir concentrados dentro dos padrões oficiais. Deverão ser observadas as condições essenciais na indústria de concentrados, isto é, trabalhar com material bem fresco, perfeitamente limpo e colhido o mais recentemente possível, afim de evitar a fermentação. As fábricas deveriam, sempre que possível, ser construídas no próprio local dos campos de cultura.

CAPÍTULO VI

ADULTERANTES

Os principais adulterantes encontrados durante as nossas investigações nos produtos derivados do tomate (massas e extratos) foram: a abóbora (*Curcubita pepo*), o pimentão (*Capsicum annum*), a batata doce (*Ipomoea batatas*), a banana (gênero *Musa*). Outros adulterantes foram encontrados em pequena quantidade, relativamente aos já mencionados: o xuxú (*Sechium edule*), a beringela (*Solanum melongena*), a cenoura (*Daucus carotta*) e a pera (*Pyrus communis*). Afim de tornar mais clara esta exposição, incluímos neste capítulo um estudo da histologia microscópica do tomate. Analisemos, pois, rapidamente a estrutura microscópica diferencial entre o tomate e os diferentes adulterantes.

TOMATE (*Lycopersicum*, gen.)

No Brasil as conservas de tomate são preparadas com diferentes variedades do gênero *Lycopersicum*. Os tomates usados na indústria são em geral moderadamente grandes, lisos, de maneira que a lavagem pode ser perfeitamente realizada e as cascas facilmente removidas. Nas variedades comerciais são exigidas no tomate grande proporção de polpa, sabor agradável e coloração

vermelho carregada. As variedades muito húmidas, de casca enrugada ou de coloração amarelada não são cultivada para industrialização.

No Estado de São Paulo, segundo Lorena (1937) as variedades mais cultivadas e conhecidas são: "Pera", "Rei Humberto", "Purungo", "Redondo grande". Em 1929 foram importadas da Holanda, Dinamarca e Inglaterra 14 variedades. Destas, porém, só 5 se aclimataram convenientemente: "Ailsa Graig", da Holanda, conhecida por esta razão com o nome de "Holandês"; "Triumph", da Holanda e Dinamarca; "Kampehon" e "Radio", da Holanda, e "Canárias" da Inglaterra. Lorena (1937) acredita que esta variedade seja a mesma difundida como "Redondo grande". Nos Estados Unidos são cultivadas numerosas e excelentes variedades, altamente selecionadas: "Stone", a mais difundida. "San Jose Canner" popular na Califórnia. "Norton" do sul da Califórnia, variante da "Stone" e resistente ao "*Fusarium*". "Santa Clara Canner" e "Diener" do norte da Califórnia. "Matchless" de Delaware e Maryland. São ainda cultivadas as variedades: "Paragon", "Lan-dreth", "Coreless", "Perfection", muito recente, "Great Baltimore", "Favorite", "Red Rock" e "Sucess".

Na Argentina o Ministro da Agricultura fez experiências com as variedades: "Marglobe", "Market King", "Hillside Comet", "Clarks" e "Livington Globe", com resultados muito satisfatórios. Por seu valor comercial, são ali mais cultivadas as variedades "Marglobe", "Clark Eearly" e "Livington Globe".

No preparo das conservas é empregada apenas a polpa espessa do mesocarpo do tomate, cujos caracteres pouco definidos dificultam o reconhecimento dos adulterantes, reconhecimento esse só possível por microscopistas muito especializados.

A diferenciação requer não só um perfeito conhecimento geral da histologia vegetal, mas particularmente da estrutura característica de cada elemento a definir, seja adulterante ou não. Para maior clareza do assunto são resumidamente descritos os principais característicos do tomate.

Estrutura microscópica do tomate — A casca é lisa, lustrosa, cor amarelada ou vermelha, cicatriz genérica ou típica e cicatriz peduncular grande, em depressão; sementes numerosas, revestidas de densa camada de falsos pelos, unicelulares, longos e regulares, quando desembaraçadas da substância gelatinosa que as envolve.

Estrutura microscópica — As células do epicarpo e do hipoderma são poligonais, de membranas espessas e resistentes, contendo granulações de matéria corante vermelha ou amarelo brilhante. O mesocarpo é constituído por células grandes, arredondadas, de membranas gelatinosas, contendo cromoblastos e, algumas delas, grânulos de amido. Formam um tecido básico, através do qual passam feixes de vasos espiralóides de seiva, de espirais curtas e delicadas. *Fig. 21.* As extremidades interna do pedúnculo possui também alguns vasos ponteados e fibras esclerosadas. As células do endocarpo são igualmente arredondadas, porém de paredes finas. *Figs. 21, 22, 23 e 24.*

A semente do tomate, devido a estrutura particular do espermoderma ou epiderme, constituído de células isodiamétricas, com sinuosidades espessas, e, ao seu revestimento de falsos pelos, constitue um dos elementos mais característicos do tomate, nas suas conservas. *Fig. 25.*



Fig. 26

Tricomas do próprio tomateiro (caule e folha)

NOTA — Nas conservas de tomate (massas, principalmente) é comum a presença de elementos do caule e da folha do tomateiro, ou do pedúnculo do próprio tomate. Tais elementos, que denotam descuido na elaboração higiênica das conservas, poderão acarretar confusões aos analistas não suficientemente especializados neste difícil ramo dos controles sanitários, induzindo-os à condenação de produtos puros. É relativamente facil

sua caracterização pela identificação dos estomas e de grande número de tricomas da epiderme, cujas células pequenas e pigmentadas de clorofila, destacam-se em blocos escuros, dos demais elementos, mesmo quando observadas com aumento de 80 diâmetros. *Fig. 26.*

ABÓBORA (*Curcubita pepo*)

Encontramos esse adulterante em 29% das amostras examinadas. É a adulteração mais frequente, principalmente nas massas de procedência clandestina. É empregada por seu baixo preço e por suas propriedades culinárias.

Estrutura microscópica — As células do mesocarpo, a parte utilizada nas fraudes, são poliédricas e de contornos finos, menores do que as do tomate, contendo, também, pigmentações, mas de cor amarela, grânulos de amido que se apresentam separadamente ou em conjunto de dois ou três grânulos. *Fig. 27.*

O mesocarpo interno, parcialmente desorganizado, é composto de um emaranhado de feixes de tubos lactíferos e tubos de seiva. Para diferenciação microscópica com o tomate devemos considerar a estrutura dos tubos de seiva, que também são espiralóides, porém de espirais largas e grossas, apresentando dilatações espaçadas, em um conjunto bastante interessante.

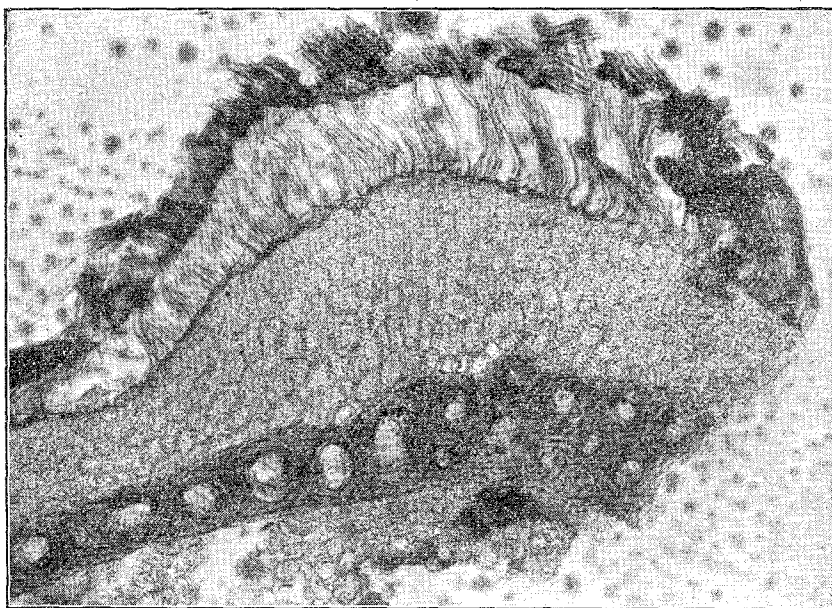


FIG. 28

Corte transversal da semente de abóbora. Células porosas da camada sub epidermica.

Semente — Espermoderme ou epiderme externa com hastes que ramificam para a extremidade; sub-epiderme de pequenas células porosas, muito típica, esclerenquima de células grandes com lumem grande; células cactiformes características.

Os elementos da abóbora verde destacam-se mais facilmente pelos tricomas e estomas do epicarpo, e, pela presença muito comum de células porosas, em pequenos blocos, provenientes da camada sub-epidérmica da semente, facilmente triturada quando verde. *Figs. 28 e 29.*

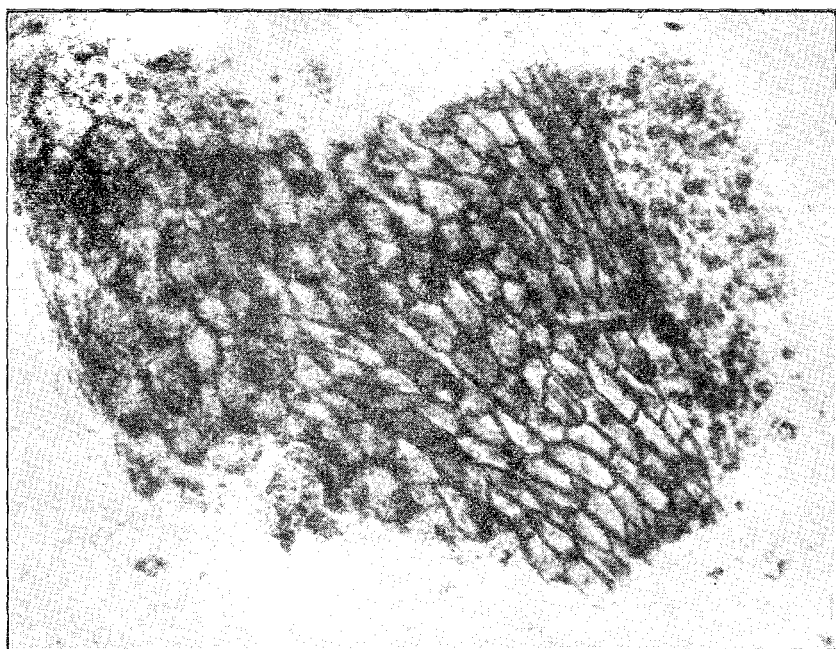


FIG. 29

Semente de abóbora: Grupo de células porosas, observado em concentrado de tomate.

PIMENTÃO (*Capsicum annuum*)

Constatamos a presença deste adulterante em 8% os produtos examinados. Fruto grande, cônico, superfície lustrosa de cor vermelho escuro, com 2 ou 3 cavidades. Sementes numerosas, achatadas, com o embrião aderente ao endosperma. É fácil a identificação do pimentão. A presença das gotículas oleosas avermelhadas que dão a coloração de indigo com o ácido sulfúrico concentrado constitui elemento de valor na diagnose. *Figs. 30, 31 e 32.*

Os grãos de amido são extremamente pequenos. Os fragmentos de tecidos com paredes grossas e tortuosas, que dão ao conjunto um aspecto semelhante ao de pulmão, são típicos. A evidenciação torna-se mais fácil nas preparações feitas com água amoniacal por 24 horas.

Epicarpo de células poligonais, em contos, sulcadas.

Hipoderma com paredes salientes, em contos; mesocarpo com gotas de óleo e cromoplastas vermelho-alaranjados; células gigantes de 2 mm. ou mais; endocarpo com grupos de células de paredes espessas e delgadas.

Epiderme externa do espermoderma com parede interna espessa, porosa, verrucosa e esclerenquimatizada. *Fig. 33.*

BATATA DOCE (*Ipomoea batatas*)

Foi encontrada como adulterante em 3% os produtos controlados. É uma raiz tuberosa convolucácea, cultivada mais frequentemente nas zonas tropicais.

As células da camada cortical apresentam-se dispostas em filas transversais. O amido do parênquima constitui a maior parte do tecido. Os grãos de amido são piriformes, estrangulados, gibosos, não achatados, tendo em um ponto de sua parte superior um hilo circundado por estrias irregularmente concêntricas. As células de amido alongadas longitudinalmente são dispostas em filas radiais.

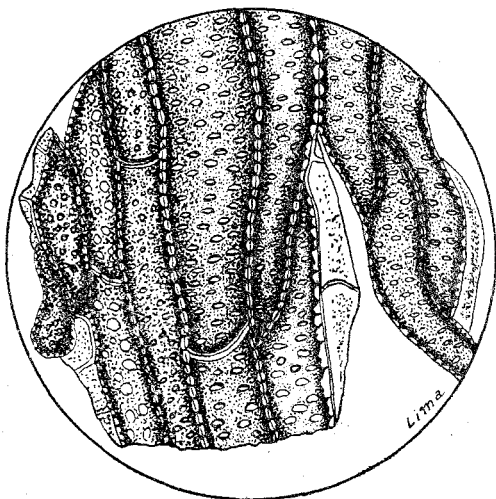


FIG. 34

Batata-doce — Vasos de raiz tuberosa em corte longitudinal. (seg. Winton — modif.).

As células lactíferas se distinguem das células do parênquima pela cor mais escura e pelo conteúdo granular, que se cora em amarelo pelo iodeto de potássio. São células verdadeiras e não tubos lactíferos. As células medulares apresentam alongamento radial. No tecido parenquimatosos são facilmente reconhecidos no interior de suas células cristais de oxalato de cálcio, em forma de agulhas quebradas. Os tubos de seiva são do

tipo pontuado, com pontuações bastante grandes, formando reticulações; apresentam 80 micra de diâmetro, tornando-se maiores no centro da raiz. A natureza destes vasos e a ausência de espirais gran-

des ou células espiral-reticuladas demonstra a natureza de raiz tuberosa e não de tubérculo verdadeiro da batata doce. *Figs. 34 e 35.*

Nas fraudes feitas com batata doce ou com certas variedades de banana: *M.sapientum*, *M.paradisiaca*, cujas células amilíferas são muitas vezes confundíveis, depois de sofrerem a ação do calor; é de grande importância a identificação dos vasos de seiva. Estes, na banana, são espiralóides e espiral reticulados e, geralmente, não se apresentam livres e desembaraçados de células, como na batata doce.

BANANA (*Musa* sp.)

Encontramos este adulterante em 1% os produtos de tomate examinados. Fruta típica das regiões neotrópicas.

Estrutura microscópica: Pericarpo — Células isodiamétricas ou alongadas com paredes espessas e cutícula estriada; estomas principalmente na parte externa do fruto, formando o epicarpo. Hipoderma constituído por células de paredes porosas, contendo rafides (cristais alongados em agulhas).

Mesocarpo — Células amilíferas, arredondadas, entre as quais passam feixes fibrosos e fibras vasculares, acompanhados de células de tanino contendo gotas de oleoresina.

Endocarpo — Células poligonais, radiais de paredes finas muito longas, ricas em amido. Os grânulos de amido são menores no mesocarpo externo e vão aumentando de tamanho na parte interna do mesocarpo. São alongados, piriformes, em forma de salsicha de saco ou de foice. Os anéis com luz polarizada são visíveis nas proximidades do hilo. Pela maturação o amido é transformado em açúcar. Os vasos espiralóides e espirais reticulados se caracterizam pela grande largura até 100 micra e pelas fendas.

Espermoderma — Formada por tecido da semente abortada. Células longitudinalmente alongadas de paredes finas; parênquima de células alongadas com vasos espiralóides; células cruzadas em filas. *Fig. 36.*

XÚXÚ (*Sechium edule*)

Essa curcubitácea é largamente cultivada no Brasil. No pericarpo encontramos 4 camadas: O epicarpo de células poligonais,

com paredes espessadas, numerosos estomatas e filamentos capitados; o hipoderma com células poligonais porosas, com filamentos ramificados em várias direções; mesocarpo delgado com células arredondadas contendo grãos de amido, feixes fibro vasculares, grandes tubos crivados e vasos lactíferos; endocarpo de células pequenas com parede delgada encerrando a semente. O espermoderma apresenta a epiderme e sub-epiderme constituídas de células pequenas de paredes delgadas e o parênquima formado de ampla cadeia de células grandes, contendo grãos de amido. Esses grãos são redondos, ovalados, dispostos em grupos, com hilo distinto, mas aneis e cruz de polarização pouco nítidos. Cotiledones grandes contendo grãos de amido.

BERINGELA (*Solanum melongena*)

Em outras oportunidades tivemos ocasião de assinalar a presença de beringela como adulterante. Fruto liso, de forma oval ou de salsicha, cor purpúrea ou branca, contendo numerosas sementes. O epicarpo é constituído de células irregularmente espessadas, dispostas em segmento com grupos de tricomas. O hipoderma é constituído de pequenas células, contendo o pigmento corante, nas variedades purpúreas. Mesocarpo esponjoso contendo grânulos de clorofila nas células externas e pequenos grânulos de amido próximo aos feixes fibro-vasculares, que possuem tubos de seiva, vasos espiralóides reticularos e pontuados. Espermoderma apresenta a epiderme externa com as paredes laterais porosas esclerosadas, bastante espessas dentro de uma camada de celulose. Endosperma e embrião contendo pequenos grânulos de aleurona.

CENOURA (*Daucus carotta*)

Muito usada em numerosos paizes como adulterante de marmeladas e conservas de doces em geral, da chicórea e do café. Usada em latas de conserva, empregada como componente de conservas de caldo e de conservas mixtas de vegetais.

E' uma raiz curta ou alongada, branca, vermelha ou alaranjada. Na camada cortical são encontradas células transversalmente alongadas, quadriláteras e irregulares, contendo grânulos de amido isolados ou em pequenos agrupamentos. No interior destas células vamos encontrar ainda abundantes cristais alaranjados de caroteno, cujo nome é derivado da própria raiz.

As secções longitudinais dos vasos liberianos apresentam células curvas e arredondadas e células medulares de paredes finas, contendo amido; tubos de crivo com lâminas, estreitas células sócias, fibras substitutas com pontas enervadas, algumas vezes de paredes espessas, fendas diagonais e conteúdo granular, canais de óleo acompanhados por células arredondadas contendo grãos de aleurona. Ao lado dos canais de óleo são encontradas células particularmente redondas ou poligonais. No cambium as várias camadas de células não apresentam amido. Nos vasos lenhósos as paredes do parênquima são delgadas nas células jovens, espessando-se nas células adultas. Só são encontrados vasos reticulados com tendência a espiral e vasos escaleriformes com fendas curtas.

PERA (*Pyrus communis*)

No Brasil as variedades duras são cultivadas em escala mais ou menos grande e empregadas como adulterante.

Estrutura microscópica: Epiderme — Células mães com paredes espessas e células filhas com paredes finas. O hipoderma apresenta células poligonais de paredes espessas com ângulos e nós proeminentes. Células esclerosadas isodiamétricas ou alongadas de paredes espessas, incolores, e canais ramificados ocorrendo em grupos contornado por células alongadas no parênquima, formando rosetas e constituindo grande parte da polpa. *Fig. 37.*

Células de amido. Vasos espiralóides, anulares, reticulares e pontuados. Endocarpo constituído por células alongadas dispostas transversalmente. Além de tricomas unicelulares de paredes finas são encontrados numerosos de paredes espessas. Espermoderma constituído por células alongadas, empalissadas, com lumem estreito ou piriforme. *Fig. 38.*

Esses foram os adulterantes mais comuns encontrados nas conservas de tomate. Outros têm sido assinalados: a farinha de pão, as farinhas de trigo, centeio, cevada, facilmente identificáveis pelo amido específico. A serragem de madeira é de diagnose fácil, devido à presença de pedacinhos de madeira e a verificação pela floroglucina clorídrica que demonstra a coloração vermelha dos complexos celulares, compostos por elementos alongados e cujas pontuações são vistas com clareza.

CAPÍTULO VII

RESULTADOS

Os métodos empregados nessas verificações foram os métodos oficiais do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América do Norte. E' sobre estes métodos que está baseada a legislação americana.

A República Argentina também tomou por base esses métodos para regulamentação oficial.

Em seus trabalhos, Rivas (1937), Soriano e Garassini (1941) se serviram destas técnicas oficiais.

Em nossas verificações, que atingem atualmente a cerca de duzentas, esses processos produziram sempre resultados uniformemente comparáveis.

a) CONTROLE DE COGUMELOS

A lei americana de 25 de Julho de 1934 estabeleceu como limite de tolerância máxima a presença de 50% de campos positivos com filamentos micelianos. O decreto do Governo Argentino n.º 79.832, de 18 de Dezembro de 1940, estabeleceu, a partir do ano de 1941, a tolerância máxima de 50% de campos positivos com filamentos micelianos, para os produtos de tomate destinados à exportação e, de 60% aos destinados ao consumo interno.

Assim, tomando como termo de comparação a taxa de 50% de campos positivos com filamentos micelianos, verificados pela câmara de Howard, constatamos entre as amostras submetidas a exame:

- 79% com mais de 50% de campos positivos;
- 4% com 50% de campos positivos;
- 17% com menos de 50% de campos positivos.

Os concentrados adulterados apresentaram as seguintes porcentagens:

- com mais de 50% de campos positivos (46 amostras) = 82,1%
- com 50% de campos positivos (3 amostras) = 5,3%
- com menos de 50% de campos positivos (7 amostras) = 12,5%

Os concentrados adulterados apresentaram as seguintes porcentagens:

com mais de 50% de campos positivos (33 amostras) = 75,0%
 com 50% de campos positivos (1 amostra) = 2,2%
 com menos de 50% de campos positivos (10 amostras) = 22,7%

O estudo destes concentrados relativamente aos vários adulterantes nos forneceu interessantes dados. Assim, nos concentrados cujo adulterante era a abóbora:

com mais de 50% de campos positivos (28 amostras) = 96,5%
 com menos de 50% de campos positivos (1 amostra) = 3,5%

naqueles cujo adulterante era a batata doce:

com mais de 50% de campos positivos (3 amostras) = 100,0%

naqueles cujo adulterante era a banana:

com mais de 50% de campos positivos (1 amostra) = 100,0%

naqueles que apresentaram mais de 1 adulterante:

com mais de 50% de campos positivos (3 amostras) = 100,0%

O fato curioso foi relativamente aos concentrados adulterados com pimentão que apresentaram as seguintes porcentagens.

com mais de 50% de campos positivos %
 com 50% de campos positivos %
 com menos de 50% de campos positivos (8 amostras) = 100%

Em relação à embalagem constatamos nos concentrados enlatados o seguinte:

com mais de 50% de campos positivos (31 amostras) = 77,5%
 com 50% de campos positivos (7 amostras) = 17,5%
 com menos de 50% de campos positivos (2 amostras) = 5,0%

nos concentrados empacotados:

com mais de 50% de campos positivos (48 amostras) = 80,0%
 com 50% de campos positivos (10 amostras) = 16,6%
 com menos de 50% de campos positivos (2 amostras) = 3,3%

Em relação à forma de concentrado verificamos nas *massas adulteradas*:

com mais de 50% de campos positivos (32 amostras) = 76,1%
 com 50% de campos positivos (1 amostra) = 2,3%
 com menos de 50% de campos positivos (9 amostras) = 21,4%

PORCENTAGEM DE CAMPOS POSITIVOS	MASSA			EXTRATO			ENLATADOS			EMPACOTADOS			PUROS		
	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total
<u>10 a 19 %</u>	14%	1	1.8%							14%	1	1.6%	14.0%	1	1.7%
<u>20 a 29 %</u>	22%	1	1.8%							22%	1	1.7%	—	—	—
<u>30 a 39 %</u>	35%	2	3.6%	34%	2	4.5%	34.0%	2	5%	35%	2	3.3%	38%	1	1.7%
<u>40 a 49 %</u>	45.66%	6	11.1%	44.8%	5	11.1%	44.8%	5	12.5%	45.6%	6	10%	44.8%	5	9%
<u>50 a 59 %</u>	53%	4	7.9%	53.5%	8	17.7%	52.6%	6	15%	54%	6	10%	53.1%	9	16%
<u>60 a 69 %</u>	64.5%	12	21.9%	64.2%	8	17.7%	64.2%	8	20%	64.5%	12	20%	64.5%	12	21.4%
<u>70 a 79 %</u>	75.25%	16	29.2%	73.6%	15	33.3%	73.5%	13	32.5%	75.1%	18	30%	73.8%	18	32.3%
<u>80 a 89 %</u>	82.88%	9	16.3%	82.2%	6	13.4%	82%	5	12.5%	83%	10	16.7%	83.7%	8	14.4%
<u>90 a 99 %</u>	92.5%	4	7.2%	98%	1	2.3%	98%	1	2.5%	92.5%	4	6.7%	94%	2	3.5%

M E L O S

ADULTERADOS			ADULTERADOS com ABOBORA			ADULTERADOS com PIMENTÃO			ADULTERADOS com BATATA DOCE			ADULTERADOS com BANANA			MISTAS com mais de um adulterante		
Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem total
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22%	1	26%	—	—	—	22%	1	12.5%	—	—	—	—	—	—	—	—	—
33.3%	3	6.7%	30%	1	3.4%	35%	2	25%	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45.8%	6	13.5%	—	—	—	46.4%	5	62.5%	—	—	1	—	—	—	44%	1	33.34%
52.4%	3	6.7%	58%	1	3.4%	—	—	—	54%	1	33.3%	—	—	—	50%	1	33.33%
65.6%	8	18.7%	64.2%	8	27.7%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
75.2%	13	29.4%	75.4%	11	37.9%	—	—	—	—	—	—	72%	1	100%	76%	1	33.33%
82%	7	15.7%	82.3%	6	20.8%	—	—	—	82%	1	33.3%	—	—	—	—	—	—
93.3%	3	6.7%	92%	2	6.8%	—	—	—	96%	1	33.4%	—	—	—	—	—	—

As massas puras:

com mais de 50% de campos positivos	(11 amostras)	= 84,6%
com 50% de campos positivos	(1 amostra)	= 7,69%
com menos de 50% de campos positivos	(1 amostra)	= 7,69%

Os extratos adulterados:

com mais de 50% de campos positivos	(1 amostras)	= 50%
com menos de 50% de campos positivos	(1 amostra)	= 50%

Os extratos puros:

com mais de 50% de campos positivos	(35 amostras)	= 81,3%
com 50% de campos positivos	(2 amostras)	= 4,65%
com menos de 50% de campos positivos	(6 amostras)	= 13,95%

O quadro da pagina 140-A indica a situação dos produtos de tomate, em relação ao teor em filamentos micelianos, verificado pela técnica de Howard.

Assim, em resumo, foram constatadas nas contagens de *coque-melas* as porcentagens seguintes:

Entre 10 e 19 campos positivos	1%
" 20 e 29 " "	1%
" 30 e 39 " "	4%
" 40 e 49 " "	11%
" 50 e 59 " "	12%
" 60 e 69 " "	20%
" 70 e 79 " "	31%
" 80 e 89 " "	15%
" 90 e 99 " "	5%

Como porcentagem de maior frequência verificamos a proporção entre 70 e 79 campos positivos. Dentro deste limites constatamos que:

Com 70% de campos positivos foram encontradas	5 amostras ou	6,2%
" 72% " " " " " "	7 " "	22,6%
" 74% " " " " " "	2 " "	6,4%
" 76% " " " " " "	10 " "	32,2%
" 78% " " " " " "	7 " "	22,6%

Do exposto se conclue que 31% das amostras analisadas apresentam de 70 a 79% de campos positivos com filamentos micelianos e que, entre estes 32,2%, têm 76% de campos positivos com filamentos micelianos.

b) CONTROLE DE BACTÉRIAS

A regulamentação oficial já citada no início, admite como tolerância máxima para bactérias a cifra de: *100 milhões de bactérias por cc.*

Tomando este índice por base constatamos nas 100 amostras examinadas:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (92 amostras) = 92%
 com menos de 100 milhões de bactérias por cc. (8 amostras) = 8%

nos *concentrados puros*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (48 amostras) = 85,7%
 com menos de 100 milhões de bactérias por cc. (8 amostras) = 14,2%

nos *concentrados adulterados*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (44 amostras) = 100%

nos *concentrados cujo adulterante era a abóbora*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (29 amostras) = 100%

nos *concentrados cujo adulterante era a batata doce*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (3 amostras) = 100%

nos *concentrados cujo adulterante era a banana*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (1 amostra) = 100%

nos *concentrados cujo adulterante era o pimentão*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (8 amostras) = 100%

nos *concentrados mistos com mais de 1 adulterante*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (3 amostras) = 100%

nas *massas puras*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (13 amostras) = 92,8%
 com menos de 100 milhões de bactérias por cc. (1 amostra) = 7,1%

nas *massas adulteradas*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (41 amostras) = 100%

nos *extratos adulterados*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (2 amostras) = 100%

nos *extratos puros*:

com mais de 100 milhões de bactérias por cc. (36 amostras) = 83,7%
 com menos de 100 milhões de bactérias por cc. (7 amostras) = 16,2%

O quadro da pagina 148 organizado segundo a técnica de Howard, mostra a situação dos produtos de tomate em relação ao conteúdo bacteriano.

B A C T

BACTÉRIAS POR C. C.	MASSAS			EXTRATOS			ENLATADAS			EMPACOTADAS			PUROS		
	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem
0 a 50.000.000	—	—	—	41.850.000	2	4.4%	41.850.000	2	5%	—	—	—	41.850.000	2	3.57%
50.000.001 a 100.000.000	64.800.000	1	1.8%	67.604.000	5	11.2%	67.604.000	5	12.5%	64.800.000	1	1.67%	67.136.600	6	10.7%
100.000.001 a 200.000.000	163.937.142	7	13.6%	148.848.800	18	40%	147.648.750	16	40%	162.706.600	9	15%	149.414.700	19	33.9%
200.000.001 a 300.000.000	245.600.000	9	16.2%	249.360.000	6	13.4%	256.320.000	3	7.5%	250.560.000	13	21.67%	256.000.000	9	16.07%
300.000.001 a 400.000.000	350.114.500	11	19.3%	344.880.000	5	11.2%	344.880.000	5	12.5%	353.158.000	10	16.66%	345.085.700	7	12.5%
400.000.001 a 500.000.000	447.360.000	9	1.6%	434.400.000	3	6.6%	434.400.000	3	7.5%	447.360.000	9	15%	429.760.000	4	7.1%
500.000.001 a 600.000.000	528.000.000	3	5.5%	547.700.000	4	8.8%	547.700.000	4	10%	528.000.000	3	5%	540.333.300	6	10.2%
600.000.001 a 700.000.000	616.120.000	4	7.4%	—	—	—	—	—	616.120.000	4	6.67%	—	—	—	—
700.000.001 a 800.000.000	784.800.000	1	1.8%	—	—	—	—	—	184.800.000	1	1.67%	—	—	—	—
800.000.001 a 900.000.000	856.800.000	1	1.8%	828.900.000	1	2.2%	828.900.000	1	2.5%	856.800.000	1	1.66%	828.900.000	1	1.78%
900.000.001 a 1.000.000.000	912.600.000	2	3.9%	—	—	—	—	—	912.600.000	2	3.34%	—	—	—	—
1.000.000.001 a 5.000.000.000	1.225.200.000	6	10.9%	1.200.000.000	1	2.2%	1.200.000.000	1	2.5%	1.225.000.000	6	10%	1.302.000.000	2	3.53%
5.000.000.001 a 10.000.000.000	8.856.000.000	1	1.8%	—	—	—	—	—	8.856.000.000	1	1.66%	—	—	—	—

R I A S

ADULTERADOS			ADULTERADOS com ABOBORA			ADULTERADOS com PIMENTÃO			ADULTERADOS com BATATA DOCE			ADULTERADOS com BANANA			MISTAS		
N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
18.300	6 13.6%	160.246.600	3 10.3%	152.190.000	2 25%	195.840.000	1 33.3%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
34.280	7 15.9%	234.720.000	2 6.8%	240.480.000	3 37.5%	—	—	—	—	—	—	—	—	265.680.000	2 66.7%	—	
7.500	8 18.1%	323.003.300	6 20.6%	351.150.000	2 25%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
0.000	8 18.1%	445.400.000	7 24.3%	489.600.000	1 12.5%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
0.000	1 2.2%	532.800.000	1 3.4%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
0.000	4 9.7%	616.120.000	4 13.7%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
0.000	1 2.2%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	784.800.000	1 100%	—	—	—	—	
0.000	1 2.2%	—	—	—	—	—	—	856.800.000	1 33.4%	—	—	—	—	—	—	—	
0.000	2 4.5%	918.000.000	1 3.5%	—	—	—	—	907.200.000	1 33.3%	—	—	—	—	—	—	—	
0.000	5 11.3%	1.189.440.000	5 17.4%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
000	1 2.2%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.856.000.000	1 33.3%	—	

Assim, em resumo, foram constatadas na contagem das *leveduras* e *espóros* as porcentagens seguintes:

De	200 a	300 leveduras e espóros por 1/60 mm ³	—	5%
"	300 a	400	" " " " "	3%
"	400 a	500	" " " " "	8%
"	500 a	600	" " " " "	6%
"	600 a	700	" " " " "	2%
"	700 a	800	" " " " "	3%
"	800 a	900	" " " " "	3%
"	900 a	1.000	" " " " "	4%
"	1.000 a	2.000	" " " " "	24%
"	2.000 a	3.000	" " " " "	14%
"	3.000 a	4.000	" " " " "	8%
"	4.000 a	5.000	" " " " "	3%
"	5.000 a	10.000	" " " " "	10%
"	10.000 a	20.000	" " " " "	5%
"	20.000 a	30.000	" " " " "	1%
"	30.000 a	40.000	" " " " "	1%

A porcentagem de maior frequência está entre 1.000 e 2.000 leveduras e espóros por 1/60 mm.³:

- De 1.000 a 1.099 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 5 amostras = 20,83%
- De 1.100 a 1.199 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 5 amostras = 20,83%
- De 1.200 a 1.299 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 1 amostra = 4,16%
- De 1.300 a 1.399 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 3 amostras = 12,5%.
- De 1.400 a 1.499 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 2 amostras = 8,3%
- De 1.500 a 1.599 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 3 amostras = 12,5%
- De 1.600 a 1.699 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 1 amostra = 4,16%
- De 1.700 a 1.799 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 2 amostras = 8,3%
- De 1.800 a 1.899 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 2 amostras = 8,3%
- De 1.900 a 1.999 de leveduras e espóros p/ 1/60 mm³ foram encontrados 0 amostras = 0 %

L E V E D U R A S

LEVEDURAS E ESPÓ- ROS POR 1/60 mm ³	MASSA			EXTRATO			ENLATADOS			EMPACOTADOS			PUROS		
	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagens	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagens	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem
200 a 300	—	—	—	249	5	11.1%	249	5	12.5%	—	—	—	249	5	8.9%
301 a 400	—	—	—	338	3	6.7%	338	3	7.5%	—	—	—	338	3	5.23%
401 a 500	—	—	—	442	8	17.7%	441	6	15%	447	2	3.33%	442	8	14.5%
501 a 600	522	1	1.81%	560	5	11.1%	538	3	7.5%	533	3	5%	558	5	8.9%
601 a 700	—	—	—	669	2	4.5%	669	2	5%	—	—	—	669	1	1.8%
701 a 800	738	1	1.81%	735	2	4.5%	735	2	5%	738	1	1.67%	735	2	3.64%
801 a 900	853	2	3.9%	840	1	2.2%	840	1	2.5%	853	2	3.33%	849	3	5.23%
901 a 1.000	939	2	3.9%	972	2	4.5%	972	2	5%	939	2	3.33%	955	4	7.1%
1.001 a 2.000	1.546	11	20%	1.282	13	28.8%	1.552	12	30%	1.427	12	20%	1.309	16	28.7%
2.001 a 3.000	2.510	11	20%	2.780	3	6.7%	2.780	3	7.5%	2.461	11	18.33%	2.552	6	10.7%
3.001 a 4.000	3.549	7	12.17%	3.336	1	2.2%	3.336	1	2.5%	3.467	7	11.7%	3.336	1	1.8%
4.001 a 5.000	4.524	3	5.5%	—	—	—	—	—	—	4.524	3	5%	4.680	1	1.8%
5.001 a 10.000	6.945	10	18.1%	—	—	—	—	—	—	6.946	10	16.66%	7.080	1	1.8%
10.001 a 20.000	12.321	5	9.19%	—	—	—	—	—	—	12.321	5	8.33%	—	—	—
20.001 a 30.000	24.900	1	1.81%	—	—	—	—	—	—	24.900	1	1.66%	—	—	—
30.001 a 40.000	30.600	1	1.81%	—	—	—	—	—	—	30.600	1	1.66%	—	—	—

E S P Ó R O S

ADULTERADOS		ADULTERADOS com ABOBORA			ADULTERADOS com PIMENTÃO			ADULTERADOS com BATATA DOCE			ADULTERADOS com BANANA			MISTOS		
N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem	Média das contagens	N.º de amostras	Porcentagem
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	1	2.2%	—	—	522	1	12.5%	—	—	—	—	—	—	—	—	—
69	1	2.2%	669	1	3.4%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
88	1	2.2%	—	—	738	1	12.5%	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
55	8	18.4%	1.455	4	13.7%	1.497	2	25%	—	—	—	—	—	1.452	2	66.66%
3	8	18.4%	2.768	3	10.3%	2.571	2	25%	2.550	2	66.66%	2.160	1	100%	—	—
49	7	15.9%	3.459	7	24.2%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	2	4.5%	—	—	4.446	2	25%	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	9	20.5%	6.930	9	31%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	5	11.3%	12.324	5	17.4%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	1	2.2%	—	—	—	—	—	24.900	1	33.34%	—	—	—	—	—	—
10	1	2.2%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30.600	1	33.34%

Do exposto se conclue que a maior porcentagem das amostras analisadas (24%) apresenta entre 1.000 a 2.000 leveduras e esporos por 1/60 mm.³, e que, entre estas, 41,66% dos concentrados de tomate têm entre 1.000 e 1.200 leveduras e esporos por 1/60 mm.³.

CAPÍTULO VIII

DISCUSSÃO

Os produtos de tomate examinados no decorrer destas pesquisas procediam de numerosos Estados do Brasil e de 20 fabricantes diferentes.

Foram examinadas 100 amostras de produtos de tomate: 55% massas e 45% extratos. Quanto ao acondicionamento, 40% vieram enlatadas e 60% empacotadas.

Não seria razoavel restringir os exames a determinado tipo de produto ou de embalagem. Foram tomadas como norma diretriz tanto quanto possivel as condições atuais do mercado brasileiro.

Se os produtos estão sendo vendidos fracionadamente, por peso, não seria lógico limitar as investigações aos produtos enlatados, razão pela qual foram examinados indiferentemente, tanto os produtos enlatados, como empacotados e tanto os extratos como as massas. Os dados obtidos são assim mais aproximados da realidade.

Adotando idêntico critério, não restringimos as nossas investigações aos produtos puros. Seria um critério unilateral, de vez que, cerca da metade das amostras examinadas, isto é, 44%, demonstrou a presença de um ou de mais de um adulterante, havendo sido constatado que só 25% das massas de tomate submetidas a exame estavam puras.

A abóbora foi dos adulterantes o mais encontrado. A sua presença foi revelada em 29% dos casos, o pimentão em 8%, a batata doce em 3% e a banana em 1%. Em 3% das amostras foi constatada a existência de 2 e de mais de 2 adulterantes concomitantemente.

Em relação à contagem de cogumelos, verifica-se que 79% das amostras submetidas a exame apresentaram mais de 50% de campos microscópicos positivos, com um mínimo de 14% e um máximo de 98% de campos positivos.

Os processos de elaboração são ainda deficiente entre nós, pois tanto os produtos enlatados como os empacotados evidenciaram *números índices* sensivelmente iguais, indicativos de que o enlatamento desses produtos está se processando em condições menos satisfatórias.

Qualquer legislação a respeito deverá ser baseada tanto quanto possível nas condições atuais. Assim não poderá ser feita distinção entre massas e extratos com relação ao teor em filamentos micelianos. Isto é facilmente verificado no quadro abaixo:

QUADRO COMPARATIVO

PORCENTAGEM DE CAMPOS POSITIVOS	MASSAS	EXTRATOS
10 a 19%	1,8%	0
20 a 29%	1,8%	0
30 a 39%	3,6%	4,5%
40 a 49%	11,1%	11,1%
50 a 59%	7,9%	17,7%
60 a 69%	21,9%	17,7%
70 a 79%	29,2%	33,3%
80 a 89%	16,3%	13,4%
90 a 99%	7,2%	2,3%

Não se constata aqui diferença substancial entre massas e extratos com relação ao conteúdo de cogumelos:

18,3% das massas apresentavam menos de 50% ;

81,6% " " " mais de 50% de campos microscópicos positivos; ao passo que:

15,6% dos extratos demonstravam menos de 50% e

84,4% " " " mais de 50% de campos microscópicos positivos.

Quanto ao conteúdo de bactérias, a situação dos extratos é melhor do que a das massas:

BACTÉRIAS POR C.C.	MASSAS	EXTRATOS
0 a		
50 milhões	0%	4,4%
50.000.001 a		
100 milhões	1,8%	11,2%
100.000.001 a		
200 milhões	13,6%	40,0%
200.000.001 a		
300 milhões	16,2%	13,4%
300.000.001 a		
400 milhões	19,3%	11,2%
400.000.001 a		
500 milhões	16,6%	6,6%
500.000.001 a		
600 milhões	5,5%	8,8%
600.000.001 a		
700 milhões	7,4%	0
700.000.001 a		
800 milhões	1,8%	0
800.000.001 a		
900 milhões	1,8%	2,2%
900.000.001 a		
1 bilhão	3,9%	0
1.000.000.001 a		
5 bilhões	10,9%	2,2%
5.000.000.001 a		
10 bilhões	1,8%	0

Assim, enquanto mais da metade dos extratos, isto é, 55,6%, tem menos de 200.000.000 de bactérias por cc., somente 15,4% das massas demonstrou taxas inferiores a 200 milhões de bactérias por cc.. O conteúdo bacterico dos extratos é assim bem menor.

Em relação às leveduras e esporos as porcentagens foram excepcionalmente elevadas; 41,66% dos produtos examinados têm entre 1.000 e 1.200 leveduras e esporos por 1/60 mm.³. Os resultados alcançados na verificação do conteúdo de leveduras e esporos tendem a indicar que no Brasil a matéria prima utilizada na manufatura de produtos de tomate fica exposta a demoras grandes antes de ser industrializada. Durante esse período a má conservação determina fermentações, com o conseqüente aumento da flora microbiana.

Esse aumento de microorganismos pode, também, ser posterior à fabricação. Isto ocorre nos casos de má conservação do produto já elaborado.

Crues (1938), referindo-se à influência da conservação, assim se expressa: "In former years it was customary to store tomato pulp (to used for catsup, etc.) in wooden barrels with distilled vinegar or sodium benzoate as a preservative. Almost invariably such pulp has shown on microscopical examination after several months' storage very high counts of bacteria and often high mold counts". Após a regulamentação oficial dos produtos de tomate, nos Estados Unidos, as constantes condenações e inutilizações de grandes partidas concorreram para que os industriais abandonassem o emprego das barricas de madeira e adotassem o uso de latas hermeticamente cerradas e tinalizadas antes do armazenamento da polpa.

O método de controle de Howard oferece ampla margem de garantia aos industriais que trabalham em condições adequadas. Segundo Crues, os limites de tolerância máximos admitidos presentemente pela lei americana, poderiam ser reduzidos à metade, nos Estados Unidos, sem sacrificio do industrial.

Para serem alcançados tais objetivos deverão, naturalmente, ser tomadas todas as precauções, separando os tomates em más condições e mantendo a mais rigorosa higiene durante os processos de elaboração e de armazenamento.

Os produtos fabricados com tomates sãos, bem levados e corretamente industrializados devem apresentar baixo teor microbiano. As contagens altas indicam invariavelmente o emprego de tomates

alterados e de processos inadequados na industrialização do produto. A lavagem cuidadosa dos tomates permite retirar grande quantidade dos cogumelos aderentes à casca, reduzindo o teor microbiano, pois a flora de contaminação é de caráter eminentemente aeróbio.

Tanto a extração como a concentração da polpa devem ser processadas o mais rapidamente possível, devendo o concentrado ser conservado de preferência em vasilhame hermeticamente cerrado depois de sofrer tinalização previa.

O processo de Howard nos paizes em que foi oficialmente adotado, trouxe grande melhoramento ao estudo sanitário dos produtos de tomate, daí a conveniência da sua introdução no Brasil.

Ozório de Almeida e colaboradores (1941), estudando a ação do suco de "*Solanum lycopersicum*" sobre a germinação de sementes e crescimento de plantas, levantou a hipótese de que a ação das substâncias inibidoras no fruto destina-se a impedir a proliferação de germes e parasitas que possam atacar as sementes.

Agradecemos ao Sr. J. Menezes Junior varios dos excelentes desenhos que ilustram este trabalho e sua valiosa cooperação. Somos gratos a todos os ensinamentos e a valiosa orientação dos Drs. S. e A. Soriano de Buenos Aires; a assistência do Dr. J. B. Howard, de Washington; a decidida colaboração do Dr. Bruno Rangel Pestana, Chefe da Sub-divisão de Bromatologia e Química do Instituto; pelo interesse do Dr. Nicolino Morena, Chefe do Serviço de Policiamento da Alimentação Pública, e do Dr. Ernani Max, mandando nos fornecer o maior número possível de amostras para esses contrôles; assim como ao Sr. Clovis Napoleão pela eficiente colaboração.

CAPÍTULO IX

CONCLUSÕES

- 1º) Utilizando a técnica de Howard para contrôles de cogumelos, bactérias, leveduras e esporos em produtos de tomate, procurou-se verificar o estado sanitário desses produtos. Foram minuciosamente examinadas 100 amostras de produtos derivados de tomate, oriundas de vários Estados do Brasil e pertencentes a 20 fabricantes diversos.

- 2º) Em relação ao controle de cogumelos, verificou-se que 83% das amostras examinadas apresentaram mais de 50% de campos microscópicos positivos. A maior proporção achada foi de amostras com 76% de campos microscópicos positivos. As taxas oscilaram entre um mínimo de 14% e um máximo de 98% de campos microscópicos positivos.
- 3º) Em relação ao controle de bactérias por cc., verificou-se que a maior porcentagem foi apresentada pelos produtos contendo entre 100 e 200 milhões de bactérias por cc.
- 4º) Em relação ao controle de leveduras e esporos por 1/60 mm.³, verificou-se que as amostras examinadas apresentaram na sua totalidade mais de 125 leveduras e esporos por 1/60 mm.³. A maior porcentagem, ou sejam 41,66%, dos produtos examinados apresentou entre 1.000 e 1.200 leveduras e esporos por 1/60 mm.³.
- 5º) Em relação aos adulterantes: 44% dos produtos examinados demonstraram a presença de um ou de mais de um adulterante.
- 6º) Os adulterantes mais frequentes foram: a abóbora em 29% dos casos; o pimentão em 8%; a batata doce em 3% e a banana em 1%. Em 3% das amostras examinadas foi evidenciada a presença de mais de um adulterante.
- 7º) Três quartas partes das massas de tomate examinadas, ou sejam 75%, estavam adulteradas com um ou mais com de um adulterante.

SCHLUSSFOLGERUNG:

Die Schwämme, Bakterien, Hefen und Sporen in Produkten von Tomaten kontrollierend, wurde die Technik von Howard benützt, um ihren Gesundheitsstandpunkt festzustellen.

- 1.º) Es wurden bis ins kleinste gehend 100 Muster von verschiedenen Tomaten-Produkten untersucht, von verschiedenen Staaten Brasiliens herkommend, und von 20 verschiedenen Fabrikationen.
- 2.º) Im Bezug auf die Kontrolle der Schwämme, wurde festgestellt, dass von den 83% der untersuchten Muster,

- mehr als 50% positive mikroskopische Felder aufwiesen. Das grösste Verhältnis, das gefunden wurde, war von Mustern mit 76% positiven mikroskopischen Feldern. Die Grenzen schwankten zwischen einem Minimum von 14% und einem Maximum von 98% positiven mikroskopischen Feldern.
- 3.º) Im Bezug auf die Kontrolle der Bakterien pro cc., wurde festgestellt, dass der grösste Prozentsatz bei Produkten von 100-200 Millionen Bakterien pro cc. aufgefunden wurde.
 - 4.º) Im Bezug auf die Kontrollen der Hefen und Sporen pro 1/60 mm³, wurde festgestellt, dass die untersuchten Muster insgesamt mehr als 125 Hefen und Sporen pro 1/60 mm³ aufwiesen. Der grösste Prozentsatz, oder 41,66% der untersuchten Produkte, wies 1.000 bis 1.200 Hefen und Sporen pro 1/60 auf.
 - 5.º) Im Bezug auf verfälschte Muster: 44% der untersuchten Produkte wiesen eine oder mehr Verfälschungen auf.
 - 6.º) Die häufigsten Verfälschungen waren: der Kürbis in 29% der Fälle; der grosse Pfeffer in 8%; die süsse Kartoffel in 3% und die Banane in 1%. In 3% dre untersuchten Muster wurden mehr als eine Fälschung vorgefunden.
 - 7.º) Drei viertel der untersuchten Tomaten massen, oder 75%, waren mit einer oder mehreren Fälschungen verfälscht.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, A. Ozório; M. D. Goulart; M. Yelpe & A. V. Pinto — 1941, *Rev. Bras. Biol.*, 1:345.
- ALMEIDA, F. P.; C. S. Lacaz & O. Barros — 1941, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1:396.
- BERTARELLI, E. & M. Marchelli — 1920, *An. di Hig.*, 30:309.
- BESSEY, E. A. — 1935, *A text book of Mycology* — P. Blakiston's Son & Co., Edit. Philadelphia.
- BUCHANAN, E. D. & R. F. Buchanan — 1930, *Bacteriology* — MacMillan Co. — Edit. Londres.
- BULLER SOUTO, A. — 1941, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1:181.
- CRUES, W. W. — 1938, *Commercial Fruit and Vegetables products* — Sec. Ed. — Mac Grow Co. — Edit. — New York.
- 1936, *Exportación de tomate* — *Bol. Frutas y Hortalizas del Ministerio de Agricultura*, 1:1.
- 1934, Decreto n.º 51.266 de 7 de Novembro de 1934 — Leys, Decretos y Resoluciones — Ministerio de Hacienda — *D. G. O. Químicas Nacionales*, 2:18.

- 1934, Decreto n.º 70.150 de 2 Novembro de 1936, *idem*, pg. 79.
- 1940, Decreto n.º 79.832 de 18 de Novembro de 1940.
- 1939, Federal Food, Drug, and Comestic Act. General regulations for its enforcement — U. S. Government Printing Office, Edit.
- FONSECA, O. — 1937, Notas de um Curso de Mycologia do Instituto Oswaldo Cruz.
- GODOY, E. F. — 1939, *Bol. de frutas y hortalizas del Minist. de Agricultura de la Nación*, 4:1.
- HAGER, H. & C. Mez — 1922, *El Microscopio y sus aplicaciones* — Gustavo Gili Edit. Barcelona.
- 1937, Indústria do Suco de tomates — *Notas Agrícolas da Secretaria da Agricultura do Estado de S. Paulo*, 3:28.
- HOWARD, J. B., 1935, Determination of insects parts in tomato products. Food and Drug Administration. Department of Agriculture — Edit. Washington.
- HOWARD, J. B. — 1939, Outlines for instruction in tomato microscopical methods. Food and Drug Administration. Department of Agriculture — Edit. Washington.
- LEPRINCE, M. & R. Lecoy — 1930, *Guide pratique d'analyses alimentaires et d'expertises chimiques usuelles*. Vigot Frères, Edit. Paris.
- LORENA, B. — 1937, A cultura do tomateiro — Direto. Publicidade Agrícola da Secretaria da Agricultura do Estado de S. Paulo — Edit. S. Paulo.
- 1940, Microanalyses of tomato pulp, puree, sauce paste. Official and Tentative methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 5.^a ed., Assoc. of Official Chemists Edit., Washington.
- MORRIS, T. N. — 1933, *Principles of fruit preservation*. Chapman & Hall Edit., Londres.
- RIBEIRO, R. F. & A. GOMES — 1941, *Rev. do Instituto Adolfo Lutz*, 2:476.
- RIVAS, J. G. — 1937, *Bol. de frutas y hortalizas del Minist. de Agric. de la Nación*, 2:1.
- SCHNEIDER, A. — 1920, *The Microanalyses and Microbiology of Foods*. P. Blakiston's Sons & Co. Edit., Philadelphia.
- SMITH, F. R. — 1940, A method for determination of mold in tomato soup, canned spaghetti, pork and beans and similar products containing tomato sauce. Food and Drug Administration. Depart. of Agriculture Edit. Washington.
- SORIANO, A. & L. Garassini — 1941, Analisis microscopico industrial de las conservas de tomates por la determinación de filamentos de hongos y fragmentos de insectos. Trabalho apresentado à "1a. Reunión Argentina de Agronomía" 2 a 6 de Abril de 1941, Buenos Aires.
- TANNER, F. W. — 1919, *Bacteriology and Mycology of Foods*. John Wiley & Sons, Edit. New York.
- WINTON, A. L. & K. B. Winton — 1933, *The structure and composition of Foods*. John Wiley & Sons, Edit., New York.



FIG. 10
Massa de filamentos micelianos
(lugol) 360 x

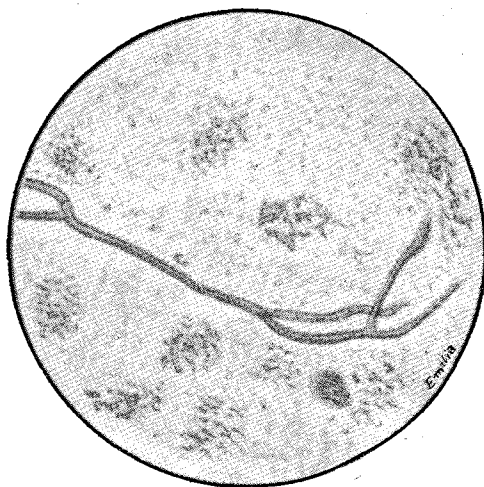


FIG. 11
Filamento miceliano (azul de algodão). 360 x.

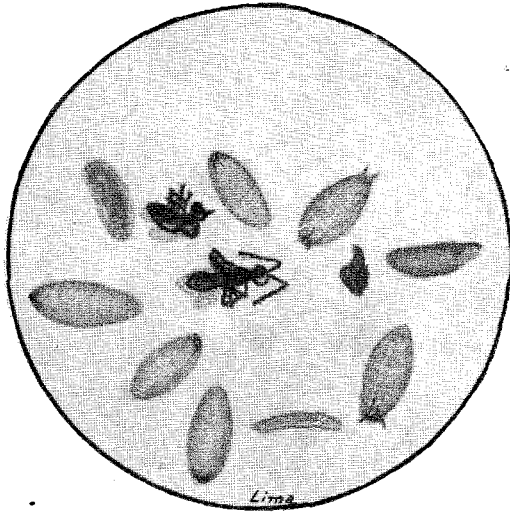


FIG. 18
Larvas e insetos.

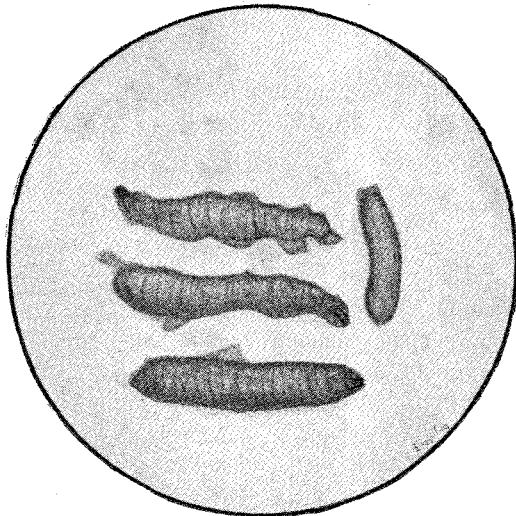


FIG. 19
Larvas e insetos.

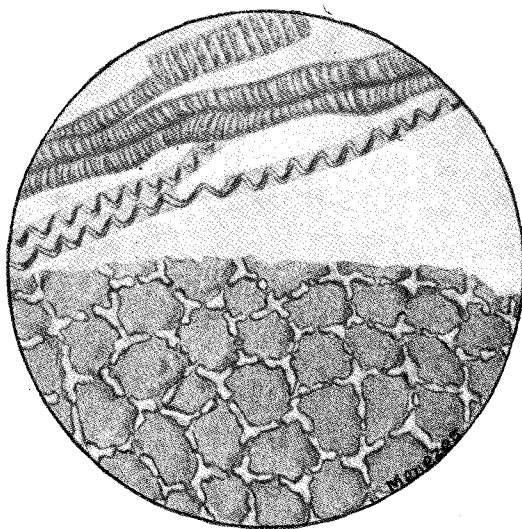


FIG. 21

Tomate cru — Dutos espiralóides e elementos da casca (epicarpo). (360 x).

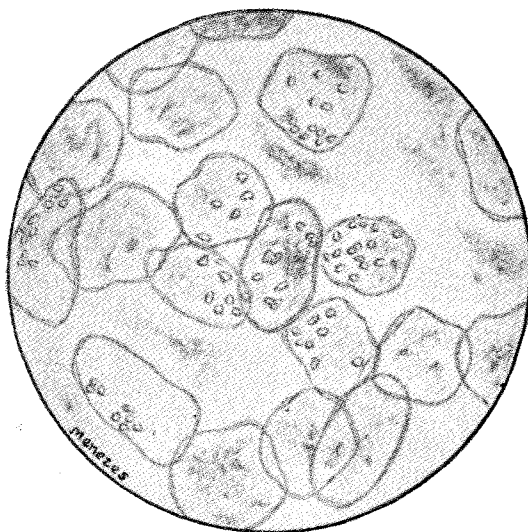


FIG. 22

Tomate cru — Células com e sem amido. (80 x).

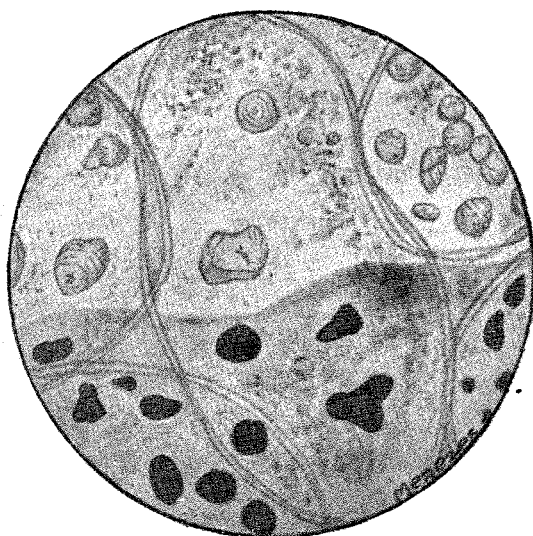


FIG. 23

Tomate cru — Células amilíferas com e sem reação de lugól. (360 x).

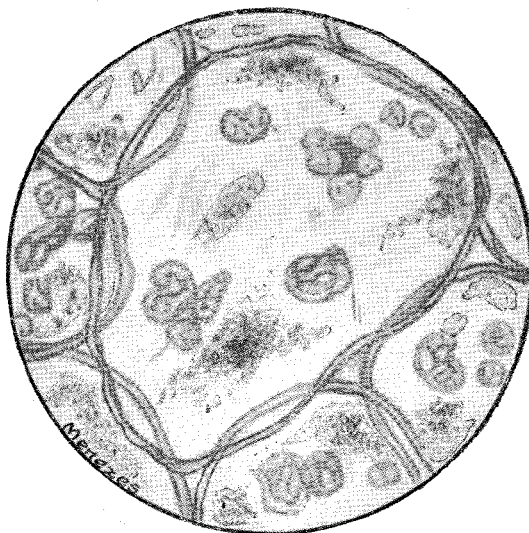


FIG. 24

Elementos do tomate (Extrato). Amido alterado pela ação do calor. (360 x).

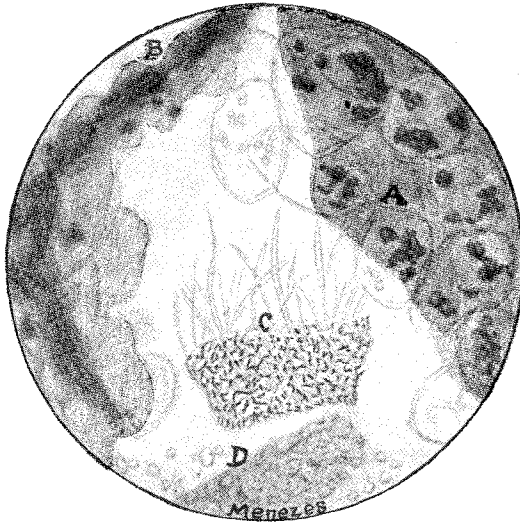


FIG. 25

Tomate cozido — (A) células amilíferas com e sem lugol; (B) dutos; (C) episperma; (D) Endosperma (aleurona e gotas de gordura). (80 x).

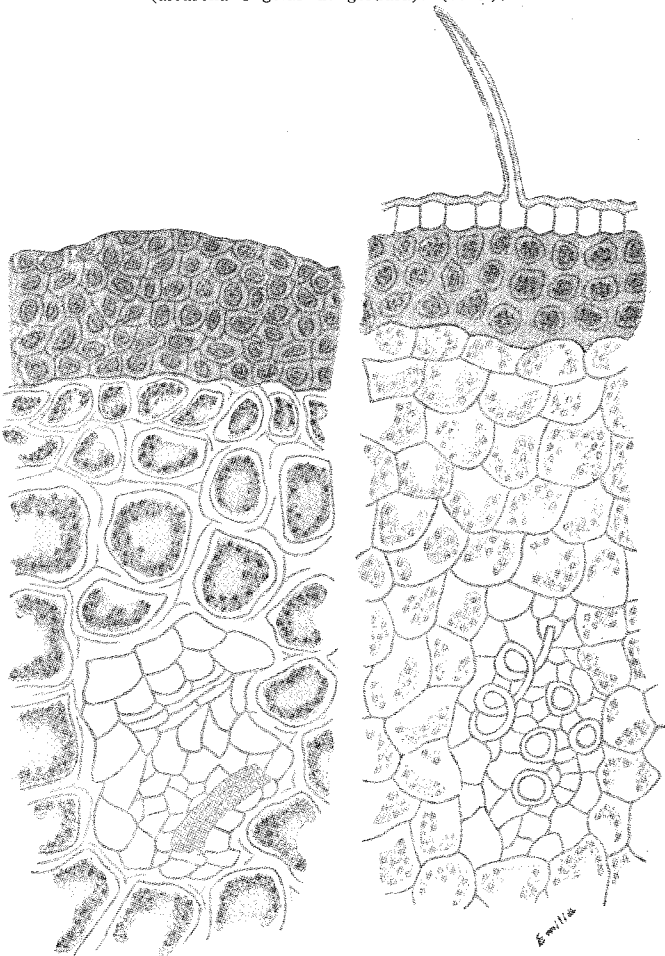


FIG. 27

Tomate e Abobora — corte transversal (Segundo Macé — modif.).



FIG. 30
Pimentão — (micro-reação).

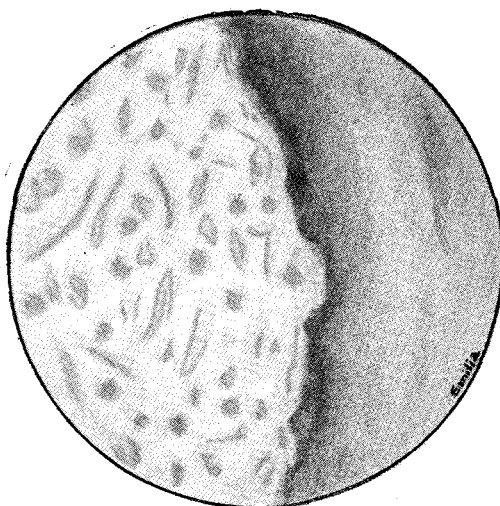


FIG. 31
Cúrcuma — (micro-reação).

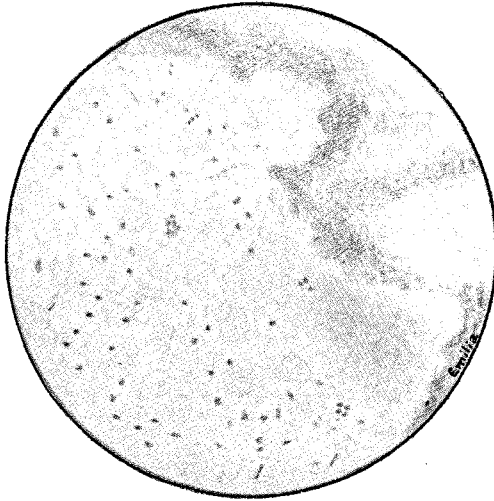


FIG. 32
Urucum — (micro-reação).

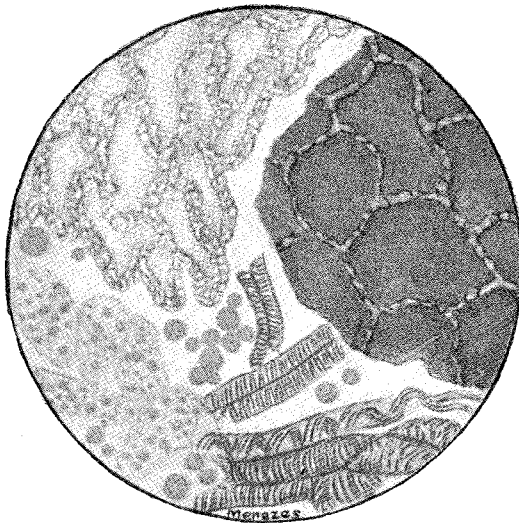


FIG. 33
Pimentão — (360 x).

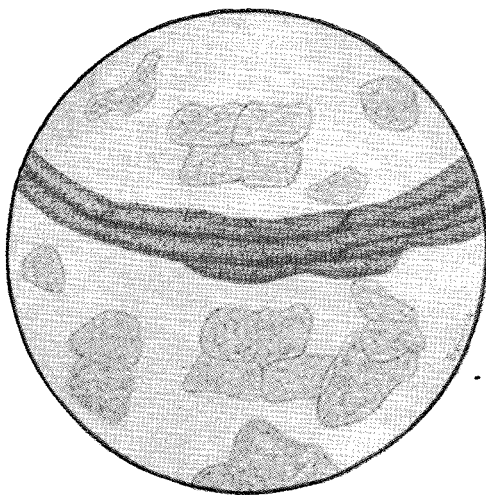


FIG. 35
Batata-dôce (cosida)

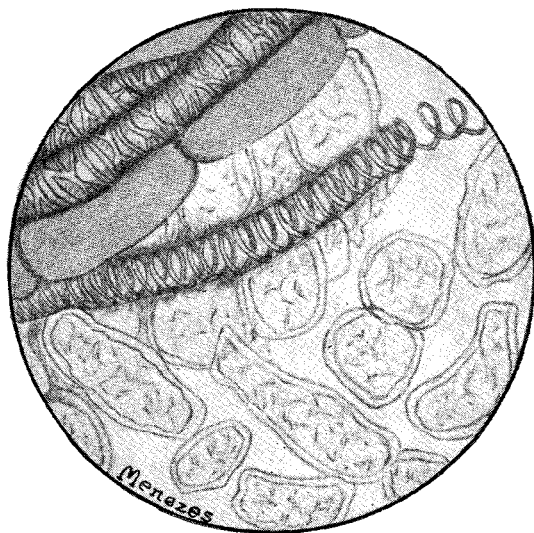


FIG. 36
Banana cosida — (var. *sapientum*). (360 x).

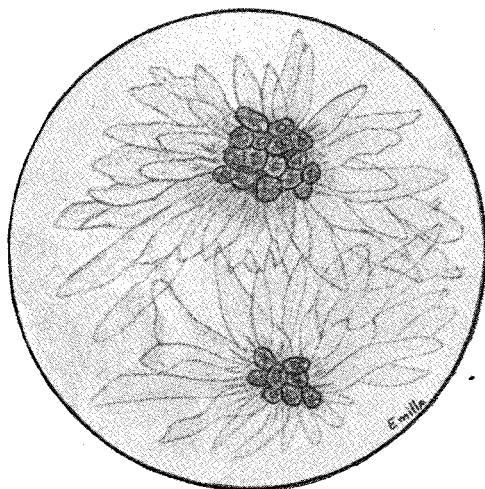


FIG. 37
Pera nacional — (Celulas petreas)

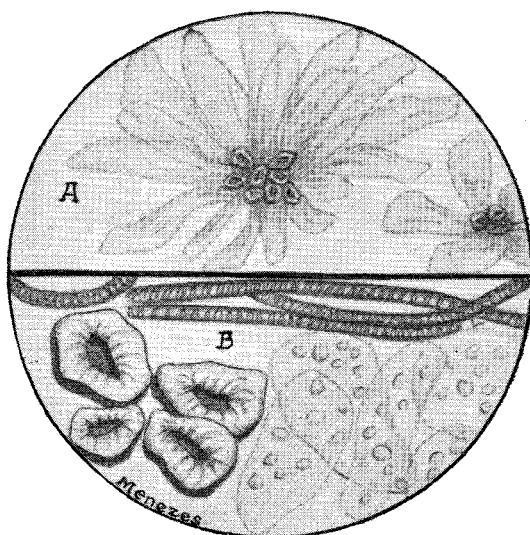


FIG. 38
Pêra nacional
A) Blócos de celulas petreas (80 x); B) Dutos —
células petreas isoladas — celulas amilíferas (360 x).