

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

VOL. III • AGOSTO DE 1943 • 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 volumes, 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

Caixa Postal, 27-A

São Paulo — Brasil

DEPARTAMENTO DE SAÚDE DO ESTADO DE
SÃO PAULO

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA

VOL. III

AGOSTO DE 1943

N.º 1



SÃO PAULO — BRASIL

AV. DR. ARNALDO, 3

SUMÁRIO

	PÁGINA
LUIS DE SALES GOMES — Prof. A. Cardoso Fontes	3
J. P. DE CARVALHO LIMA e MARIA ARANTES — Vacinação contra a Coqueluche	9
LUIS DE SALES GOMES — Hiper-alerxia ao antígeno de Frei, 28 anos após afecção poradênica inguinal	20
LUIS DE SALES GOMES e MANOEL DE BRITTO E SILVA — Provas de absorção das aglutininas heterófilas encontradas na linfogranulomatose de Nicolas Favre	25
BRUNO RANGEL PESTANA e MARIA FLORA QUIRINO FERREIRA — Considerações sôbre algumas propriedades bioquímicas do Bacilo da Difteria	32
HASSIB ASHCAR e EÇA PIRES DE MESQUITA — Identificação dos estafilococos patogênicos	44
BRUNO RANGEL PESTANA e ETTORE RUGAI — Contribuição ao estudo das Pasteurelas	59
ETTORE RUGAI — Da importância da variedade ótica dos substratos empregados na identificação das bactérias	75
ARIOSTO BULLER SOUTO e CELSO RODRIGUES — Anaeróbios em infecções de feridas	81
JOSÉ DA SILVA COSTA — Considerações em torno da cultura da Endameba histolítica	96
ARIOSTO BULLER SOUTO e CELSO RODRIGUES — Soros anti-anaeróbios	112
FLORIANO DE ALMEIDA, CARLOS DA SILVA LACAZ e LUIZ AUGUSTO RIBEIRO DO VALE — Flora micótica de alguns produtos alimentares	148
MÁRIO SAMPAIO MELO — Contrôles dos corantes da hulha em alimentos	156
MÁRIO SAMPAIO MELO — Corantes orgânicos artificiais em gêneros alimentícios	183
FRANCISCO PEDUTTI — Contrôles quantitativo de cobre em aguardentes	216

PROF. A. CARDOSO FONTES

Em sessão quinzenal realizada a 16 de abril de 1943 no Instituto Adolfo Lutz, o Dr. Luis de Sales Gomes, chefe da Subdivisão de Microbiologia e Diagnóstico, pronunciou o seguinte elogio póstumo do Prof. A. Cardoso Fontes, notável cientista brasileiro falecido a 27 de março último, no Rio de Janeiro:

Mal refeita ainda do profundo golpe que sofrera, em 1940, com o desaparecimento de Adolfo Lutz — bem lembrado patrono desta Casa — passa agora a ciência médica brasileira por nova e dura provação com a morte de Antônio Cardoso Fontes, diretor do “Instituto Osvaldo Cruz”, ocorrida a 27 de março último, no Rio de Janeiro.

Cultura científica invulgar, esculpida numa índole boa, sentimental e modesta, Cardoso Fontes representava bem o tipo do pesquisador de laboratório, completamente alheio ao tumulto da vida quotidiana, para só se dedicar às causas nobres e supremas do bem e da fraternidade.

De ouvir-lhe o nome, com frequência citado por mestres, e também por companheiros que então frequentavam Manguinhos, desde os bancos acadêmicos, na Faculdade do Rio, comecei a cultivar um sentimento profundo de admiração e respeito pelo grande pesquisador.

E, quando, acaso, era por nós estudantes surpreendido nos seus passeios à noitinha no Flamengo, onde àquele tempo residia, apontavam-no logo todos, como sendo o grande Professor Fontes, de Manguinhos, cujo único ideal era viver isolado entre as paredes soturnas do seu laboratório, comprazendo-se em investigar detalhes, para nós misteriosos e transcendentais, da biologia do germe da tuberculose.

Mais tarde, porém, haveria de conhecê-lo de perto em São Paulo, onde periodicamente, aparecia a convite das Sociedades médicas locais, expondo os frutos das suas recentes pesquisas e os ensinamentos científicos que só a experiência de muitos anos é capaz de acumular.

Das visitas que fêz ao antigo Instituto Bacteriológico, hoje Instituto Adolfo Lutz, todos guardamos imperecível lembrança. Seu delicado trato e a carinhosa atenção que indistintamente repartia com todos os que dêle se acercavam, foram prendas do seu fino espírito jamais de nós esquecidas.

Fontes pertenceu àquela falange valorosa de moços que Osvaldo Cruz, com a visão e perspicácia de verdadeiro predestinado conseguiu reunir ao seu derredor, para em luta, sob todos os aspectos memorável, riscar do registo nosográfico da metrópole brasileira, o flagelo temível e avassalador do mal amarílico.

Sua carreira científica iniciou-se no ano de 1900, quando, ainda cursando o 3.º ano médico da Faculdade do Rio de Janeiro, foi admitido como auxiliar-aluno do então Instituto Soroterápico Federal, núcleo inicial de onde surgiria posteriormente o famoso Instituto de Manguinhos.

Aí, à sombra benfazeja do Mestre, iniciou-se nos estudos de bacteriologia e imunologia, publicando em março de 1903 sua primeira monografia científica — “Vacinação e Soroterapia anti-pes-tosas” — que, como tese de doutoramento, foi defendida perante a Faculdade do Rio e aprovada com nota distinta.

Depois de dirigir interinamente o Laboratório Bacteriológico Federal e de ocupar vários cargos nos Serviços de Profilaxia da febre amarela e de Erradicação da peste bubônica, passou-se em 1906 para Manguinhos onde, galgando todos os postos, numa ascensão ininterrupta até o cargo de Diretor, produziria toda sua magnífica obra de medicina experimental.

Os primeiros trabalhos feitos em Manguinhos revelam desde logo, no iniciado, os pendores pelo estudo da infecção fimatosa. São do período compreendido entre 1907 e 1909 as seguintes monografias: “Tratamento da tuberculose pela Tuberculina T. A. B.”; “Diagnóstico microscópico diferencial entre o bacilo da tuberculose e os outros ácidos resistentes”, na qual, já preocupado com o estudo das granulações gramófilas de Much, dá a conhecer uma nova técnica diferencial de coloração do corpo bacilar e das granulações — o conhecido método de Cardoso Fontes; e, finalmente, uma outra monografia — “Sôbre a existência nos gânglios tuberculosos de uma substância capaz de destruir os bacilos da tuberculose”.

Nos anos de 1909 e 1910, Fontes, vivamente impressionado com os estudos de Much sôbre as granulações existentes no bacilo de Koch, empreende o seguinte raciocínio:

“O papel que a granulação exerce em relação ao organismo infectado por tuberculose é também preponderante. Já Much em 1907 determinava *in vitro* a transformação da granulação em bacilo e, *in vivo* a natureza infectante da forma granular no pus tuberculoso; aí porém, objetar-se-ia que bacilos inteiros pudessem ser injetados com o material em experiência. Tornava-se pois necessário obter a granulação separada do resto do material para verificar a sua ação sobre o organismo vivo”.

Com êsse intuito, instituiu então as duas famosas experiências que viriam, mais tarde, a se tornar clássicas nos estudos experimentais da tuberculose.

Tomou de 5 cc. de pus caseoso de cobaia infectada com bacilo de origem humana, diluiu-o em 20 cc. de água fisiológica e fê-lo passar através de uma vela Berkefeld, cuja impermeabilidade a bactérias fora previamente estabelecida. O filtrado foi repartido em duas porções. Uma delas, após centrifugação, nada revelou no depósito, à coloração de Ziehl. A outra porção serviu para ser inoculada sob a pele de uma cobaia. Sacrificada após 1 mês, revelou esta cobaia, à necrópsia, gânglios inguinais enfiados, duros e hiperemiados. Estes gânglios não continham bacilos, mas mostravam a existência de granulações incluídas nos linfócitos. Baço esplenomegálico e congesto, apresentando, aos cortes, infiltração linfocitária e hemorragias intersticiais. Nenhum bacilo foi encontrado, mas foram vistas granulações incluídas em células embrionárias.

Afim de verificar se as reações tissulares corriam por conta do germe tuberculoso, uma segunda experiência foi feita inoculando-se um fragmento do baço da cobaia n.º 1, em uma segunda cobaia. Sacrificada ao fim de 5 meses, revelou o segundo animal a presença de bacilos da tuberculose característicos, nos gânglios e nos pulmões, sem contudo apresentarem os tecidos reações típicas de natureza tuberculosa.

Dessas experiências e de outras observações que vêm no mesmo trabalho, publicado no tomo II — 1910, das Memórias do Instituto de Mangunhos, Fontes concluiu, em resumo, o seguinte: que o bacilo da tuberculose deve ser considerado uma reunião de unidades vivas representadas pelas granulações reprodutoras; que estas, sob êste aspecto, assemelham-se aos conídios dos cogumelos; que as granulações existentes no pus tuberculoso atravessam as velas Berkefeld, modelo Nordmeyer, determinando na cobaia o início da reação

tuberculígena; que as grânulações podem transformar-se em bacilos reveláveis por inoculações em série.

Há na parte final dêste trabalho um detalhe que muito de perto nos toca. A sua transcrição aqui, pelo alto sentimento de mútua lealdade e cooperação que êle encerra, vale por uma dupla homenagem a Fontes e a Lutz. Êi-lo:

“Já estava escrito e em provas o presente trabalho, quando tivemos conhecimento pelo Dr. Adolfo Lutz, de uma publicação que fizera em 1886 e que saiu inserta no 1.º facículo dos “Dermatologische Studien” do Dr. P. G. Unna, sob o título “Zur Morphologie der Microorganismus der Lepra”. Por êsse trabalho se vê que já o Dr. Lutz havia verificado o papel preponderante da grânulação do bacilo da lepra na reprodução dêle. Mostra a verificação feita por mim 24 anos depois da que Lutz descreveu com relação à lepra (e tuberculose), ainda que com interpretação diversa do processo de reprodução, a justeza de nossas observações. E isso será tanto mais digno de nota quando se pensar na dificuldade da técnica do início da bacteriologia, maxime em verificações desta natureza.

Manguinhos, março de 1943.”

Publicadas nas “Memórias” de um Instituto, novo embora, mas já com renome internacional, essas experiências, pela magnitude da sua importância, foram logo tentadas nos centros científicos estrangeiros, não logrando porém confirmação.

Trazendo consigo a íntima convicção do rigor com que as orientou, prosseguiu Fontes, indiferente a críticas, os seus trabalhos, dentro do tema de patologia de sua predileção — a infecção tuberculosa.

Assim é que publicou entre 1911 e 1922 mais as seguintes monografias: “Estudos sôbre a tuberculose (1911)”; “Sôbre a pesquisa do bacilo da tuberculose no escarros”; “Variações do poder catalásico do sangue na infecção tuberculosa e relação que êsse poder mantém com a crase morfológica sanguínea”; “Estudos sôbre a tuberculose (1917)”; “Algumas considerações sôbre a infecção tuberculosa”; “Sôbre a perda da ácido-resistência e a desagregação granular dos bacilos de Koch em culturas antigas”.

A confirmação do trabalho de Cardoso Fontes, sôbre a filtrabilidade do virus tuberculoso, publicado em 1910, viria, entretanto, em 1922 e 1923.

Em maio de 1922, no jornal “La Médecine”, e no ano seguinte na Sociedade de Biologia de Paris, Vaudremer assinalou que nas

suas culturas de bacilo de Koch em água de batata, êle encontrara, no fundo do líquido, formas atípicas e não ácido-resistentes do germe, filtráveis em Vela Chamberland L₃.

Em 1923, Calmette, impressionado com a verificação de Vaudremer, resolve confiar a seu discípulo Valtis o cuidado de repetir as experiências de Fontes. Os resultados não se fizeram esperar. Valtis confirma integralmente o achado do pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, mostrando a filtrabilidade através da Vela L₂, das granulações existentes em pus, culturas e escarros tuberculosos.

Vanucci e Verdina, em 1924, na Itália, fazem idêntica confirmação.

A seguir, baseados ainda nas experiências do sábio brasileiro, Calmette, Valtis, Nègre e Bouquet demonstram, experimentalmente, a infecção granular transplacentária.

Assim consagrado pelos centros científicos da Europa, o nome de Cardoso Fontes firmou-se definitivamente no conceito médico-científico universal.

Elas suas observações de 1910, multiplicadas em centenas e centenas de trabalhos produzidos em todos os centros científicos do mundo, estabeleciam os fundamentos da moderna infra-microbiologia, ao mesmo tempo que refundiam completamente concepções havidas como clássicas nos domínios da fisiologia, da bacteriologia e da biologia geral.

Publicou ainda, entre 1923 e 1938, cêrca de 12 trabalhos, entre os quais se destacam: "Sôbre o ciclo vital das bactérias. Contribuição ao estudo da forma granular"; "Algumas considerações sôbre o bacilo da tuberculose colocado em condições experimentais próximas às condições saprofíticas" (em colaboração com J. B. Cunha); "Sôbre a distribuição da nucleína no virus tuberculoso"; "Sôbre a morfogênese das bactérias".

Foi delegado do Brasil à Exposição Internacional de Higiene de Dresden, em 1911; à 1.^a Conferência Internacional de Tuberculose reunida em Roma em 1912; à 9.^a Conferência Internacional de Tuberculose reunida em Varsóvia, em 1934. Foi membro da 6.^a Conferência Internacional de Tuberculose reunida em Roma, em 1923 e do 1.^o Congresso Internacional de Microbiologia reunido em Paris, em 1930. Doutor "honoris causa" pela Universidade de Vilna, e Professor "honoris causa" pela Faculdade de Medicina da Baía. Além de Diretor do Instituto Oswaldo Cruz e da Faculdade de Ciências Médicas, pertencia à Academia Pontifícia de Ciências e

possuía condecorações de inúmeros governos. Em 1942 foi comissionado pelo Governo Brasileiro para estudar nos Estados Unidos a organização dos serviços da luta contra o cancer. Nesse mesmo ano teve seu nome inscrito no Livro do Mérito Brasileiro.

Eis, prezados colegas e companheiros do Instituto Adolfo Lutz, em rápida síntese, o que foi o homem e o cientista que o Brasil acaba de perder.

A obra científica que realizou é tanto mais impressionante e portentosa, quando se sabe que ela foi conseguida sem alardes e sem ruidos. Nasceu e, lentamente, se foi plasmando na plácida quietude do seu laboratório, sob os preceitos de uma fé inabalável e dentro dos princípios da mais rigorosa probidade. Porisso mesmo será imperecível.

O nome de Antônio Cardoso Fontes pertence hoje à posteridade. Ele irá figurar, no panteon dos imortais da ciência, ao lado dos daqueles que, tendo sido grandes estudiosos da tuberculose, foram ainda maiores benfeitores da humanidade.

Honra pois à memória do sábio brasileiro.

VACINAÇÃO CONTRA A COQUELUCHE

J. P. DE CARVALHO LIMA

Diretor do Instituto Adolfo Lutz

MARIA ARANTES

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

Milhares de crianças contraem, anualmente, a coqueluche e elevada porcentagem é vitimada pela moléstia ou pelas suas terríveis complicações, apesar de possuímos, hoje, arma segura e poderosa contra a tosse convulsa.

Vacinas curativas. — Desde que Bordet e Gengou¹ anunciaram, em 1906, a descoberta do micróbio causador da coqueluche, conseguindo, também, a sua cultura no laboratório, houve geral preocupação de se preparar, como se prepara para outras moléstias, uma vacina curativa usando a própria bactéria responsável: o *Hemophilus pertussis*.

O valor das vacinas bacterianas, curativas da coqueluche, sofreu enormes altos e baixos. Nós mesmos, pois o assunto nos preocupa desde a tese de doutoramento (Carvalho Lima²), preferimos em 1917, a *Antitossina de Kraus*, preparada com expectoração de doentes, a qualquer outra vacina feita com o germe causador da moléstia.

Essa preferência foi inteiramente modificada, desde que empregámos o processo de Chiewitz e Meyer³, em que o isolamento do germe é obtido fazendo-se o doente tossir diante da placa de meio de cultura, e conseguimos isolar, em São Paulo, numerosas raças de *Hemophilus pertussis*, que nos permitiram obter vacina dotada de alto poder curativo (Carvalho Lima⁴). Não nos preocupou, nessa época, verificar se a vacina teria, igualmente, valor preventivo. Outros, entretanto, visaram êsse lado da questão.

Madsen⁵, por exemplo, muito céptico, afirmou que a vacina curativa da coqueluche não daria resultado se a moléstia estivesse avançada e, adiantou mais, que não produzia efeitos profiláticos, embora notasse que a infecção era mais branda nos vacinados.

Vacina preventiva. — O cepticismo de Madsen, cujas experiências foram feitas nas Ilhas Faroé, contaminou inúmeros pesquisadores, mas não atingiu a Lowis W Sauer⁶, pediatra americano, que divisou nos resultados de Madsen, alguma cousa de aproveitável. E foi assim que idealizou uma vacina em que o germe da coqueluche, em vez de aquecido, é apenas atenuado, por um antisséptico.

Sauer⁷ selecionou grupos de crianças, variando de 9 meses a alguns anos de idade e que não tinham tido coqueluche.

Os resultados foram mais que animadores. Entre 24 famílias, 31 crianças que não foram vacinadas contraíram a moléstia, ao passo que 29 outras, vacinadas, apesar de expostas ao contágio, escaparam inteiramente.

De 1928 a 1933, Sauer fêz, pacientemente, mais de 1.600 injeções, em cêrca de 300 crianças. Não verificou reações locais ou gerais, de importância.

Vacina Sauer. — Preparada com 5-7 raças de *Hemophilus pertussis*, recentemente isoladas de casos novos de coqueluche, pelo processo de Chiewitz e Meyer. Cultura de 48 horas em meio de Bordet e Gengou com sangue humano fresco. Emulsão em solução fisiológica contendo 0,5% de ácido fênico. Nenhum aquecimento. Permanência, entretanto, de 8 dias na geladeira, findo o que, verificar a esterilidade e dosar a emulsão de modo a conter 10 bilhões de germes por cc..

Nas experiências de 4 anos, 1928-33, as 300 crianças receberam de 7 a 8 injeções de 1 cc., com intervalo de uma semana, ou sejam 70-80 bilhões de bactérias. Verificou que as injeções no *biceps* provocam apenas ligeiro eritema local, com endurecimento que desaparece ao cabo de poucos dias. Raramente febre.

Tôdas as crianças foram expostas ao contágio ou conviveram com doentes de coqueluche. Das 300 crianças, 8 tinham cohabitado com doentes e 127 haviam estado muito expostas ao contágio, mas, não contraíram coqueluche.

Em 1933, prosseguindo as experiências, Sauer verificou que as crianças não injetadas apanharam coqueluche e formulou a seguinte conclusão: *a vacina pertússica, na dose de 7 a 8 cc., contendo 10 bilhões de germes por cc., protege uma criança imune, se as injeções forem feitas pelo menos 4 meses antes do contágio.*

Apareceram imediatamente numerosos adeptos da vacina Sauer. Entre êles o casal de médicos Dr. Hugh Macdonald e esposa, que aplicaram a vacina em 2 dos seus 4 filhos. Depois, com

um vaporizador, espalharam germes da coqueluche nas narinas de todos êles; os 2 vacinados não contraíram a moléstia, enquanto que os outros tiveram coqueluche fortíssima.

Em maior escala foram as experiências de Pearl Kendrick e Grace Eldering⁸, dos laboratórios do Departamento de Saúde Pública do Estado de Michigan. Dividiram em dois grandes grupos as crianças de Grand Rapids *que não haviam tido coqueluche*. Vacinaram 5 mil crianças e outras tantas serviram de contrôle, sem vacinação. Os casos de infecção foram reduzidos entre os vacinados.

Miller e Faber⁹, vacinaram 211 crianças com a vacina Sauer. Como contrôle deixaram 182 crianças. Obtiveram, pelo menos na maioria dos vacinados, completa imunidade.

Requisitos da vacina. — Sauer¹⁰ insiste muito sôbre a técnica de preparação da vacina e sôbre o meio de cultura a empregar.

O meio de Bordet e Gengou com 20% de sangue humano fresco e desfibrinado, além de constituir o meio ideal, é o meio que mais conserva a *Fase* patogênica do bacilo (*Fase I* de Leslie e Gardner¹¹). Também recomenda o aproveitamento total da emulsão obtida raspando-se todo o crescimento dos tubos de cultura de 48 horas. Não é aconselhável colocar a solução fisiológica no próprio tubo de cultura, porque a quantidade de sangue do meio é às vezes suficiente para tingir levemente a emulsão. A centrifugação para remover o sangue enfraquece o poder antigênico da vacina.

"Fases" do bacilo da coqueluche. — Em 1910, Bordet e Sleswyck¹² provaram que não se pode obter sôro aglutinante para identificação de raças recentemente isoladas do *Hemophilus pertussis*, quando se usam raças velhas conservadas em ágar, pois, verificam-se mudanças sorológicas em virtude da adaptação do germe ao meio.

Assim os autores consideraram dois *estados* diferentes do germe dependentes do meio: o *estado I* característico das culturas em meio com sangue fresco; o *estado II*, próprio das culturas em ágar. O *estado II* reverteria prontamente ao *estado I* se o germe fôsse transferido do ágar para meio com sangue. Bordet¹³ verificou, todavia, em culturas velhas, uma lenta alteração do *estado II* com tendência a se estabilizar nesse estado, mesmo em meios com sangue; durante êsse processo a toxidez do germe para a cobaia diminue ou desaparece.

Houve discordância por parte de Krumwiede Jr., Mishulow e Oldenbusch¹⁴ que consideram os 2 *estados* como dois tipos de baci-

los: A e B. Esses tipos, porém, Kristensen¹⁵ demonstrou serem sorològicamente idênticos.

Não podendo conciliar os pontos de vista desses autores, Leslie e Gardner iniciaram novas investigações sôbre a composição sorològica e variação das espécies. Analisaram 32 raças de *Hemophilus pertussis*, pela aglutinação, absorção das aglutininas e dosagem do poder aglutinogênico. Provaram que caíam todos em 4 grupos aglutinativos que chamaram *Fases I, II, III e IV*. As *fases I e II* corresponderiam à forma patogênica do germe (*smooth*); as *fases III e IV*, à forma não patogênica (*rough*). Em geral a cultura transforma as fases patogênicas em fases não patogênicas, mas a adição de sangue ao meio determina a reversão. Concluíram, por fim, que a *Fase I* é mais antigênica ou, talvez, a única antigênica para a imunização ativa de cobaia. Os germes recentemente isolados são da *Fase I*.

Vacina precipitada. — A coqueluche é moléstia de evolução lenta. Com lentidão, também, se forma a imunidade que será, então, duradoura. E' evidente que a própria vacina usada com fim profilático precisa produzir lentamente a imunidade; nesse caso é necessário um produto de absorção demorada.

Surgiu a idéia duma vacina precipitada pelo sulfato de alumínio e potássio, da mesma maneira que se usa hoje o toxóide precipitado na vacinação contra a difteria. Foram seus autores Harrison, Franklin e Bell¹⁶, do Laboratório Higiénico de Washington.

E' sabido que o toxóide diftérico aumenta, muitas vêzes, a sua eficiência antigênica, quando precipitado pelo sulfato de alumínio e potássio adsorvido pelo hidróxido de alumínio. Harrison¹⁷ diz que esse aumento do poder imunizante é devido, provávelmente à lentidão com que o precipitado é absorvido. Lógico que se a vacina é também de absorção lenta e prolongada, as possibilidades de sucesso profilático serão superiores às da vacina comum, de absorção rápida.

Os autores partiram de 1 litro de vacina Sauer contendo 10 bilhões de germes por cc., precipitando-a por solução de sulfato de alumínio e potássio a 4%.

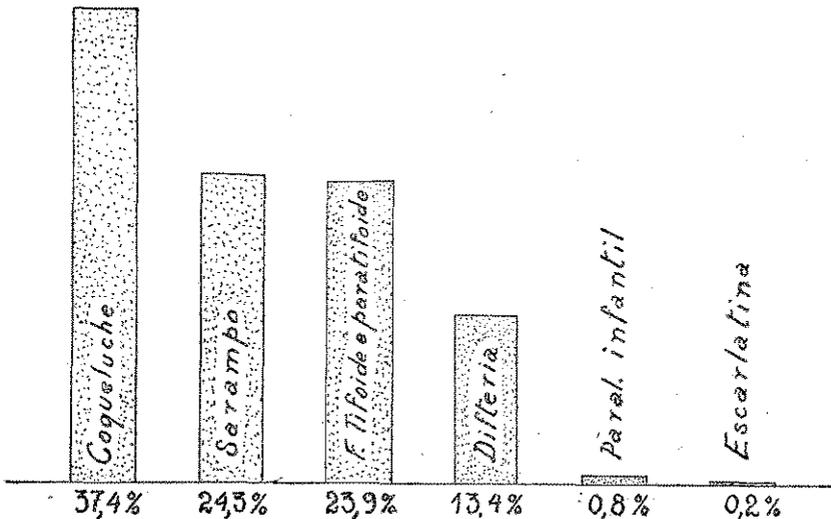
Empregaram essa vacina em 82 crianças em dose única de 1 cc., isto é, 10 bilhões de germes. Como contròle deixaram 109 crianças que não receberam vacina. Tôdas foram observadas durante 1 ano. Nos vacinados houve coqueluche em 12% e os casos verificados foram benignos. Ficaram um tanto desanimados com

os resultados, mas um dos colaboradores, Bell¹⁸, persistiu e preconizou depois de algumas experiências, o emprêgo de 2 doses de 10 bilhões, com intervalo de 4 semanas. Pôde concluir que a vacina confere real proteção contra a coqueluche.

OBSERVAÇÕES PESSOAIS

No Estado de São Paulo, as estatísticas sanitárias dos 5 últimos anos nos dão as seguintes cifras de mortes ocorridas:

Coqueluche	5.247	37,4%
Sarampo	3.426	24,3%
Febres tifoïdes e paratifoïdes	3.357	23,9%
Difteria	1.893	13,4%
Paralísia infantil	111	0,8%
Escarlatina	28	0,2%
	14.062	



Verificamos a coqueluche com obituário maior que o da febre tifoïde, escarlatina, sarampo, difteria e paralísia infantil.

Iniciámos em fins de 1941, o preparo da vacina pelo processo de Harrison, Franklin e Bell. Usámos raças recentemente isoladas

de *Hemophilus pertussis*, portanto na sua fase I, patogênica e algumas raças recebidas do Instituto Lister, de Londres e outras conservadas na coleção do Instituto Adolfo Lutz. Tôdas mantidas em meio com sangue de modo a conservarem a Fase I.

Um dos inconvenientes dos meios com sangue é tingir a vacina, quando se quer aproveitar todo o crescimento. Para só se retirar levemente o crescimento por meio da alça de platina, a produção da vacina é pequena, tornando-se muito trabalhosa a obtenção em maior escala. Porisso, mantemos as raças usadas em meio com sangue mas a sementeira final fazemos num meio que idealizámos partindo do meio de Sauton para tuberculose. Tomámos 100 cc. de ágar comum, juntámos 20 cc. de meio de Sauton e 10 cc. de sôro normal; nesse meio o crescimento é abundante e a vacina, perfeitamente clara. A vacina é, pois, preparada do crescimento de 48 horas em *ágar-Sauton-sôro normal*, obedecendo-se à seguinte técnica:

Primeiro dia. — Seleccionar as culturas. Fazer preparação corada pelo método de Gram. Semear 2 ou 3 tubos de 20x20, de ágar-sangue, e uma placa de ágar-sangue. Incubar 48 horas. Examinar a placa 24 e 48 horas, afim de se certificar de que não há contaminação.

Terceiro dia. — Examinar cuidadosamente, o crescimento de cada tubo e, se houver suspeita de contaminação, preparar lâmina corada pelo Gram. Passar sôbre a superfície do tubo de cultura um estilete com algodão estéril, dêsses usados para colheita de material de garganta. Semear frascos de Kolle contendo 100 cc. de meio *ágar-Sauton-sôro*, passando sôbre a superfície do meio o estilete carregado com material do tubo. Um tubo de ágar-sangue dá, em geral, para semear 2 frascos de Kolle. Incubar 48 horas.

Quinto dia. — Examinar os frascos, fazendo preparações pelo Gram. Desprezar os frascos contaminados ou suspeitos.

Colocar em cada frasco 25 cc. de solução fisiológica estéril, contendo 0,5% de ácido fênico. Com bastãozinho de vidro, um para cada frasco, desprender o crescimento da cultura tendo o cuidado de não quebrar a superfície do ágar. Despejar a emulsão assim obtida num frasco de Erlenmeyer esterilizado, com pérolas de vidro. Agitar, retirar amostra suficiente para a contagem dos germes e depois deixar na geladeira uma semana.

Contagem. — A vacina é estandardizada de modo a conter 10 bilhões de germes por cc.. Para isso, contar, comparativamente, pelo processo de Wright, o número de germes e de hemátias contido em igual volume de sangue e de emulsão, ou contar usando uma câmara para glóbulos sanguíneos.

Prova de esterilidade. — Ao fim de uma semana de geladeira, sem nenhum aquecimento, os bacilos da emulsão inicial não mais crescerão, mesmo semeados em meios adequados. Também não deverá haver contaminação. Far-se-á, então, a diluição de modo a conter 10 bilhões de germes por cc.. Aí está a *vacina Sauer*, que preferimos para o tratamento e não para a profilaxia.

Vacina precipitada. — Partindo da vacina Sauer, cuja técnica descrevemos, prepara-se então, a vacina profilática de Harrisson, Franklin e Bell.

1. Tomar 1 litro de vacina Sauer, contendo 10 bilhões de germes por cc. em suspensão em solução fisiológica contendo 0,5% de fenol.

2. Adicionar 20 cc. duma solução estéril a 10% de bicarbonato de sódio e 250 cc. de solução estéril a 4% de sulfato de alumínio e potássio. Ambas as soluções filtradas em vela Berkefeld.

3. Agitar fortemente. Há formação de pesado precipitado. Deixar 5 horas a 10°C..

4. Decantar o líquido que sobrenada e substituí-lo por solução estéril de cloreto de sódio a 0,85%.

5. Deixar uma noite a 10°C.. Decantar novamente e substituir o líquido que sobrenada por solução estéril de cloreto de sódio a 0,85%, contendo *Merthiolato* na proporção de 1:7.500. Completar o volume para 1 litro.

6. Verificar a esterilidade. Ampolar. Injetar, subcutânea-mente, numa cobaia, 2 cc. correspondendo a 20 bilhões de germes.

Aplicação. — Iniciámos a aplicação da vacina injetando em nós mesmos, no biceps, a dose de 1 cc. = 10 bilhões. Não sentimos dôr e não tivemos reação. No dia seguinte, vermelhidão que durou 48 horas e depois endurecimento que persistiu vários dias.

Não tivemos ainda oportunidade duma aplicação sistemática da vacina. Por circunstâncias alheias à nossa vontade, os Serviços de Medicina Infantil da Capital, aos quais fornecemos vacina, não

o fizeram também. Todavia, já vacinámos um bom número de crianças, tôdas com passado negativo para coqueluche; à princípio duas doses de 1 cc., com intervalo de quatro semanas. Mais tarde adotámos a vacinação em três doses. Algumas das crianças estão sob a nossa observação há cêrca de 1 ano e meio e embora tenham estado em contacto ou mesmo convivido com doentes de coqueluche, não apanharam a moléstia.

A mãe de uma das primeiras crianças vacinadas nos forneceu uma observação que vale a pena ser reproduzida, porque mostra o quadro da maioria das crianças que receberam a vacina:

M. H. P., 18 meses e $\frac{1}{2}$ de idade.

Dia 10-1-42, 1.^a dose, 1 cc. em injeção intramuscular, às 20,30 horas.

Os primeiros sintomas de reacção foram observados à noite. A criança dormiu desassossegada, notando-se elevação de temperatura.

Dia 11-1-42, reacção local mais ou menos intensa, com vermihidão e sensação dolorosa ao tocar.

Temperatura: 9 horas — 38^o,5
 15 horas — 37^o,5
 21 horas — 37^o,5.

Dia 12-1-42, reacção local leve, temperatura normal.

Quatro semanas depois tomou a 2.^a dose e o mesmo quadro foi observado.

Em um caso, J. P., de 8 meses, e que observámos bem de perto, notámos náuseas ligeiras. A primeira dose foi feita à noite e reproduziu-se o quadro da observação anterior. A 2.^a dose fêz-se de manhã e pareceu, a todos da casa, ser preferível. A criança, apesar de febril, distraiu-se durante o dia e à noite já dormiu bem.

Idade para a vacinação. — Sauer¹⁹, aconselha a vacinação do 7.^o mês aos dois anos e meio, uma vez que a coqueluche nessa idade causa grande número de mortes, às vêzes em cifras superiores ao sarampo, à difteria e escarlatina. Quanto às crianças de idade inferior a 7 meses, Sauer afirma que nem tôdas têm o poder de formar anticorpos. Não concordamos muito com êsse ponto de vista. E depois, quem já viu uma criancinha de 2-3 meses num acesso de tosse convulsa, não hesitará em preferir a vacinação, mesmo nessa idade.

E assim pensando, Philip Cohen e Samuel J. Scadron²⁰, de New York, em trabalho recente recomendam a vacinação, contra a coqueluche, das mães nos últimos meses de gravidez, com o fim de

transmitir, por via placentária, anticorpos protetores contra a coqueluche.

Partem da idéia já assinalada que nos dois primeiros anos de vida a coqueluche causa mais mortes que o sarampo, a difteria, a paralisia infantil, e a escarlatina. Mas contra estas últimas moléstias, as crianças nascem, em geral, com certa imunidade passiva, transmitida da progenitora pela placenta, o que não acontece com a coqueluche.

As experiências dos autores deram resultados satisfatórios, comprovados pela verificação de anticorpos, comparativamente no sangue da progenitora, antes e depois de vacinada, e em seguida no sangue do cordão umbilical e no sangue da criança. As vacinações foram praticadas no último trimestre, de modo a estar terminada 1 mês antes do parto. Chegaram a injetar um total de 150 bilhões de germes. As reações no adulto são sempre brandas e os autores verificaram que nenhuma influência as injeções causaram sobre a marcha do parto, assim como nem uma só vez observaram parto prematuro. Concluíram que as crianças nasceram imunizadas contra a coqueluche, prometendo nova comunicação depois duma observação cuidadosa de número elevado de crianças nessas condições, nas quais averiguariam, também, quanto tempo persistiam os anticorpos no organismo não só das crianças, como das próprias mães.

A questão das doses. — Tem sido muito discutida, últimamente, a questão da dosagem na vacinação pertússica. Vimos que a vacina Sauer é empregada na dose de 7-8 injeções de 1 cc., de modo a se inocular de 70 a 80 bilhões de germes. A vacina precipitada pelo sulfato de alumínio e potássio foi aconselhada em duas doses de 10 bilhões com intervalo de 4 semanas. Mas a tendência é se elevar a dose. E Kendrick²¹, por exemplo, já prefere a vacina precipitada em 3 doses de 10 bilhões, sendo as 2 primeiras com intervalo de uma semana, e a terceira injeção quatro semanas depois. Esta técnica é a que usámos ultimamente. Todavia, não podemos ainda dizer que seja a dose ótima ou se conviria se elevar ainda mais o número de bactérias inoculadas.

Vacinação combinada. — Não é novo o uso de diversos antígenos imunizantes injetados simultaneamente. Cada um estimulará a formação dos seus próprios anticorpos. O exemplo mais comum de antígenos mistos na imunização humana é a tríplice vacina tífica-paratífica A e B. E mais recentemente se introduziu o uso com-

binado dos toxóides diftérico e tetânico, com aparente sucesso. É lógico que se pensasse em combinar o toxóide diftérico com a vacina pertússica, ambos tratados pelo sulfato de alumínio e potássio, diminuindo com isso o número de injeções, com grande alívio para as crianças e para a própria família que sente, na maioria, um verdadeiro desassossêgo tóda vez que uma criança se submete a tais tratamentos. Kendrick²² fêz uma experiência. Tomou 3 grupos de crianças. Num, usou a vacina precipitada padrão, noutro a vacina combinada diftérica-pertússica, tratada pelo sulfato de alumínio e potássio e o terceiro grupo deixou como contrôlo. Três injeções, sendo as 2 primeiras com intervalo de 1 semana e a terceira 4 semanas depois. As reações foram semelhantes às que se verificaram quando se usa a vacina pertússica precipitada sozinha ou o toxóide diftérico precipitado: vermelhidão, endurecimento, dôr passageira e, às vêzes, febre. Verificou pelos processos usuais o aparecimento de anticorpos pertússicos e diftéricos no sangue das crianças vacinadas e imunidade das mesmas contra a coqueluche.

Conclusão. — A vacinação preventiva contra a coqueluche atingiu a sua fase decisiva e ninguém mais, sanitaristas, clínicos e os próprios pais, deixarão de usá-la em tódas as crianças, sem serem acoimados de negligentes.

O seu uso sistemático será a barreira firme contra uma doença que, pelas complicações que acarreta, vitima, anualmente, mais crianças do que o sarampo, a difteria, a paralisia infantil, escarlatina e a febre tifoide.

A vacina preferível é a precipitada pelo sulfato de alumínio e potássio, segundo a técnica de Harrisson, Franklin e Bell.

A dose aconselhada é a de 30 bilhões de germes em 3 injeções, as 2 primeiras com intervalo de 1 semana e a terceira 4 semanas depois.

A vacinação das mães durante o último trimestre de gravidez, poderá ser usada.

Tudo indica que a vacina mista usada simultaneamente contra a coqueluche e a difteria entrará para a prática corrente e segura da profilaxia dessas moléstias.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BORDET, J. e GENGOU, O. — 1906 — *Ann. Inst. Pasteur*, 20: 731.
— 1907 — *Ann. Inst. Pasteur*, 21: 720.
- 2 — CARVALHO LIMA, J. P. — 1917 — Tese, Faculd. Med. Rio de Janeiro.
- 3 — CHIEWITZ, I. e MEYER, A. H. — 1916 — *Ann. Inst. Pasteur*, 30: 503.
- 4 — CARVALHO LIMA, J. P. — 1932 — *Ann. Paul. Med. Cir.*, 24: 95.
- 5 — MADSEN, T. — 1925 — *Boston M. e S. J.*, 192: 50.
- 6 — SAUER, L. W. — 1933 — *Jour. Am. Med. Ass.*, 100: 239.
- 7 — SAUER, L. W. — 1933 — *Jour. Am. Med. Ass.*, 101: 1449.
- 8 — KENDRICK, P. e ELDERING, G. — 1935 — *Am. Jour. Publ. Health*, 25: 147.
— 1936 — *Am. Jour. Publ. Health*, 26: 8.
- 9 — MILLER JR., J. J. e FABER, H. K. — 1939 — *Jour. Am. Med. Ass.*, 112: 1145.
- 10 — SAUER, L. W. — 1934 — *Jour. Am. Med. Ass.*, 102: 1471.
- 11 — LESLIE, P. H. e GARDNER, A. D. — 1932 — *Jour. Hig.*, 31: 423.
- 12 — BORDET, J. e SLEESWYCK — 1910 — *Ann. Inst. Pasteur*, 24: 476.
- 13 — BORDET, J. — 1913 — *Cent. f. Bakt. u. Paras.*, 1 Abt., orig., 66: 276.
- 14 — KRUMWIEDE JR., C., MISHULOW, L. e OLDENBUSCH, C. — 1929 — *Jour. Inf. Dis.*, 32: 22.
- 15 — KRISTENSEN, M. — 1922 — *Com. Int. Ser. de L'Etat Danois*, 13: n.º 2.
— 1927 — *C. R. Soc. Biol.*, 96: 365.
- 16 — HARRISSON, W. T. e FRANKLIN, J. P. e BELL, J. A. — 1938 — *Publ. Health Report*, 53: 793.
- 17 — HARRISSON, W. T. — 1935 — *Am. Jour. Publ. Health*, 25: 298.
- 18 — BELL, J. A. — 1941 — *Public Health Report*, 56: 1535.
- 19 — SAUER, L. W. — 1941 — *The Am. Jour. Path.*, 17: 643.
- 20 — COHEN, PH. e SCADRON, S. J. — 1943 — *Jour. Am. Med. Ass.*, 121: 656.
- 21 — KENDRICK, P. L. — 1942 — *Am. Jour. Pub. Health*, 32: 615.
- 22 — KENDRICK, P. L. — 1941 — *Jour. Bact.*, 42: 294.

HIPER-ALERGIA AO ANTÍGENO DE FREI, 28 ANOS APÓS AFECÇÃO PORADÊNICA INGUINAL

LUIS DE SALES GOMES

Chefe da sub-divisão de Microbiologia e Diagnóstico

Entre vários casos remotos de linfogranulomatose inguinal venérea por nós observados, cujo diagnóstico foi retrospectivamente obtido por meio da intradermo reação de Frei, o seguinte nos mereceu particular interesse, não só pelo longo espaço de tempo em que a infecção se havia dado, como e principalmente por se referir a pessoa distinta e amiga, e, portanto, de cuja segurança no fornecimento de dados nosológicos e cronológicos não nos era lícito absolutamente duvidar.

Observação (1.ª fase: infecção) — F., brasileiro, branco, 46 anos, professor. Refere, na sua história venérea progressiva, ter tido aos 18 anos de idade, em agosto de 1914, "época da declaração da grande guerra européa", uma adenite inguinal esquerda, alguns dias após um coito suspeito. Esta adenite veio acompanhada de febre que não pode precisar até quando durou. Lembra-se que procurou ver se tinha algum ferimento no pé e nada encontrou. No penis também nada de anormal apresentava, nem durante a ingua nem antes dela aparecer. A reação ganglionar, porém, foi-se processando gradual e penosamente, acompanhada por vezes de suores frios, principalmente quando procurava locomover-se. Na 2.ª semana da moléstia procurou médico que, dias após, decidiu pela incisão do gânglio para drenagem imediata do pus e atenuação das dores de que sofria. Quando estava em tratamento, outro gânglio, vizinho ao primeiro, veio também a supurar.

A terapêutica constava de curativos diários com água oxigenada diluída e com mechas de gaze introduzidas e deixadas nos trajetos fistulosos. A infecção levou cerca de 3 meses até a cura, restando dela somente as cicatrizes inguinais que apresenta. (Ver a fotografia).

(2.ª fase: diagnose retrospectiva) — Em julho de 1942, portanto 28 anos após a ocorrência supra relatada, estando o paciente em ótimas condições físicas e não apresentando nada que de longe se relacionasse com a moléstia que houvera tido, resolvemos submetê-lo a uma prova antigênica de Frei.

Para isso, injetámos no derma do seu antebraço esquerdo 0,15 cc. de antígeno. 3 dias após a injeção, (quando habitualmente costumamos fazer as leituras dos resultados), contrariando nossa expectativa, nenhuma reação local

então se notava. Nada igualmente no 4.º e 5.º dias. O eritema papuloso característico das reações intradérmicas positivas só começou a se esboçar no 6.º dia, tornando-se bem evidente no 8.º. Mas o processo reacional, longe de iniciar sua regressão, foi cada vez mais se acentuando, até a formação de uma escara cercada de extensa zona de tecido fortemente infiltrado e de coloração arroxeada. (12.º dia. Ver a fotografia). Não foi notada a presença de gânglios axilares. A eliminação do esfacêlo processou-se lentamente, dando-se a cicatrização somente 50 dias depois, a contar da data da injeção do antígeno de Frei. O estado geral do paciente, durante êsse período, manteve-se absolutamente normal.



Vê-se na região inguinal duas cicatrizes antigas (28 anos) e, no antebraço, R. de Frei fortemente positiva (12.º dia) com escara inicial.

COMENTÁRIO — O antígeno utilizado na prova de Frei, era originário de bubão humano, tendo sido por nós preparado segundo

as regras comuns, isto é, diluição a 1:10, aquecimento a 60°C., 2 horas, 2 dias seguidos; além disso, já tinha sido experimentado em inúmeros casos anteriores, positivos e negativos. Contudo, após êste resultado de positividade tão impressionante, repetimos seu contrôlo bacteriológico, em meios aeróbios e anaeróbios, resultando porém estéreis tôdas as provas. Preparações coradas, feitas da secreção sôro-purulenta colhida da cratera ulcerosa resultante da reação, nada apresentaram com relação a germes piogênicos. Para contra-prova final do antígeno utilizado no caso de nossa observação, usamo-lo, posteriormente, em inúmeros outros doentes, obtendo tanto reações fortes, como medias e negativas.

Assim, nenhuma dúvida mais poderíamos ter de que tão intensíssima reação corresse por conta exclusiva de um estado de hiper-alergia, o qual teve sua origem no organismo do nosso observado, 28 anos antes, isto é, quando da sua contaminação com o vírus da paradenite inguinal.

E' coisa sabida (à parte a influência anergizante de outras infecções concomitantes como a sífilis e cancro mole) que a alergia paradenica tem seu início, geralmente, ao fim da segunda para a terceira semana da infecção. E uma vez estabelecida, essa alergia, via de regra, dura anos. E' certo que Chevalier e Bernard¹ chamaram a atenção para alguns casos em que ela cessava logo após a cura; e, a tal propósito, temos também a observação instrutiva de um caso clinicamente típico, reagindo fortemente ao Frei, mas que 1 ano após a cura tornou-se absolutamente negativo a 3 antígenos humanos diversos.

Tais casos, contudo, são excepcionais, sendo a regra a sensibilização por longo prazo — o que se poderá retrospectivamente demonstrar por meio da Reação de Frei, como, aliás, já o fizeram alguns pesquisadores.

Assim Frei² pensava que a alergia cutânea linfogranulomatosa persistisse 10 anos; de igual número de anos é também um caso curado, em que Ceruti e Pavanati³ dizem ter observado "reação intensíssima". Sannicandro⁴ faz referências a uma observação de 20 anos enquanto que Nicolau e Banciu⁵, em seu trabalho sôbre a alergia cutânea na linfogranulomatose, registam 2 observações com reações retrospectivas fortemente positivas, uma de 7 e outro de 22 anos (esta última de colega). Também Pierard⁶ diz ter tido reação de Frei positiva "em um marinheiro que 21 anos antes apanhara uma adenite no Congo Belga". Muito além dêsse

período de tempo; vão porém as observações de Perrucio e Desana⁸ que, sobre 411 doentes velhos de um hospital psiquiátrico, encontraram 31 com reações de Frei nitidamente positivas, dos quais 2 (“com lucidez mental”) haviam contraído a infecção 27 e 42 anos antes; e, por último, o caso interessante e, ao mesmo tempo sugestivo, assinalado por May⁹, de um indivíduo sofrendo há 20 anos de retração palmar (síndrome de Dupuytren) o qual, aos 17 anos sofreu de bubões inguinais, e teve por fim uma reação de Frei fortemente positiva, 63 anos após a poradenite inguinal.

O tempo de duração alérgica do nosso caso, conquanto não seja dos mais espaçados, tem, porém, um cunho de absoluta segurança no que diz respeito ao depoimento anamnésico prestado pelo antigo doente. Este depoimento, aliás, se nos afigura, de importância capital, pois que êle envolve o fornecimento de dados relativos à data de infecção, os quais, precisamente, nos irão dar a conhecer o período de duração alérgica retrospectivamente verificado por teste intradérmico posterior. No caso em aprêço, trata-se de intelectual contando 46 anos de idade e que, em pleno uso de sua memória, pôde referir detalhes precisos a respeito do início e evolução clínica da sua infecção, superpondo-se ela, de resto, inteiramente, à moléstia de Nicolas-Favre.

Não deixam, porém, de apresentar algum interêsse, na nossa observação, os dois seguintes fatos: resposta tardia à inoculação do antígeno (em oposição à regra comum) e, por fim, a reação que, iniciada tardiamente, atingiu, a seguir, um grau de positividade verdadeiramente impressionante, produzindo profunda lesão dos tecidos, a tal ponto que a cicatrização só veio a se verificar mais ou menos 2 meses depois.

Não temos elementos para ajuizar das causas determinantes de uma tal resposta alérgica em antigo linfogranulomatoso; mas desejamos salientar que tipos reacionais assim tão intensos só temos observado com a Reação de Mitsuda, utilizada na exploração da alergia leprótica.

Supomos não existir, entre nós, relato de casos de sensibilização alérgica linfogranulomatosa de tão longa duração e, entre os de que tivemos conhecimento na literatura estrangeira, algum com teste retrospectivo de tão intensa positividade. Daí o darmos publicidade à presente observação.

SUMMARY

The A. refers to a case of venereal inguinal lymphogranulomatosis in which a retrospective diagnosis was made, by Frei's reaction, 28 years after the infection. Amongst other interesting features in the case he reports the following: Late answer to Frei's antigen (6th day) and reaction of such strong intensity that produced a scab. The reaction lasted almost two months to the cicatrization and during this time the patients general health was excellent. The A. calls attention to these details of the case because they are not common in the allergic test on ancient lymphogranulomatosis patients. Finally he calls attention to the similarity between the reaction he observed and that which is usually met with in leprosy allergy when the Mitsuda antigen is used.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CHEVALIER, P. e BERNARD, J. — 1932 — *Bull. Soc. Franc. Dermat. e Syph.*, 39: 769.
- 2 — FREI, W. — cit. por LEBEUF, F. — 1939 — *Revue d'Hyg. et Med. prevent.*, 61: 498.
- 3 — CERRUTI, P. e PAVANATI, E. — 1938 — "Linfogranulomatosi ing. benigna", 266, Ed. Minerva — Med. S. A. Torino.
- 4 — SANNICANDRO, G. — cit. por CERRUTI e PAVANATI — *Op. cit.*
- 5 — NICOLAU, S. e BANCIU, A. — 1932 — *Ann. Dedm. Syph.*, 3: 332.
- 6 — PIERARD, J. — 1933 — *Bruxelles Médical*, 29: 805 .
- 7 — HELLERSTROM, S. — cit. por LEVADITI, J. — 1938 — "Les ultravirus dans les maladies humaines", Libr. Maloine, Paris.
- 8 — PERRUCCIO, L. e DESANA, G. — 1935 — *Riforma Médica*, 24: 51.
- 9 — MAY, J. — 190 — "Poradenofinitis", 252, Impr. "El Siglo ilustr.", Montevidéo.

PROVAS DE ABSORÇÃO DAS AGLUTININAS HETERÓFILAS ENCONTRADAS NA LINFO- GRANULOMATOSE DE NICOLAS FAVRE (*)

LUIS DE SALES GOMES

Chefe de subdivisão do Instituto Adolfo Lutz

MANOEL DE BRITTO E SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

Em trabalho publicado no número anterior desta "Revista"¹, tivemos oportunidade de chamar a atenção dos estudiosos do assunto, para as aglutininas heterófilas por nós encontradas em altos títulos, nos soros de numerosos doentes de linfogranulomatose de Nicolas-Favre.

Esse trabalho teve sua origem, precisamente, no fato de ter sido omitida aquela moléstia, quando, secundando observações de Davidsohn² sobre a moléstia do sôro, Paul e Bunnell³ chamavam a atenção para o alto teor das aglutininas heterófilas na Mononucleose infectuosa, demonstrando, ao mesmo tempo, praticamente, a inexistência de aglutinações altas em inúmeras e variadas condições patológicas humanas.

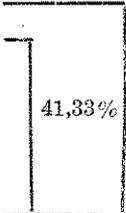
Além disso, tratava-se de pesquisas a serem realizadas em infecção eminentemente linfótropa, como o é também a Mononucleose infectuosa, pelo que, redobrado tornou-se pois o nosso interêsse.

Soros de 75 doentes de linfogranulomatose de Nicolas-Favre foram, então, examinados com relação ao seu teor em aglutininas heterófilas. Os resultados por nós encontrados, podem ser assim esquematizados:

(*) Recebido para publicação, em 2 de julho de 1943.

PROVAS NA LINFOGRANULOMATOSE DE NICOLAS FAVRE

Título	Frequência	41,33%	64,00%
			%
1:7	1 vez		1,33
1:14	6 vezes		8,00
1:28	11 vezes		14,66
1:56	9 vezes		12,00
1:112	17 vezes		22,66
1:224	14 vezes		18,66
1:448	7 vezes		9,33
1:896	5 vezes		6,66
1:1792	2 vezes		2,66
1:3584	2 vezes		2,66
1:7168	1 vez		1,33



75 sôros normais submetidos à mesma técnica, mostraram títulos aglutinantes a 1:112 apenas em 2,66% dos casos, sendo que o título de 1:224 não foi alcançado por nenhum dos soros.

Em face desses resultados, lembramos, então, a conveniência de, ao ser praticada a 1.^a fase da Reação de Paul-Bunnell-Davidsohn para a diagnose da Mononucleose infectuosa, não esquecermos a possibilidade de poder estar em causa não somente a moléstia do sôro, mas também a de Nicolas-Favre, sob qualquer das suas modalidades, só ou coexistente com outra infecção.

Aduzimos, por fim, nosso propósito no sentido do prosseguimento das investigações, afim de tentar, pelas provas de absorção da 2.^a fase, identificar o tipo das aglutininas por nós encontradas na quarta moléstia venérea.

Os resultados dessas investigações são os que ora expomos, figurando êles, pois, como um complemento ao trabalho anteriormente publicado.

A prova de absorção das aglutininas heterófilas encontradas no sôro humano, foi introduzida por Davidsohn⁴ na prática da Reação de Paul e Bunnell, com o intuito de lhe tornar mais precisos os resultados.

Esta prova baseia-se na maior ou menor absorção das aglutininas do sôro (anticorpos) quando em contacto com as suspensões antigênicas de rim de cobaio e de glóbulos de boi.

Assim, se o rim de cobaio absorve 50 a 70% das aglutininas de um determinado sôro e os glóbulos de boi 100%, essas agluti-

ninas correspondem às da Mononucleose infectuosa; se, porém, essa absorção se der totalmente com os dois absorventes, as aglutininas serão iguais às da moléstia do sôro; finalmente, a absorção praticamente total pelo rim de cobaio e parcial pelos glóbulos de boi, indica-nos que elas pertencem às do tipo Forssmann, que são as encontradas nos soros normais, geralmente em títulos baixos e atingindo excepcionalmente o título de 1:112.

As provas de absorção das aglutininas heterófilas a que submetemos os sôros de nossos doentes de 4.^a moléstia venérea, juntamos também o antígeno específico da moléstia, isto é, o pus colhido de um gânglio inguinal linfogranulomatoso (antígeno de Frei). Com a adoção desta prática, tencionávamos averiguar qualquer relação porventura existente entre o vírus da moléstia e as aglutininas presentes no sôro dos doentes.

Técnica. — Os antígenos de rim de cobaio e de glóbulos de boi foram preparados de acôrdo com a técnica indicada por Davidsohn ⁴. O pus da poradenite inguinal foi, como aqueles antígenos, também aquecido a 50°C., por 1 hora, 2 vêzes, e diluído a 20% em soluto fisiológico.

A técnica de absorção não se afastou igualmente da usada pelo autor supra-citado: quantidades variáveis dêesses antígenos, 0,1 e 0,5 cc. foram usadas, conforme os sôros tivessem dosado títulos aglutinantes abaixo ou acima de 1:224, respectivamente.

As dosagens das aglutininas, antes e depois das provas de absorção, obedeceram a critério análogo ao usado em publicação anterior. Infelizmente só pudemos aproveitar 20 dos 75 sôros usados na referida publicação, sendo os 6 restantes, novos.

Resultados. — Os quadros que, a seguir apresentamos, indicam a idade, sexo, tempo de moléstia e Reação de Frei dos doentes, bem como os títulos aglutinantes antigos e atuais dos respectivos sôros. Por fim, vê-se neles também indicados, em percentagem, o poder absorvente dos antígenos postos em contacto com os sôros.

Para os 20 sôros que nos restaram do trabalho anterior, adotámos o mesmo número de ordem; os 6 novos a êles adicionados, receberam numeração a partir de 75.

Em virtude de permanecerem guardados durante vários meses, embora em geladeira, os soros foram de novo titulados. De um modo geral, êsses títulos não sofreram grande alteração. As modificações mais sensíveis deram-se nos soros que sofreram evaporação. Estes soros foram diluídos com quantidades arbitrárias de

Número	Doente	Idade	sexo	Forma clínica	Tempo de moléstia	Reação de Frei	1.a fase		2.a fase		
							Dosagem das aglut.		Identif. das aglutininas		
							Anterior	Atual	% de absorção		
				Rim de cobaio	Globulos de boi	Antígeno de Frei					
30	C. L.	33	mas.	Adenite ing. dir. sup.	1 mês	+++	1/112	1/224	50	87	0
33	L. R.	27	fem.	Retite estenos. fist.	8 m.	++++	1/112	1/224	50	0	50
40	M. T.	35	fem.	Retite estenosante	4 a.	++++	1/224	1/224	99	94	87
41	V. Z.	23	fem.	Fistulas anu-retais	2 a.	+++	1/8584	1/896	97	0	0
42	M. A.	48	fem.	Retite e ulc. vaginal	15 a.	+++	1/896	1/896	87	0	0
45	B. S.	34	fem.	Estenos ret. e uret.	1 a.	++++	1/896	1/448	75	50	0
48	M. T.	28	mas.	Adenite bi later. sup.	2 m.	++++	1/896	1/896	75	50	50
54	M. G.	23	mas.	Prisão de ventre	3 a.	+++	1/112	1/112	87	50	50
56	A. P.	21	mas.	Adenite sup. bi later.	35 d.	+++	1/56	—	75	87	50
59	O. G.	30	fem.	Retite	vários a.	++++	1/56	1/56	100	50	0
62	J. P.	17	mas.	Adenite inguinal	20 d.	++++	1/224	1/224	75	87	50
63	O. S.	30	mas.	Adenite bi lateral	12 d.	+++	1/112	1/112	87	75	75
64	L. C.	25	mas.	Adenite ing. esq.	60 d.	+++	1/224	1/224	50	0	0
65	L. S.	28	mas.	Lesão margem anus	—	++++	1/56	—	87	87	0
66	O. D.	22	mas.	Adenite ing. esq.	20 d.	+++	1/112	—	100	100	0
70	B. B.	26	mas.	Adenite ing. dir.	30 d.	++++	1/112	1/112	50	50	0
72	J. M.	20	mas.	Adenite ing. esq.	3 m.	+++	1/7168	1/7168	98	96	75
73	C. P.	38	fem.	Retite	2 a.	+++	1/224	1/224	94	87	0
74	F. F.	18	mas.	Adenite bilateral	3 m.	++++	1/448	1/896	97	87	0
75	M. G.	31	mas.	{ Perturb. intest. Cic. ing. antiga	bubão ing. sup há 9 a.	++++	1/112	—	75	75	50
76	C. J.	39	fem.	Retite	2 a.	++++	1/112	—	94	94	75
77	C. B.	32	fem.	Adenite bilateral	1 a.	++++	1/56	—	100	75	50
78	J. C.	—	—	Retite	—	++++	1/56	—	50	75	0
79	A. S.	—	—	Retite	—	+++	1/56	—	87	75	0
80	O. S.	35	mas.	Adenite inguinal	40 d.	++++	1/56	1/112	75	0	0
81	A. V.	21	mas.	Adenite inguinal	1 m.	++++	1/56	1/112	50	0	0

soluto fisiológico, ora aquém, ora além da quantidade real anteriormente existente. Não foi outra, certamente, a razão de encontramos títulos mais altos nos sôros 30, 33, 62, 74, 80 e 81, e mais baixos nos 41 e 45.

Com relação ao seu comportamento em face dos soros, vê-se, no quadro junto, que os três antígenos agiram diversamente, sendo que o de glóbulos de boi aproximou-se mais do antígeno linfogranulomatoso.

A ação absorvente dos três antígenos pode ser esquematizada da maneira seguinte:

- 1.º — O antígeno de rim de cobaio absorveu as aglutininas dos 26 sôros experimentados, em porcentagens que variavam de 50 a 100%. A absorção mínima de 50% deu-se apenas em 6 sôros; as aglutininas dos 20 sôros restantes foram absorvidas em porcentagens entre 75 e 100%. Em nenhum caso, deixou de haver absorção.
- 2.º — O antígeno de glóbulos de boi manifestou, de um modo geral, menor poder absorvente que o anterior. Contudo, em 4 soros esse poder absorvente superou ao do antígeno de rim de cobaio, e em 5 sôros igualou-o. É certo que houve uma absorção que atingiu 100% (caso 66) mas, por outro lado, ocorreram 6 absorções nulas (casos 33, 41, 42, 64, 80 e 81).
- 3.º — O antígeno de Frei (pus linfogranulomatoso) foi o que acusou menor poder absorvente: em 1 caso atingiu 87%, em 3 — 75%, em 7 — 50% e nos 15 casos restantes foi nulo.

O número relativamente diminuto de soros utilizados nestas provas de absorção, evidentemente, não permite conclusões seguras e definitivas, quanto a detalhes de classificação das aglutininas heterófilas anti-carneiro, por nós encontradas.

Tanto quanto, porém, nos sugerem essas poucas provas realizadas, parece-nos que tais aglutininas poderiam filiar-se às encontradas habitualmente em baixos títulos nos soros humanos normais, isto é, às aglutininas do tipo Forssmann, que, como se sabe, são geralmente absorvidas em alta porcentagem pelo rim de cobaio e em mais baixa, pelos glóbulos de boi.

É possível que, estudos porvindouros venham aclarar certos aspectos curiosos e ainda mais ou menos obscuros, como êste que focalizamos, existentes neste interessante capítulo da imunologia.

RESUMO

Os AA. reportam-se a uma publicação que fizeram anteriormente, na qual relataram o achado, em altos títulos, de aglutininas heterófilas em soros de pacientes de linfogranulomatose de Nicolas-Favre. No presente trabalho, procuraram identificar o tipo daquelas aglutininas, usando para isso antígeno de rim de cobaio, de glóbulos de boi e antígeno de Frei.

As aglutininas da maioria dos 26 soros experimentados mostraram-se mais sensíveis à absorção pelo rim de cobaio, sendo essa absorção mais baixa com os glóbulos de boi e, menor ainda, com o antígeno linfogranulomatoso.

Dizem os AA. que o número restrito de soros utilizados nas provas, não permite conclusões seguras e definitivas a respeito da classificação das aglutininas achadas, mas sugerem que elas poderiam, talvez, filiar-se às que são encontradas habitualmente em baixos títulos nos soros humanos normais, isto é, às do tipo heterófilo de Forssmann.

Acham por fim os AA. que estudos futuros venham, talvez, aclarar certos aspectos curiosos e ainda mais ou menos obscuros, como o focalizado, existentes neste interessante capítulo da imunologia.

SUMMARY

The AA. recall an article published by them in which they reported the finding of heterofyl agglutinins in high titre in the blood serum of patients with Nicolas-Favre lymphogranulomatosis. In the present work they tried to identify the tipe of those agglutinins by means of various antigens made out of guinea pig kidney, ox erythrocytes or the Frei antigen.

The majority of the agglutinins of the 26 tested sera were more highly absorbed by the guinea pig kidney, less so by the ox erythrocytes and least by the lymphogranulomatosis antigen.

The AA. say that the relatively small number of sera employed for the test did not allow sure and definite conclusions about the classification of the agglutinins met with but suggests that they might perhaps be related to the ones ordinarly found in various titres in normal human blood sera, i. e. those of the Forssmann type.

Finally the AA. believe that further study perhaps will clear up some of the peculiar and obscure aspect of agglutinins, such as the one just focussed in this interesting chapter of the immunology.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — SALES GOMES, L. e BRITO E SILVA, M. — 1942 — *Revista do Inst. Adolfo Lutz*, 2: 212.
- 2 — DAVIDSOHN, I. — 1929 — *The Journ. of Immunol.*, 16: 259.
— 1930 — *The Jour. of Immunol.*, 18: 31.
— 1933 — *The Jour. of Immunol.*, 53: 219.
- 3 — PAUL, J. R. e BUNNELL, W. W. — 1932 — *Am. Jour. Med. Sc.*, 183: 90.
- 4 — DAVIDSOHN, I. — 1937 — *The Jour. of Am. Med. Ass.*, 108: 289.

CONSIDERAÇÕES SÔBRE ALGUMAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DO BACILO DA DIFTERIA

— *Corynebacterium diphtheriae*

BRUNO RANGEL PESTANA

Chefe de Sub-divisão do Instituto Adolfo Lutz

MARIA FLORA QUIRINO FERREIRA

Técnica do Instituto Adolfo Lutz

Numerosos são os trabalhos publicados sôbre as propriedades bioquímicas do *Corynebacterium diphtheriae*. Há, no entanto, divergências quanto à sua propriedade de produzir indol, H_2S , de reduzir os nitratos e de fermentar os carboidratos.

Lehmann e Neumann (1896) descrevendo o bacilo diftérico, dizem que êle produz: fracamente H_2S , nitritos nas culturas velhas, reação de indol positiva, dando um pequeno pigmento amarelo ou vermelho. Fermenta a dextrose e levulose. Em 1927 descrevendo outra vez êsse bacilo, dizem que êle produz H_2S , nitritos nas velhas culturas, dando indol com H_2SO_4 , fermentando sempre, dextrina, levulose, maltose, galactose e glicerina, enquanto que, somente algumas raças fermentam a sacarose.

Topley e Wilson (1936) descrevendo o bacilo diftérico, dizem que não produz indol, mas que, de acôrdo com os resultados obtidos por Frieber (1921) o *C. diphtheriae* dá reação colorida com H_2SO_4 e nitrito de potássio (reação de Salkowski) dada a formação de indol-ácido acético, derivado do triptófano, mas que não produz a reação de indol com o paradimetilamidobenzaldeído (reativo de Ehrlich). Reduz o nitrato, não liquefaz a gelatina.

Bergey, Manual of Determinative Bacteriology, 5th edition — 1939, descrevendo o *Corynebacterium diphtheriae* dá como não produzindo indol, não reduzindo nitratos para nitritos, nada se referindo quanto ao H_2S . Tôdas as raças formando ácido em dextrose e levulose, algumas fermentando galactose, maltose, dextrina e glicerina, nada dizendo dos demais carboidratos.

Referindo-se aos tipos, relata os trabalhos de Durant e MacLeod, sobre a fermentação dos diversos carboidratos para a sua diferenciação.

Knapp (1904) foi, no entanto, quem primeiro empregou os diversos carboidratos como meio diferencial dos bacilos diftéricos e pseudo-diftéricos, usando o meio soro água de Hiss. Achou, esse autor, que o bacilo diftérico fermentava a dextrose, a manita, a maltose, a dextrina e não a sacarose, que o bacilo xerosis fermentava a dextrose, a manita, a maltose a sacarose e não a dextrina. Acha ele que a dextrina e a sacarose são carboidratos diferenciais para esses dois germes. Alice Hamilton e Jessie Horton, estudando o grupo dos bacilos diftéricos, confirmam os resultados obtidos por Knapp, menos no que diz respeito ao emprêgo da dextrina, pois, verificaram que algumas raças de bacilos diftéricos, não fermentam a dextrina, e encontraram 2 raças do grupo semelhante ao bacilo pseudo-diftérico que fermentavam a dextrina. Hanz Zinsser (1917), verificando os trabalhos de Knapp e Hamilton e Horton, chegou à conclusão que certas irregularidades verificadas na fermentação, podem ser devidas às impurezas do carboidrato e da cultura a que dá grande importância. Chegou à seguinte conclusão:

“O bacilo diftérico fermenta a dextrose, a levulose, a galactose, a maltose e a dextrina, não fermentando a manita, a lactose, a sacarose e a dulcita.

O bacilo xerosis fermenta a dextrose, a levulose e a galactose, a maltose e a sacarose, não fermentando a manita, a lactose, a dulcita e a dextrina.

No grupo dos pseudos diftéricos, que fermentam os carboidratos do mesmo modo que o bacilo diftérico, todos esses germes fermentaram a dextrina levemente, depois de 10 dias de estufa e eram virulentos”.

A. Perry, Ona Whitley e Elizabeth Petram (1936), estudando 285 amostras de *Corynebacterium diphtheriae*, verificaram que todas produziam ácido em dextrose e dextrina e nenhuma em sacarose. Referindo-se à fermentação da dextrina, chamam a atenção para certas raças que dão pouco ácido, sendo necessário fazer-se a leitura com 24, 48 e 72 horas.

Frobisher (1938) estudando algumas propriedades bioquímicas do *C. diphtheriae*, chegou à seguinte conclusão: Fermenta os seguintes carboidratos — dextrose, *d*-manose, galatose, *d*-levulose. Não fermenta xilose, sacarose, lactose, celobiose, melecitose, inulina, *l*-eritridol, adonita, *d*-manita, dulcita, sorbita, esculina arbri-

tina, amidalina, *d*-metil-glucósido, inosita e perseita. Variam na sua ação fermentativa quanto à *l*-arabinose, ramnose, trealose, rafinose, amido, glicogênio, glicerina e salicina. Não reduz nitratos a nitritos, não liquefaz a gelatina, não produz H₂S, indol e acetil-metil-carbinol.

Relata os meios empregados e a técnica usada, sendo esta parte do trabalho importante, porquanto, para que os resultados sejam comparados com os de outros autôres, é necessário que os métodos empregados sejam os mesmos. Só assim, poderemos então, tirar conclusões para estabelecer uma classificação.

Numerosos trabalhos foram feitos sobre a bioquímica do bacilo diftérico, verificando a maioria dos autores que o *C. diphtheriae* fermenta a glicose, produzindo somente ácido, e que a dextrina é usualmente fermentada. Quanto aos outros carboidratos, as opiniões diferem, achando alguns autôres que são fermentados frequentemente, outros que variam com a espécie estudada.

Quis-se mesmo admitir a classificação do *C. diphtheriae*, em grupos, baseados na ação fermentativa dos diferentes carboidratos. Durant (1921) estudando diversas raças de bacilos diftéricos verdadeiros, diz que tôdas fermentam a glicose e levulose e que a ação sobre a glicerina, galactose, maltose, sacarose e dextrina varia segundo os tipos, o que permite fazer a distinção entre êles.

Park, Williams e Mann de acôrdo com os trabalhos de Durant, estabeleceram 5 tipos citados por Bergey no seu Manual.

		Maltose,	Dextrina,	Glic.	Galact.	Sacar.
Tipo	I — American (n.º 8)	+	+	—	—	—
"	II — Durant	—	—	—	—	—
"	III — Nodet	+	+	+	+	—
"	IV — Benjamin	+	+	+	+	—
"	V — Subeaux	+	+	+	+	—

MacLeod, baseado na morfologia da colônia e na ação fermentativa, divide em três tipos: um que fermenta dextrina, amido e glicogênio e dois que não fermentam êsses dois ultimos carboidratos.

Tendo estado o serviço de difteria a nosso cargo, julgamos interessante fazer considerações sobre algumas propriedades bioquímicas de 1.452 amostras de *Corynebacterium diphtheriae* por nós isoladas e identificadas.

Antes, porém, vamos descrever os métodos por nós usados.

As amostras aquí estudadas, foram isoladas na maioria de doentes de difteria recolhidos ao hospital de Isolamento "Emílio Ribas", sendo que 283 foram verificadas pela Dra. Jandira Planet do Amaral, do Instituto Butantã, a virulência e a toxigenicidade. Foram tôdas elas identificadas pela sua morfologia, como bacilos diftéricos típicos e só depois de verificar a sua pureza é que foram estudadas as suas propriedades bioquímicas.

Empregámos também as culturas Park 8 e as n. 3985 "Gravis", 3990 "Mitis" e 3988 "Intermedius", da coleção do Instituto Lister.

OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS — E' êste um ponto importante. E' necessário que se tenha certeza de que as culturas se achem em estado de pureza, sem o que, os resultados serão falhos.

Dos tubos de Loeffler, foi feita a sementeira em placas de ágar telurato de sódio. Isolámos uma ou duas colônias em meio de Loeffler, verificando a sua morfologia e pureza. Os casos duvidosos foram reisolados, afim de podermos ter absoluta certeza de trabalharmos com culturas puras.

PRODUÇÃO DE INDOL — Pesquisámos com o reativo de Ehrlich em culturas de 10 dias a 37°, em meio de água peptonada.

LIQUEFAÇÃO DA GELATINA — Culturas foram incubadas a 37°C por 10 dias. Foi verificada a ação sôbre a gelatina, por permanência das culturas na geladeira, durante alguns minutos. Se não liquefeita a gelatina, voltavam os tubos de cultura, à temperatura de 37° por mais 20 dias, sendo então, pesquisada novamente, por permanência na geladeira, se havia ou não liquefação da mesma.

LEITE COM LITMUS — Técnica comumente usada, prolongando-se o período de incubação por 10 dias.

REDUÇÃO DE NITRATOS — O meio de cultura e os reagentes foram os recomendados pelo Manual of Methods of the Society of American Bacteriologist.

Depois de semeados, eram incubados os tubos à temperatura de 37°, pesquisando-se os nitratos pela técnica alí recomendada, até dez dias de estufa.

H₂S — Foi empregado o papel acetado de chumbo, suspenso na bôca do tubo contendo caldo comum. Os tubos foram mantidos na estufa a 37°, por 5 dias. A peptona empregada foi a de Park & Davis, pois é sabido que a produção de H₂S varia com a qualidade da peptona.

FERMENTAÇÃO DE CARBOHIDRATOS — Para verificação do poder fermentativo, usámos o meio de Hiss modificado, adicionando-se o carbohidrato na proporção de 1%, indicador Andrade ou vermelho neutro. A fórmula é a seguinte:

1 — Sêro de cavalo	200,0 cm ³
2 — Água destilada	800,0 cm ³
3 — Peptona	10,0 gr.
4 — Fosfato di-sódico	1,0 gr.
5 — Fenol vermelho em sol. a 0,2%	10,0 cm ³
6 — Carbohidrato	10,0 gr.

Técnica de preparação:

Diluir o sêro em 600 cm³ de água, ajustar ao pH 8,4 e adicionar mais 3 cm³ de sol. normal de soda. Autoclavar 20 minutos a 120° C. Dissolver a peptona e o fosfato de sódio nos 200 cm³ de água, reservados, ferver e ajuntar ao sêro acima preparado. Completar 1000 cm³ com água destilada e ajustar ao pH 7,6. Ajuntar o carbohidrato e o indicador. Esterilizar 30 minutos a vapor corrente.

A pureza do carbohidrato empregado é também de grande importância, bem como o seu poder rotatório, isto é, se é levógiro, dextrógiro ou inativo. Estas propriedades deverão ser sempre mencionadas, para que os resultados sejam constantes e comparáveis.

Outra dificuldade, é a obtenção da dextrina, pois o seu poder de ser fermentada varia muito, conforme já demonstraram Andrews e seus colaboradores em sua monografia sobre a difteria (1923). Verificaram que as dextrinas do comércio variam quanto ao seu poder rotatório e o de reduzir, e não existir relação entre o poder de fermentação e a quantidade da maltose. Assim, tivemos ocasião de examinar diversas amostras, que continham maior quantidade de amido o que dificultava em grande parte o seu ataque. A dextrina por nós empregada foi a Pfanstihel Chemical — Special Bacteriological (pptd from alcohol) cujo poder rotatório é em solução aquosa a 1% $[\alpha]_{19} = + 170$.

D

Os carbohidratos por nós empregados foram os seguintes, da firma Pfanstihel Chemical:

<i>Monosacharides:</i>	<i>Disacharides:</i>	<i>Alcool:</i>
<i>Pentoses:</i>	Sacarose	Glicerina
l — arabinose	d — lactose	Adonita
d — xilose	Trealose	d — manita
l — ramnose	Celobiose	dulcita
	<i>Trisacharides:</i>	d — sorbita
		i — inosita
<i>Hexoses:</i>	Rafinose	<i>Glicosides:</i>
dextrose	<i>Polisacharides:</i>	salicina
d — manose	inulina	esculina
d — galactose	amido	
d — levulose		

PESQUISA DE CROMOGÊNESIS — Foi observada em tubos de Loeffler com pH 8, em temperatura ambiente e a 37°C.

Tivemos ocasião de isolar e identificar 1.452 amostras, as quais, foram tôdas identificadas como típicas de *Corynebacterium diphtheriae*, pela sua morfologia. Tôdas essas raças fermentaram, a dextrose e dextrina, variando quanto à dextrina na sua intensidade, devendo, por êsse motivo, ser feita a leitura com 48 hs., e com 72 hs. Das 1.452 amostras, 184 fermentaram a sacarose, o que dá uma porcentagem de 12,6% e 32 o amido, ou seja 2,2%.

Das raças consideradas pela sua morfologia como pseudo diftéricas (*B. xerosis*), nenhuma fermentou a dextrina, sòmente fermentaram a sacarose e a dextrose. Foram inoculados em cobaias demonstrando serem avirulentas, não dando mesmo reação local.

Das raças típicas de *Corynebacterium diphtheriae* que fermentaram a sacarose, algumas foram inoculadas em cobaias e verificada a sua virulência e toxigenicidade, pela Dra. Jandira Planet do Amaral, do Instituto Butantã, tendo tôdas elas demonstrado serem virulentas e produzir toxina. Tivemos mesmo ocasião de isolar diversas raças provenientes de um pequeno surto em pessoas da mesma família. Tôdas elas fermentaram a sacarose, confirmando assim as pesquisas epidemiológicas, as quais filiaram os casos a um primeiro, do qual isolámos uma cultura que fermentou sacarose e era virulenta e tóxica. Algumas mesmo, isoladas da pele, demonstraram ser bem virulentas e produzir toxina.

As raças de *C. diphtheriae* por nós estudadas fermentaram os seguintes carboidratos: dextrose, maltose, *d*-galactose, *d*-levulose, *d*-manose, dextrina e glicerina. Devemos notar que a fermentação

da glicerina é muito irregular quanto a sua intensidade. Algumas raças fermentaram e coagularam em 24 horas, outras levaram 2 a 5 dias, para acidificarem. Tôdas elas fermentaram a glicerina, enquanto que as de pseudo diftéricos por nós estudadas, nenhuma fermentou.

Não fermentaram: d-lactose, d-manita, d-xilose, adonita, l-arabinose, dulcita, d-galactose, inosita, inulina, l-rhamnose, (isodulcита), rafinose, salicina, d-sorbita, celobiose, trealose e esculina.

A sacarose foi fermentada por 148 amostras típicas de *C. diphtheriae*. As raças que fermentam o amido são muito raras entre nós; isto está de acôrdo com os estudos por nós feitos quanto a morfologia da colônia, pois a forma *gravis* é muito rara na cidade de S. Paulo.

Das nossas observações, não resta dúvida ser a dextrina um elemento básico na identificação do *C. diphtheriae*, pois de 1.452 amostras por nós isoladas, nenhuma deixou de a fermentar. O mesmo aconteceu com as raças Park 8, 3.985 *gravis*, 3.990 *mitis* e 3.988 *intermedius*, do Instituto Lister.

Acreditamos, que as diferenças observadas por outros autôres quanto à fermentação dêsse carboidrato, possam talvez ser levadas em conta da qualidade do carboidrato usado. Tivemos ocasião de experimentar diversas marcas e partidas do mesmo fabricante, as quais eram sempre impuras, contendo em grande parte grânulos de amido o que dificultava a ação do bacilo. A dextrina usada por nós, foi sempre verificada a sua pureza e controlada com raças que não fermentam êsse carboidrato (*B. xerosis*), para termos a garantia absoluta do seu perfeito funcionamento.

A glicerina é também um bom elemento na classificação dos bacilos diftéricos, pois tôdas as amostras típicas de *C. diphtheriae*, a fermentaram, enquanto que, das não diftéricas, nenhuma raça produziu ácido. As raças Park 8, 3.985, 3.990 e 3.988 também fermentaram a glicerina.

Bergey, citando os trabalhos de Park, Williams e Mann diz que o Park 8 não fermenta glicerina e galactose; no entanto, as nossas observações demonstraram que, não só essa raça, como as de números 3.985, 3.990 e 3.988 também fermentam a glicerina e galactose.

Pela fermentação podemos separar o *C. diphtheriae* em 3 grupos:

I — fermentando dextrose e dextrina e não fermentando a sacarose.

II — fermentando dextrose, dextrina e sacarose.

III — fermentando dextrina, dextrose e amido.

NITRATOS — As raças por nós examinadas, tôdas reduziram nitratos à nitritos. Os nossos resultados estão em desacôrdo com Bergey — Manual of Determinative Bacteriology, 5.^a ed., 1939, o qual diz que o *C. diphtheriae* não reduz nitratos.

Está de acôrdo com as observações de Topley e Wilson e Frobisher, os quais verificaram que tôdas as raças reduzem nitratos à nitritos. Verificamos, no entanto, que a raça 3.985 *gravis* e, 3.990 *mitis* do Inst. Lister reduzem nitratos tardiamente.

A técnica por nós usada foi a mesma empregada por Frobisher e descrita no Manual and Methods of the Society of American Bacteriologist.

INDOL — Tôdas as raças deram reação de indol negativa pelo reativo de Ehrlich. As nossas observações estão de acôrdo com Topley e Wilson, Bergey e Frobisher.

H₂S — A produção de hidrogênio sulfurado varia de intensidade, sendo que nas raças tipo *gravis* a produção foi em geral mais acentuada e nas raças tipo *mitis*, foi onde houve maior número de produções mínimas e negativas.

Lehmann e Neumann, dão como produzindo H₂S o *C. diphtheriae*; Bergey, em seu Manual, nada refere a êsse respeito e Frobisher diz, que tôdas as raças por êle examinadas, não produziram H₂S. Essa divergência, talvez seja devida à qualidade da peptona usada, no método empregado.

GELATINA — Tôdas as amostras por nós verificadas, não liqüefizeram a gelatina, estando de acôrdo com as verificações feitas por outros autôres.

LEITE COM LITMUS — As raças verificadas não modificaram o meio ou acusaram uma ligeira acidez, estando as nossas observações de acôrdo com as de outros pesquisadores.

CROMOGÊNESIS — Vários autôres têm observado pigmentação em certas culturas de *C. diphtheriae*. Pigmento de côr amarela, se produz quando semeadas no sôro de Loeffler, na temperatura a 37° e na ambiente, sendo mais intensa nesta. As nossas observações confirmam as de outros autôres, pois, verificámos a existência de pigmentos nas culturas, quando semeadas em meio de Loeffler de reação alcalina e guardados na temperatura ambiente ou a 37°.

RESUMO

Foram identificadas pela sua morfologia, 1.452 raças como típicas de *Corynebacterium diphtheriae*, as quais fermentaram dextrose e dextrina, tendo a fermentação desta variado de intensidade, algumas fermentaram a sacarose, outras o amido.

As que foram classificadas como pseudo-diftérico (bacilo xerosis) não fermentaram a dextrina, tendo fermentado a dextrose e a sacarose. Tendo sido inoculadas em cobaia, estas raças de pseudo-diftérico, não mataram nem produziram reação local, demonstrando assim serem avirulentas.

Foram inoculadas, também, diversas raças típicas pela morfologia de *C. diphtheriae* que fermentaram sacarose, tendo elas demonstrado serem virulentas e tóxicas. Foram isoladas raças, de diversos casos em uma mesma família, filiadas a um primeiro caso, do qual tinha sido isolada uma cultura de *C. diphtheriae*, que fermentou sacarose e era virulenta e tóxica.

Tôdas as raças classificadas como *C. diphtheriae*, fermentaram a glicerina com maior ou menor intensidade, enquanto que, as de pseudo-diftérico não fermentaram êste carboidrato.

Das 1.452 raças de *C. diphtheriae*, 184 fermentaram sacarose o que dá uma percentagem de 12,6% e 32 amido, ou seja 2,2%. As raças que fermentam o amido (tipo *gravis*) são muito raras em São Paulo, o que concorda com os nossos estudos de classificação dos tipos, pela morfologia das colônias.

A dextrina pode ser considerada elemento básico na classificação dos diftéricos, pois das 1.452 raças nenhuma deixou de fermentá-la, apesar de variar de intensidade, tendo procedido da mesma maneira as raças Park 8, 3.985 (*Gravis*), 3.990 (*Mitis*) e 3.988 (*Intermedius*) do Inst. Lister.

A pureza do carboidrato empregado é de grande importância, bem como o seu poder rotatório. Estas propriedades deverão ser sempre mencionadas para que os resultados sejam constantes.

A qualidade de dextrina empregada é importante, pois o seu poder de ser fermentada varia muito, conforme já verificaram outros autores. Foi usada a dextrina Pfanstiehl Chemical — Special Bacteriological (pptd from alcool) cujo poder rotatório é em solução aquosa a 1% $[\alpha]_{19} = + 170$.

D

Todas as raças que foram classificadas como *C. diphtheriae* fermentaram: dextrose, maltose, *d*-galatose, *d*-levulose, *d*-mano-

se, dextrina e glicerina algumas a sacarose, outros o amido. Não fermentaram: *d*-lactose, *d*-manita, *d*-xilose, adonita, *l*-arabinose, dulcita, *d*-galatose, inosita, inulina, *l*-rhamnose (isodulcita) rafinose, salicina, *d*-sorbita celobiose, trealose e esculina. Todos os carbohidratos usados foram Pfanstieht Chemical.

Podemos pois, pela fermentação, separar o *Corynebacterium diphtheriae* em 3 grupos:

I — Fermentando dextrose e dextrina não fermentando sacarose.

II — Fermentando dextrose, dextrina e sacarose.

III — Fermentando dextrose, dextrina e amido.

Tôdas as raças reduziram nitratos a nitritos, nenhuma deu indol, na produção de H₂S variaram de intensidade, não liquefizeram a gelatina, acusaram ligeira acidez em leite litmus e quanto à cromogênese, algumas mostraram pigmento amarelo.

* * *

Queremos assinalar os nossos agradecimentos a D.^a Maria da Conceição Nistal pelo auxílio que nos prestou na parte técnica deste trabalho.

ABSTRACT

They were indentified by their morphology 1452 strains as typical *Corynebacterium diphtheriae* which fermented dextrose and dextrin, having this one the fermentation varying in intensity, some fermented saccharose and other starch.

Those which were classified as pseudo diphteria (xerosis bacillus) dit not ferment dextrin, but, fermented glucose and saccharose. The strains of pseudo diphteria, when inoculated in guinea pigs, did not kill them, having not even produced a local reaction, thus proving their avirulence.

Also there have been inoculated various strains typical by their morphology to *C. diphtheriae* which fermented saccharose, then proving to be virulent and toxic. Strains were isolated in various cases in a same family, descending from a first case, of which a strain of *C. diphtheriae* had been isolated, which fermented saccharose and was virulent and toxic.

All the strains as *C. diphtheriae* fermented glycerine with more or less intensity, while the pseudodiphteria bacillus did not ferment this carbohydrate.

In 1452 strains of *C. diphtheriae* 184 fermented saccharose which gives a percentage of 12,6% and 32 starch or 2,2%. The strains which fermented starch (typo *gravis*) rarely occurs in São Paulo, which is in accordance to our studies of the classification of types, by the morphology of the colonies.

Dextrin may be considered as a basic element to the classification of the diphteria bacillus, as of the 1452 strains all have fermented it (none has failed to ferment it), in spite of the different intensities, having behaved in the same way the strains Park 8, 3985 (*Gravis*), 3990 (*Mitis*) and 3988 (*Intermedius*) from the Lister Institute.

The purity of the carbohydrate used is of great importance, as well as its rotatory power.

These characteristics should be always mentioned in order the results may be constant.

The brand of the dextrin used is important, as its power of fermentation changes with quality, according to the various authors.

There was used dextrin Pfanstiehl Chemical — Special Bacteriological (pptd from Alcohol), the rotatory power of which in

19

a water solution in 1% () — to + 170.

D

All these strains which were classified by their morphology to *Corynebacterium diphtheriae* form acid from dextrose, maltose, d-galactose, d-levulose, d-manose, dextrin and glicerine; some strains also ferment saccharose and other starch. No acid from d-lactose, d-manitol, d-xilose, adonitol, l-arabinose, dulcitol, d-galactose, inositol, inulin, l-rhamnose (isodulcitol) raffinose, salicin, d-sorbitol celobiose, trealose, esculin. There was used all carbohydrate from Pfanstiehl Chemical.

Therefore we may separate the *Corynebacterium diphtheriae* in 3 groups according to the fermentation:

- I — Fermenting dextrose and dextrin, but not saccharose.
- II — Fermenting dextrose, dextrin and saccharose.
- III — Fermenting dextrose, dextrin and starch.

Alls strains were reduced nitrit, indol not formed, hydrogen sulfid was produced, varying in intensity, no gelatin liquefaction, litmus milk slightly acid. Some strains showed yellow pigment.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, J. S., JAPPOLD, T. C., MACLEOD, J. W. e THOMSON, J. A. — 1931 — *Jour. Path. & Bact.* 342, 667.
- ANDREWS, F. W., BULLOCH, W., DOUGLAS, S. R., DREYER, J., GARDNER, A. D., FILDES, P., LEDINGHAM, J. C. G. e WOLF, C. G. L. — 1923 — *Diphtheria Its bacteriology, pathology and immunology*. His Majesty's Stationer Office, London.
- BARRAT, M. M. — 1924 — 1925 — *Jour. Hyg.*, 23: 241.
- BERGEY — 1939 — *Manual of Determinative Bacteriology*, 5th. edition.
- DURAND, P. — 1920 — *Compt. Rendus. Soc. Biol.*, 83: 613.
- FROBISHER, M., Jr., — 1938 — *The Amer. Jour. Hyg.*, 28: 1.
- HAMILTON, A. e HORTON, J. — 1906 — *The Jour. Inf. Dis.*, 128.
- KNAPP, A. — 1904 — *Jour. Med. Res.*, 12: 475.
- LEHMAN-NEUMANN — 1896 — *Phililert, Manual of Bacteriology*.
- LEHMAN-NEUMANN — 1927 — *Bakteriologische Diagnostik*, 7 Auflage, II Band.
- MORSE, M. E. — 1912 — *Jour. Inf. Dis.*, 11: 253.
- MENTON, J. — 1923 — *Jour. Path. Bact.*, 35: 651.
- MORSE, M. — 1912 — *Jour. Inf. Dis.*, 11: 253.
- PARK WILLIAMS, e MANN — 1922 — *Jour. Immun.*, 7: 243.
- PERRY, WHITLEY, e BETRAN, E. — 1936 — *The Am. Jour. of Hyg.*, 23: 581.
- PESTANA, B. R., AMARAL, J. P. e BARRETO NETO — 1939 — *Memórias do Inst. Butantan*, 13:
- Medical Research Council — 1930 — *A System of Bacteriology in relation to Medicine*, vol. V.
- TOPLEY e WILSON — 1936 — *The Principles of Bacteriology and Immunity* — 2.^a ed., Baltimore.
- ZINSSER, H. — 1907-1908 — *Jour. Med. Res.*, 17: 89.

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS PATOGENICOS

(Prova da Plasmocoagulação)

HASSIB ASHCAR

Assistente do Diretor do Instituto Adolfo Lutz

EÇA PIRES DE MESQUITA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

- I — Importância da identificação dos estafilococos patogênicos.
- II — Métodos de identificação dos estafilococos patogênicos.
 - A — Morfologia.
 - B — Pigmentação.
 - C — Liquefação da gelatina.
 - D — Coagulação do leite.
 - E — Provas de fermentação.
 - F — Prova do ágar violeta.
 - G — Prova de aglutinação.
 - H — Prova de bacteriofagia.
 - I — Prova de hemólise.
 - J — Prova de inoculação em animais.
- III — Prova da Plasmocoagulação.
 - A — Generalidades — Importância.
 - B — Técnica:

1) Generalidades	} Germes Meios de cultura Plasma
2) Fatores que influem na prova	
3) Condições de prova	
4) Técnica adotada.	
 - C — Resultados obtidos.
- IV — Conclusões — Referências.

I — IMPORTANCIA DA IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS PATOGÊNICOS

A identificação dos estafilococos patogênicos tem preocupado muito os pesquisadores em virtude da frequente necessidade de se estabelecer se um dado estafilococo determinou ou é suscetível de determinar um processo patológico.

A solução de um problema dessa ordem, indubitavelmente, é de suma importância, quer sob o ponto de vista clínico, quer sob o aspecto higieno-sanitário, ou ainda mesmo quando se trata da classificação bacteriológica desses germes.

Em 1926, Daranyi ocupou-se do estudo dos estafilococos patogênicos com a intenção de separá-los dos não patogênicos. Achava este autor que os estafilococos provenientes do meio ambiente eram frequentemente incriminados como patogênicos, dado o descuido com que se aplicavam os processos de identificação. Sem dúvida alguma, após o isolamento de um estafilococo do sangue, líquido, urina, das lesões da pele e anexos e dos processos inflamatórios em geral, é necessário uma prova rigorosa de laboratório para o estabelecimento de sua ação patogênica.

Como sabemos, da confirmação ou não desta ação do germe, vai depender uma resolução terapêutica que, deixada de ser tomada a tempo, poderia comprometer a vida dum paciente.

Por outro lado, a ocorrência frequente de estafilococos em produtos alimentícios constitue um problema importante de saúde pública, em vista das intoxicações alimentares que esses germes podem determinar por meio de sua enterotoxina, conforme verificaram Slocum e Linden. No serviço rotineiro de controle bacteriológico de carnes, conservas, leite e seus derivados, doces, etc., contaminados por estafilococos, percebe-se a necessidade absoluta de uma prova específica, simples e rápida, para diferenciar os patogênicos dos não patogênicos. Numa prova dessa natureza, assim julgamos, deve residir o critério simples e científico, para aprovar ou condenar, sob o ponto de vista bacteriológico, qualquer produto alimentício contaminado por estafilococo.

Com relação à classificação desses germes, evidentemente é mais importante o critério de patogenicidade que o de pigmentação das culturas. Em realidade, na prática, mais interessa ao médico e ao sanitarista saber se um dado estafilococo é patogênico ou não, do que se é *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* ou *Staphylococcus epidermidis*.

phylococcus citreus, uma vez que os estafilococos brancos podem ser patogênicos, embora os dourados o sejam com mais frequência.

A pigmentação, que tem sido o critério geral de classificação, parece não ter tanta importância, admitindo-se que um *Staphylococcus aureus* possa, em dadas condições, perder seu pigmento dourado.

Como critério de classificação é preciso considerar, pelo menos, uma propriedade específica e constante do germe, parecendo servir, neste caso, a prova da plasmocoagulação que adiante estudaremos.

Considerando a especificidade, a constância e a simplicidade desta prova, Fairbrother dividiu os estafilococos em *Staphylococcus pyogenes* e *Staphylococcus saprophyticus*, chamando a atenção para o fato de Bergey, no seu manual de 1939, não ter ainda considerado tal prova na classificação dos estafilococos.

II — MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS PATOGÊNICOS

Numerosos têm sido os métodos propostos para a identificação dos estafilococos patogênicos. Vamos passar em revista os principais, para depois estudarmos, no capítulo seguinte, o método que mais nos interessa, o da plasmocoagulação.

A. — MORFOLOGIA

A morfologia dos estafilococos tem certa importância para a verificação da sua ação patogênica.

Bier, em 1932, chama a atenção para este fato, achando que a morfologia bacteriana muito orienta na distinção entre os estafilococos saprófitas e patogênicos.

Os primeiros, também por ele chamados de saprococos, são em geral do tipo g (grosseiro) ou do tipo m (médio), enquanto que os chamados piococos, são em geral do tipo d (delicado).

Refere este autor que em 30 saprococos da pele, 11 foram do tipo g, 16 do tipo m e 3 do tipo d.

A morfologia, como vemos, é um caráter simples, mas um tanto falho, dependendo, ainda, de um fator individual, a avaliação do tamanho e forma das células bacterianas.

B. — PIGMENTAÇÃO

Numerosos autores relacionam a ação patogênica do estafilococo à pigmentação dourada das colônias.

O caráter de pigmentação das colônias, podemos dizer, é falho, quando relacionado à ação patogênica ou não do estafilococo, nisto concordando a maioria dos autôres.

Já tocámos neste assunto, quando dissemos do seu relativo valor na classificação.

Kemkes, em 1928, estudando 42 amostras de estafilococos plasmocoagulantes, verificou que dêstes, 4 *S. albus* provinham de furúnculos e abscessos e 3 *S. citreus* provinham respectivamente de furúnculo, abscesso e sinusite.

Bier, em 1932, observou que a maioria das amostras patogênicas é cromogênica, pois, em 30 amostras patogênicas, 27 eram douradas e apenas 3 brancas, enquanto que em 33 saprófitas, 26 eram brancas.

Chapman e outros, em 1934, verificaram que a pigmentação dourada, a hemólise positiva e a presença da ação plasmocoagulante dão o caráter de patogenicidade.

Cruickshank, em 1937, observou que, relacionada à hemolisina, a ação plasmocoagulante está presente em raças patogênicas, quer do tipo dourado, quer do tipo branco. Verificou que em 120 raças de *S. aureus*, apenas uma não foi plasmocoagulante, mas, por outro lado, de 50 raças de *S. albus* 20 foram plasmocoagulantes.

Fairbrother, em 1940, concluiu que a pigmentação não deve ser considerada o suficiente para se afirmar que um estafilococo é ou não patogênico.

Em 1942, Dienst e Augusta, usando ágar leite a 10%, observaram boa pigmentação das culturas, verificando que somente 3 em 36 amostras plasmocoagulantes eram *S. albus*.

C. — LIQUEFAÇÃO DA GELATINA

Em 1926, Daranyi, experimentou a prova da liquefação da gelatina, terminando por abandonar o método, pois concluiu que não dava resultados satisfatórios.

Em 1932, Bier, citando Daranyi, discordou dêste último, pois, em 30 amostras patogênicas, 29 liquefizeram a gelatina.

Vários autôres concordam com os resultados de Daranyi e outros estão de acôrdo com os achados no sentido oposto.

Achamos que a prova da liquefação da gelatina, embora possa auxiliar na identificação dos estafilococos patogênicos, é uma prova relativamente demorada e cujos resultados dependem, também, da qualidade da gelatina usada.

D. — COAGULAÇÃO DO LEITE

Daranyi observou que a coagulação do leite é uma prova muito eficaz, pois, de 30 raças que coagularam o leite, 29 provinham de focos patológicos. A coagulação do leite, segundo Daranyi, se revela de 1 a 7 dias na estufa, a 37°, sendo que algumas raças patogênicas coagulam nos 3 primeiros dias, enquanto que raças isoladas do meio ambiente coagulam, em geral, ao 7.º dia.

Há, ainda, os estafilococos saprófitas que não coagulam o leite, como também, há os patogênicos, fortemente hemolíticos e não coagulantes do leite.

A esterilização do leite deve ser feita por tindalização e há necessidade de um tubo contrôle, para se ter a certeza de que o leite não coagulou por si só, por um defeito de esterilização.

Em 1932, Bier critica as conclusões de Daranyi, dizendo ser a prova de coagulação do leite má, entretanto, em 30 raças patogênicas por êle estudadas, verificou coagulação do leite em 25.

Em 1937, Cruickshank obteve com 40 raças patogênicas — 40 provas positivas para coagulação do leite, enquanto que, em 30 raças não patogênicas, 9 coagularam o leite.

Em nossas experiências obtivemos os seguintes resultados:

De 36 estafilococos patogênicos	$\left\{ \begin{array}{l} 29 \text{ coagularam o leite entre 2 e 7 dias} \\ 7 \text{ não coagularam o leite (culturas n.ºs} \\ \text{3-4-8-21-23-26-43)}. \end{array} \right.$
De 7 estafilococos não patogênicos	

Diante de tais resultados, podemos concluir que a prova de coagulação do leite, além de não específica para o estafilococo, não revela uma propriedade constante dos estafilococos patogênicos, bem como pode ser positiva para os não patogênicos.

E. — PROVAS DE FERMENTAÇÃO

Com relação à fermentação dos carboidratos pelos estafilococos patogênicos, a maioria dos autôres têm dado algum valor apenas à manita e à lactose.

Bier, em 1932, dá pequeno valor à fermentação da manita, como elemento de diferenciação entre estafilococos patogênicos e saprófitas. Verificou que os estafilococos não patogênicos podem fermentar a manita, embora os patogênicos a fermentem com maior frequência.

Em 1937, Cruickshank, fazendo prova de fermentação com a manita e com a lactose, obteve positividade com todas as amostras plasmocoagulantes. Verificou, por outro lado, em 30 raças saprófitas, 23 de poder fermentativo para aqueles carboidratos (12 para a lactose e 11 para a manita), sendo que de todas estas raças saprófitas, nenhuma foi plasmocoagulante.

Em 1940, Fairbrother, estudando a fermentação da manita, concluiu que os estafilococos patogênicos fermentam-na até 3 dias, enquanto que os saprófitas a fermentam tardiamente.

Em 1941, Chapmann e Berens, concluíram que raramente a plasmocoagulação positiva existe em amostra não hemolítica e não fermentativa para a manita.

Trabalhando com 36 raças patogênicas e 7 raças saprófitas, obtivemos os seguintes resultados:

das 36 raças patogênicas, todas fermentaram a manita;

das 7 raças não patogênicas	$\left\{ \begin{array}{l} 4 \text{ fermentaram a manita} \text{ — culturas n.}^{\text{os}} 30-36-38-40. \\ 3 \text{ não fermentaram} \end{array} \right.$

Com relação à lactose, os resultados foram:

das 36 raças patogênicas	$\left\{ \begin{array}{l} 33 \text{ fermentaram a lactose} \\ 3 \text{ não fermentaram — culturas n.}^{\text{os}} 12-14-31. \end{array} \right.$
das 7 raças não patogênicas	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \text{ não fermentaram a lactose} \\ 4 \text{ fermentaram — culturas n.}^{\text{os}} 30-36-38-39. \end{array} \right.$

Como vemos, embora a fermentação da manita e da lactose possa ser um índice de que a raça de estafilococo é patogênica, a fermentação pelas raças não patogênicas tira muito do valor da prova.

F. — PROVA DO ÁGAR-VIOLETA

Chapman e Berens estudaram esta prova, comparando-a com a da hemólise e a da plasmocoagulação.

Consiste ela em se obter cultura do estafilococo em ágar-proteose-peptona com cristal violeta a 1:300.000. Depois de estudarem a técnica da prova, concluíram que somente as colônias com franjeado violeta são patogênicas. Apresenta esta prova o inconveniente de não ser muito prática, necessitando meio especial que deve ser preparado na ocasião do uso.

G. — PROVA DE AGLUTINAÇÃO.

Noguchi e outros empregaram esta prova para diferenciação entre estafilococos patogênicos e não patogênicos.

Koch e Fisher, citados por Daranyi, também usaram esta prova, verificando resultados pouco nítidos, sendo os cocos piogênicos muitas vezes inaglutinaveis.

Em 1940, Fairbrother, referindo-se à técnica de aglutinação segundo Cowan (1939), diz ser tal prova de resultados falhos. Dados os maus resultados não nos utilizámos desta prova.

H. — PROVA DE BACTERIOFAGIA

Em 1932, Bier estudou a sensibilidade dos chamados piococos ao bacteriófago H de Gratia, concluindo ser ela uma prova relativamente falha. Em vista do pequeno resultado que tem demonstrado, não a experimentámos.

I. — PROVA DA HEMÓLISE

E' o processo mais antigo de identificação dos estafilococos patogênicos, achando os autôres que êstes devem ter o poder de lisar hemátias. A prova é feita em placas de ágar-sangue e a sua execução não é tão fácil como parece.

Já se tem discutido qual a concentração em que as hemátias devem ser adicionadas ao ágar, e Daranyi, que estudou bastante o assunto, chegou a uma conclusão que nos parece contraditória. Assim, o citado autor, criticando Schottmüller por ter empregado ágar sangue em uma concentração excessiva (5 cc. de ágar para 2 cc. de sangue humano), diz também que a concentração muito baixa, 1 a 2%, torna fácil a hemólise para qualquer germe saprófita. Conclue, entretanto, aconselhando que se use ágar-sangue a 1% (sangue de coelho), o que nos parece uma perfeita contradição; dá à prova de hemólise um valor secundário.

Em 1932, Bier fez também provas de hemólise para estudar os estafilococos, usando ágar-sangue a 10% (sangue de carneiro). Verificou que de 30 amostras provenientes de pus, 26 foram hemolíticas e que de 33 amostras de pele apenas duas produziram hemólise. Chapman e outros acharam que a prova de hemólise é insuficiente para se afirmar ou negar se um germe tem ou não ação patogênica.

Cruickshank recomenda que a prova de hemólise seja feita com hemátias lavadas, afim de se evitar a influência da imunidade do animal.

Fairbrother é de opinião que esta prova é má: saprófitas podem dar positiva, e patogênicos negativa. Aproveitando nosso material, experimentámos também êste método de identificação dos estafilococos patogênicos. Num primeiro ensaio, verificámos que a prova é mais sensível quando se usam hemátias lavadas de coelho, ao invés de hemátias de carneiro. Em placas de ágar sangue de coelho a 5%, o germe foi semeado com fio de platina, em estria, levado à estufa a 37° durante 24 horas, permanecendo à temperatura ambiente até completar 48 horas, sendo a leitura feita em mms de área de hemólise.

Nossos resultados foram os seguintes:

das 36 raças patogênicas, 35 eram hemolíticas e apenas uma única não determinou hemólise, cultura n.º 31, isolada de salsicha que havia determinado grave intoxicação alimentar (enterotoxina). As 7 raças saprófitas não determinaram o mais leve grau de hemólise.

J. — PROVA DE INOCULAÇÃO EM ANIMAIS

Daranyi, citando vários autôres, considerou as diferentes técnicas de inoculação (venosa, intramuscular, subcutânea, etc.), resolvendo usar a técnica de inocular subcutaneamente na face interna da coxa de coelho. Com êste método, diz ter obtido melhores resultados.

Kemkes usou o método de inoculação intraarticular e obteve, também, resultados satisfatórios.

Chapman e Berens usaram o método clássico de inoculação de 1 cc. de cultura em caldo de 24 horas, endovenosamente, e obtiveram resultados falhos.

Cruikshank, usando o mesmo método, verificou que de 40 raças patogênicas, apenas 21 causaram morte de coelhos (pouco mais de 50%).

Para uma primeira prova de inoculação, lançámos mão de 10 coelhos adultos nos quais inoculamos endovenosamente 1 cc. de cultura em caldo comum (24 hs. a 37°).

Empregámos 10 raças patogênicas e obtivemos a morte apenas de 3 coelhos.

Das 10 raças patogênicas	{	3 determinaram morte de coelhos — culturas n.ºs 5-6 e 37. 7 não mataram os coelhos — culturas n.ºs 3-4-7-33-34-35 e 41.
-----------------------------	---	--

Outras vias experimentadas deram resultados menos satisfatórios ainda (subcutânea, ocular, intradérmica, etc.).

Com estas mesmas raças patogênicas resolvemos inocular camondongos, intraperitonealmente, com a dose de 0,5 cc. de suspensão de estafilococos em solução fisiológica.

Os resultados são os seguintes:

Das 10 raças	}	4 determinaram morte de camondongos — n.ºs 4-6-7-37.
patogênicas		6 não determinaram a morte — n.ºs 3-5-33-34-35-41.

Concluimos, depois da comparação feita entre os resultados da prova da plasmocoagulação com os da prova de inoculação que:

1.º — a julgar pela origem da raça estudada, a prova de inoculação em coelhos foi falha 7 vezes em 10;

2.º — admitindo-se o contrário, isto é, que as raças de fato não sejam patogênicas, teríamos que concluir que prova alguma poderia servir à identificação dos estafilococos patogênicos, senão a de inoculação em animais, pois que plasmocoagulação, hemólise, fermentação de açúcares e coagulação de leite foram positivas nos casos em que a inoculação foi negativa;

3.º — pode-se admitir ainda que a prova de inoculação resulte positiva quando o animal for suscetível e quando a virulência da cultura não estiver atenuada. Possivelmente as 3 raças que mataram o coelho se encaixam nesta hipótese.

4.º — somos partidários, pois, da opinião de que a prova de inoculação para ser bem julgada, deverá ser feita com animais isentos de imunidade para o estafilococo, o que não é tão fácil de obter. Da sua pouca segurança, podemos concluir pelo fato de que numerosos autôres a têm estudado e não têm obtido bons resultados. Relembremos, por exemplo, Cruickshank, que, com 40 raças isoladas de focos patológicos, apenas pouco mais de 50% (21 raças) determinaram a morte de coelhos.

Contra a prova de inoculação, falam ainda as suas variantes de técnica, em grande número: prova de inoculação subcutânea; inoculação intramuscular; inoculação intraarticular; inoculação endovenosa; inoculação intradérmica, etc.

III — PROVA DA PLASMOCOAGULAÇÃO

A. — GENERALIDADES — IMPORTÂNCIA

A prova da plasmocoagulação, segundo a maioria dos autôres, foi descoberta por Hans Much, em 1908. Loeb, em 1903, havia estudado a influência de certas bactérias na coagulação do plasma,

N.º	culturas	do leite						CUCHO	CAMOUROGO
1	Sicose	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
2	Úlcera gástrica	Citrina	O.	-	-	-	-		
3	Sicose	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
4	Sicose	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
5	Hemocultura	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
6	Hemocultura	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	morte em 48 hs.
7	Hemocultura	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++	morte em 12 hs.	sobrevive
8	Furúnculo	Branca	O.	+	+	+++++	+++++	morte em 12 hs.	morte em 24 hs.
9	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	
10	Antraz	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
11	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
12	Antraz	Branca	C. P.	-	+	+++++	+++++		
13	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
14	Furúnculo	Dourada	C. P.	-	+	+++++	+++++		
15	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
16	Hemocultura	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
17	Urina	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
18	Garganta	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
19	Urina	Branca	C.	+	+	+++++	+++++		
20	Col. I. A. L.	Citrina	O.	-	-	-	-		
21	Furúnculo	Branca	O.	+	+	+++++	+++++		
22	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++		
23	Furúnculo	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
24	Furúnculo	Branca	C.	+	+	+++++	+++++		
25	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++		
26	Furúnculo	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
27	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++		
28	Garganta	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
29	Abcesso	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
30	Queijo	Branca	C. P.	+	+	-	-		
31	Salsicha	Dourada	C. P.	-	+	-	+++++		
32	Sinusite	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
33	I. Butantã (Wood 3)	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
34	I. Buiantã (Wood 46)	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
35	I. Butantã (Sc 24)	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
36	Salsicha	Branca	C.	+	+	-	-	sobrevive	sobrevive
37	Hemocultura	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++	morte em 24 hs.	morte em 48 hs.
38	Ambiente	Branca	C. P.	+	+	-	-		
39	Ambiente	Branca	C. P.	+	-	-	-		
40	Ambiente	Branca	O.	-	+	-	-		
41	Furúnculo	Branca	C.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
42	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
43	Furúnculo	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		

LEGENDA: C = coagulação.
P = peptonização.
O = ausência de coagulação.

concluindo que o *S. pyogenes aureus* tem ação específica na coagulação do plasma e que isto se dava possivelmente pela ação de um ênzima.

Fazendo justiça, achamos que a prova da plasmocoagulação não deve ser chamada prova de Much, mas sim prova de Loeb-Much.

Much estudou a prova e sua técnica, porém, não lhe deu importância como prova de identificação para estafilococos patogênicos e não citou o trabalho de Loeb.

Posteriormente, Daranyi estudou muito bem a prova, comparou-a com outras (coagulação do leite, hemólise, fermentação de açúcares) e concluiu que somente coagulavam o plasma, os estafilococos provenientes de processos supurativos.

Kemkes também concluiu que a plasmocoagulação tem grande valor na identificação dos estafilococos patogênicos. A seguir, vêm os trabalhos de Gratia e Vanbreuseghen, que estudaram mais sob o ponto de vista do mecanismo de ação. Finalmente, vêm os autores americanos que a têm estudado sob o ponto de vista técnico, Wallston, Neter e Chapman, e têm concluído como sendo a melhor prova para a identificação dos estafilococos patogênicos. Entre nós, Bier estudou-a e, comparando-a com as demais provas, concluiu que é a melhor.

Nós estudamos a prova de plasmocoagulação sob o ponto de vista de sua técnica e procuramos compará-la com outras provas.

B. — TÉCNICA

1 — *Generalidades*: As técnicas empregadas são várias mas os resultados referidos pelos seus autores são semelhantes. Alguns usam sangue total oxalatado, outros usam-no citratado. Os autores modernos usam, na maioria dos casos, o plasma citratado ou oxalatado, plasma puro ou diluído com solução fisiológica. Experimentámos a técnica do sangue total e verificámos que a leitura se torna mais difícil, não sendo nítida a formação do coágulo. Procurámos usar o plasma citratado e êste deu ótimos resultados, principalmente quando diluído a 1 : 5 em solução fisiológica.

2 — *Fatores que influem na prova*: 1.º — *Germes*. Segundo alguns autores, os germes mortos têm ainda poder coagulante, embora fraco. Verificámos que os germes mortos, centrifugados e lavados não têm ação coagulante sobre o plasma, sendo a substância plasmocoagulante uma substância elaborada pelo estafi-

lococo e dependente de sua atividade biológica. Por outro lado, após cultivo do germe em meio adequado, a substância pode agir mesmo após aquecimento a 60° durante meia hora, com a morte do germe, portanto (prova de esterilidade); foi o que obtivemos principalmente com culturas de 5 a 10 dias em estufa a 37°.

Com relação à idade das culturas de estafilococo, sabe-se que o ótimo é a cultura em caldo comum, 24 horas, a 37°. As culturas conservadas no laboratório podem dar a prova positiva mesmo após anos. Kemkes encontrou uma raça com plasmocoagulação positiva, mesmo após 10 anos de seu isolamento de um furúnculo. Usamos também culturas conservadas há mais de 10 anos no laboratório e os resultados foram positivos. Em nossas provas usamos cultura em caldo comum durante 24 horas a 37°, mas obtivemos o mesmo resultado quando a cultura em caldo ficou vários dias à temperatura ambiente, sendo que uma das culturas deu reação positiva mesmo com a idade de 8 meses.

A quantidade de germes, dentro de certos limites, não influe na positividade maior ou menor da prova. Segundo Fisk deve-se usar V gotas (medidas com pipeta de Pasteur) de uma cultura em caldo de 24 hs. a 37°. Com esta técnica obtivemos bons resultados.

2.º — *Meio de cultura.* Como a maior parte dos autôres, empregamos o caldo comum para a prova, semeando o germe na véspera, deixando na estufa a 37° e fazendo a prova no dia seguinte. O uso de caldo glicosado impede o fenômeno de coagulação segundo a maioria dos autôres, o que foi também por nós verificado.

3.º — *Plasma, sangue e anticoagulantes.* Usamos o plasma com melhores resultados, por permitir leitura mais fácil, dando coagulação bem nítida. O sangue total também pode ser usado. Empregamos como anticoagulante o citrato de sódio a 3,8% na proporção de 1 :5. Fizemos prova com plasma de vários animais e obtivemos resultados com todos êles, menos com o plasma de cachorro. Achamos que o plasma de coelho se presta muito bem à prova, podendo ser conservado em geladeira, devendo ser diluído na ocasião de ser usado. Usamos plasma com mais de 1 mês de geladeira e obtivemos sempre os mesmos resultados. Com plasma conservado em geladeira por 6 meses, os resultados já se tornam incertos.

3 — *Condições de prova:* Usamos tubos de hemólise comum. Fizemos também provas em lâminas com círculo de parafina colocadas no interior de placa de Petri. Os tubos não devem ser muito estreitos, pois isto pode, com o crescimento do germe em superfície,

acarretar aprisionamento do plasma e dar lugar a erros de interpretação (falsas reações). A temperatura ótima de prova parece ser 37°, sendo que a 18-20° a prova se fez quase que com o mesmo resultado. Em geladeira também fizemos a prova e obtivemos resultado positivo após vários dias.

O tempo ótimo de leitura está entre 2 e 4 horas e nisto também concordamos com a maioria dos autores. Uma prova positiva somente depois de 24 horas, deve ser repetida para confirmação. Uma das amostras, em tôdas as provas, constantemente deu positiva, após 3 horas de estufa. O aspecto do coágulo é claro no dia da prova e opaco no dia seguinte, em vista do crescimento dos germes. Num corte de coágulo foi verificado pelo Dr. João Montenegro, a presença de rede de fibrina e de germes no seu interior, porém em maior número na periferia.

4 — *Técnica adotada*: Semear a amostra em caldo comum e deixar em estufa a 37° de um dia para o outro. Colocar em tubos de hemólise 0,5 cc. de plasma citratado e diluído a 1:5 em solução fisiológica, mais 5 gotas de cultura de 24 horas (com pipeta de Pasteur). Levar à estufa e fazer leitura cada hora até 4 horas. Ler também após 24 horas de estufa.

O resultado é expresso em +++++, quando a coagulação for total; ++++, o coágulo ocupa 2/3 do conteúdo do tubo; ++, o coágulo ocupa a metade; +, o coágulo ocupa 1/3 do conteúdo; —, não há formação de coágulo.

C. — RESULTADOS OBTIDOS:

Empregando a técnica acima descrita, fizemos a prova da plasmocoagulação com todas as culturas estudadas.

As 36 raças patogênicas determinaram, sem exceção, coagulação do plasma citratado.

Com as culturas n.ºs 3 e 37 repetimos a prova de plasmocoagulação, respectivamente, 49 e 45 vezes, em ocasiões diferentes e obtivemos sempre resultados idênticos.

IV — CONCLUSÕES

1 — Na identificação dos estafilococos patogênicos, os critérios de morfologia, liquefação da gelatina e prova de aglutinação, indubitavelmente, são falhos.

2 — As provas de coagulação do leite e de fermentação da lactose não apresentam especificidade, sendo positivas tanto para raças patogênicas como saprófitas.

3 — A prova da manita parece ter valor apenas quando negativa, porque os estafilococos não fermentadores dêste álcool são saprófitas.

4 — A pigmentação tem valor relativo na diferenciação dos estafilococos patogênicos e saprófitas; é um caráter inespecífico e variável.

5 — A prova de inoculação em animais só tem valor quando o animal for sensível e não apresentar imunidade específica; a cultura, por sua vez, deverá ter virulência exaltada. Tais condições tornam a prova de prática difícil no serviço rotineiro.

6 — A prova de hemólise com hemátias lavadas de coelho é de alta especificidade e sensibilidade, constituindo ótimo método auxiliar na identificação dos estafilococos patogênicos.

7 — A plasmocoagulação nos parece a prova ideal na identificação dos estafilococos, dada a sua especificidade, sensibilidade e simplicidade de execução. É da mesma opinião a maioria dos autôres que a têm estudado. Pretendemos experimentá-la em maior escala, até que possamos obter número tal de observações, que nos permita conclusão sob o ponto de vista estatístico.

SUMMARY

1 — Morphological appearance, gelatin liquefaction and agglutination tests are not satisfactory criteria for the identification of pathogenic staphylococci.

2 — The coagulation of milk and lactose fermentation are not specific, showing positive results both for pathogenic strains as well as for the saprophytic ones.

3 — The mannitol test seems to be of value only in the negative case, as the staphylococci, which do not ferment this alcohol, are saprophytic.

4 — Of little value is the pigment production as a means of differentiating pathogenic from saprophytic strains of staphylococci, this pigmentation being a non-specific and variable biological feature.

5 — Animal inoculation is valuable provided susceptible animals showing no specific immunity and strains of staphylococci of increased virulence are used. These conditions make the application of the test difficult in routine work.

6 — Hemolysis of washed rabbit red blood-cells is of a high specificity and sensibility, being an excellent auxiliary method in the identification of the pathogenic staphylococci.

7 — The coagulation of plasma seems to be an ideal test for the identification of the pathogenic staphylococci because of its specificity, sensibility and the simplicity of its performance. Most authors who have studied this subject are of the same opinion. We intend to try this test in a larger scale until such a number of observations are obtained that will lead us to conclusions of the statistical standpoint of this subject.

AGRADECIMENTOS

Ao terminar, agradecemos a todos os que nos auxiliaram neste trabalho, principalmente ao Sr. Cassiodoro W. Moreno, que conosco colaborou com muita dedicação.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BIER, O. — 1932 — *Rev. da Ass. Paul. de Med.*, 1: 413.
- 2 — CHAPMAN, G. H. e outros — 1934 — *Jour. Bact.*, 28: 343.
- 3 — CHAPMAN, G. H. e outros — 1935 — *Jour. Bact.*, 29: 437.
- 4 — CHAPMAN, G. H. e outros — 1941 — *Jour. Bact.*, 41: 431.
- 5 — CRUICKSHANK, R. — 1937 — *Jour. Path. & Bact.*, 45: 295.
- 6 — DARANYI, J. V. — 1926 — *Cent. f. Bakt. Paras. u. Inf. Krank.*, 99: 74.
- 7 — DIENST, R. B. e AUGUSTA, G. — 1942 — *Jour. Lab. & Clin. Med.*, 27: 663.
- 8 — FAIRBROTHER, R. W. — 1940 — *Jour. Path. & Bact.*, 50: 83.
- 9 — FISK, A. — 1940 — *Brit. Jour. Exp. Path.*, 29: 311.
- 10 — KEMKES, B. — 1928 — *Cent. f. Bakt. Paras. u. Inf. Krank.*, 1.^a parte, 109: 11.
- 11 — LOEB, L. — 1903 — *The Jour. Med. Res.*, 10: 407.
- 12 — MUCH, H. — 1908 — *Biochem. Z.*, 14: 143.
- 13 — NETER, E. — 1937 — *Jour. Bact.*, 34: 243.
- 14 — SLOCUM, G. G. e LINDEM, B. A. — 1939 — *Am. Jour. Publ. Health*, 29: 1326.
- 15 — TOPLEY, W. W. C. e WILSON, G. S. — 1937 — *The Principles of Bacteriology and Immunity*, 2.^a ed., Baltimore.
- 16 — VANBREUSEGHEN, R. — 1934 — *C. R. Soc. Biol.*, 116: 650, 344.
- 17 — WALLSTON, D. — 1935 — *Jour. Hyg.*, 35: 549.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS PASTEURELAS

Grupo da septicemia hemorrágica dos animais. Espécie,
tipo: *P. avicida* (Gamaléia) Trevisan.

BRUNO RANGEL PESTANA

Chefe de subdivisão do Instituto Adolfo Lutz

ETTORE RUGAI

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

O agente etiológico do cólera aviário, descrito por Perroncito em 1878, Toussaint em 1879, foi isolado e estudado por Pasteur em 1881, que o denominou *Bacillus cholerae gallinarum*.

Kitt, (1885) estudando os germes da septicemia hemorrágica de várias espécies animais, considerou-os idênticos e denominou-os *Bacterium bipolare-multocidum*.

Hueppe (1886), fez a mesma constatação, propondo, porém, a denominação de *Bacterium septicaemiae-hemorragica*.

Trevisan (1887) criou para estes germes o gênero *Pasteurella*.

Lignières (1900) denominou pasteurelose à moléstia e estabeleceu também os caracteres culturais, bioquímicos e tintoriais dos germes. Êste autor reconheceu a existência de caracteres gerais semelhantes entre os germes isolados de várias espécies animais, mas quanto à ação patogênica, considerou-os específicos para a espécie animal hospedeira. Dividiu então os germes em 6 grupos: I — aves; II — porcos; III — carneiros; IV — bois; V — cavalos; VI — cães. Criou assim a classificação zoológica com inúmeras espécies, contrariamente a Kitt e Hueppe que só admitiam uma.

Matsuda (1910) pela fixação do complemento, usando soros preparados com duas inoculações apenas, verificou a existência de especificidade zoológica, confirmando, portanto, os trabalhos de Lignières.

Contra a escola pluralista de Lignières, surgiram logo Chamberland e Johan (1906) que, baseados na aglutinação e na patogenia contestaram os trabalhos daquele autor.

Tanaka (1926) não conseguiu diferenciar os germes por processos biológicos. Pela fixação do complemento e pela aglutinação concluiu que não há relação entre os germes e a espécie animal hospedeira. Admitiu, porém, a existência de grupos diferentes.

Cornelius (1929) estudou 26 amostras pela absorção de aglutininas. Dividiu 17 delas em 4 grupos. Para as 9 restantes não conseguiu classificação. Pela fixação do complemento verificou não existir relação com o animal de origem.

Yusef (1921) também pela absorção das aglutininas de 21 amostras estudadas conseguiu reunir 14 amostras em 3 grupos, nada conseguindo com as demais.

Nümi (1924), citado por Cornelius, considera a aglutinação cruzada muito complexa.

Roderick (1922), pela fixação do complemento admitiu dois grupos de germes: um constituído pelas amostras isoladas de bois e porcos e outro constituído pelas amostras isoladas de aves, carneiros, coelhos e cobaias.

Lal (1927), pela fixação do complemento em geladeira, conseguiu demonstrar certa relação entre o germe e o hospedeiro. A diferenciação é, porém, difícilíssima.

Frohböse (1926) estudou 50 amostras e concluiu que pela fermentação não é possível classificação alguma.

Morch e Korgh-Lund (1930) pela fermentação de várias substâncias, dividiu 140 amostras em 6 tipos, nos quais se incluíram indiferentemente raças de várias espécies animais. Rejeita a classificação de Lignières.

Rosenbusch e Merchant (1931), também pela fermentação de várias substâncias, contestam a existência de várias espécies, propondo a criação de uma única com a denominação de *P. multocidum* Kitt, 1885.

Khalifa (1936) pela fermentação da xilose, arabinose e manita, dividiu 49 amostras em 3 grupos: a) fermentador de arabinose e da manita, tôdas patogênicas para aves; b) fermentador da xilose; c) fermentador da xilose e manita. Estes dois grupos não são patogênicos para aves. Admite a existência de vários tipos mas não aceita a classificação zoológica.

Da literatura consultada, podemos deduzir que:

1.º — Pelas reações sorológicas — fixação de complemento, aglutinação e absorção de aglutininas — foi demonstrada a existência de grupos antigenicos diferentes, mas pouco nítidos para estabelecer uma classificação.

2.º — Os germes comportam-se diferentemente em face das seguintes substâncias: *d*-xylose, *l*-arabinose, *d*-manitol, dulcitol, maltose, trealose.

3.º — A classificação zoológica defendida por Lignières, não foi confirmada.

4.º — Não obstante o grande número de trabalhos realizados, a questão da classificação destes germes continua insolúvel. Os compêndios em geral adotam a classificação zoológica. O manual de Bergey (1939) registra 5 espécies; Haudoroy, 17; Zinsser e Bayne Jones, 5; K. Wassermann, 5; A System of Bacteriology, 9; Topley e Wilson, 6. Porém, nenhum desses autores ensina como diferenciar as espécies entre si, havendo mesmo espécies com propriedades bioquímicas idênticas. É que não temos nenhum método para isso. Além disso, a classificação zoológica é impraticável por ser infinita. Teríamos uma nova espécie para cada nova espécie animal infeccionada.

A literatura registra vários casos de infecções humanas produzidas por estes germes. A que espécies pertencem êles? Nas condições atuais não é possível responder, a não ser que se crie uma nova espécie: *P. homiseptica*. Método cômodo, sem dúvida, mas destituído de base científica.

Urge, portanto, que se preencha esta lacuna da sistemática.

É este o sentido da contribuição que trazemos.

Os nossos trabalhos obedecem à seguinte ordem:

- I — Relação das amostras empregadas;
- II — Classificação pela aglutinação;
- III — Classificação pela fixação do complemento;
- IV — Classificação pelas propriedades bioquímicas.

I — RELAÇÃO DAS AMOSTRAS EMPREGADAS:

Amostras	Pasteurella
127 — Manninger	Avis.
128 — Manninger	"
129 — Manninger	"
151 — Instituto Pasteur	"
1716 A — Instituto Biológico São Paulo	"
— — Instituto Biológico (Faz. B. Vista R. Preto) ...	"
114 — Instituto Biológico (isol. p/ Dr. Penha)	"
— — Recebida da Dra. J. P. do Amaral	"
2479 — N. C. T. C. orig. do Prof. Eber — Leipzig	"
1287 — Inst Lister N. C. T. C.	Bovis.
— — Instituto Biológico	"
— — Instituto Biológico (Leme)	"
6653 — Instituto Biológico (Pindamonhangaba)	"
124 — Instituto Oswaldo Cruz — col. Dr. G. Pacheco ..	"
1 — L. R. Leite (por interm. Dr. Vasconcelos)	"
2 — L. R. Leite (por interm. Dr. Vasconcelos)	"
— — Recebida da Dra. J. P. do Amaral	"
2484 — Instituto Lister	Cavis.
Pirie — Por interm. Inst. Biológico S. Paulo	Desmodilli.
322 — Inst. Adolfo Lutz (isol. de homem)	Homem.
1033 — Inst. Adolfo Lutz (isol. de homem)	"
1876 — Inst. Lister N. C. T. C.	Lepis.
2417 — Inst. Lister	"
0137 — Inst. Biológico	"
— — Recebida da Dra. J. P. do Amaal	"
491140 — Inst. Bact. Buenos Aires	Muris.
8 — Inst. Bact. Buenos Aires Ars. Naval	"
— — Inst. Oswaldo Cruz — col. Dr. G. Pacheco	Myocastori.
1875 — Inst. Lister N. C. T. C. (98368)	Suis.
931 — Inst Lister	"
Southerland — Inst. Lister	"
131 — Manninger	"
126 — Manninger	"
363 — Inst. Oswaldo Cruz — col. Dr. G. Pacheco	"
4 — L. R. Leite (Por interm. Dr. Vasconcelos)	"
5 — L. R. Leite (Por interm. Dr. Vasconcelos)	"
3 — L. R. Leite (Por interm. Dr. Vasconcelos)	"
6532 — I. Biológico	"

II — CLASSIFICAÇÃO PELA AGLUTINAÇÃO:

- a) aglutinação com germes vivos.
- b) aglutinação com germes aquecidos, 1 hr. a 100°.

O sôro aglutinante foi preparado com culturas de 24 hs., em ágar sangue. Inicialmente culturas mortas a 60°C., 1/2 hora, injetadas subcutâneamente e depois na veia. Finalmente inoculações endovenosas com germes vivos. Inoculações feitas cada 4 dias. Sangria no décimo dia após a última inoculação.

Conforme já foi verificado por vários autôres (Langener — 1941), há grande dificuldade para se obter soros com título elevado de aglutininas. Difícilmente alcançamos o título de 1:1.600 e, às vêzes, não superior a 1:200. Com a amostra 1.287, boviséptica, do Instituto Lister, não conseguimos mais do que 1:50 e isto, com vários coelhos. Esta amostra mostrou-se, depois, inaglutinável com todos os soros como pode-se verificar no Protocolo n.º 1.

As amostras produtoras de sôro foram as seguintes:

- 1.876, boviséptica, Instituto Lister.
Desmodilli, Pirie.
- 30.914, Myocastori — recebida do Dr. F. Almeida.
- 2.479, aviséptica — Eber, Leipzig.
- 8 — muriséptica — Ars. Naval — Inst. Bacteriológico de Buenos Aires.

- a) Aglutinação com germes vivos:

As aglutinações foram feitas a 37°C., 24 hs.. Ver protocolo n.º 1.

O resultado demonstra que não há relação entre os germes e a espécie animal hospedeira. Com o sôro da amostra boviséptica 1876, aglutinaram em título alto as amostras isoladas de homem, aves, porcos e ratos; enquanto que houve aglutinações em baixo título ou negativas com amostras bovisépticas. O mesmo comentário pode ser feito com os resultados dos demais soros. As amostras 1287 boviséptica, Instituto Lister; 6.532, suis, do Instituto Biológico de S. Paulo, foram inaglutináveis por todos os soros. Isto dificulta muito os estudos por meio de aglutinação.

Concluimos pois, que, pela aglutinação verificou-se que há diferença antigênica de uma amostra para outra, mas que esta diferença não é suficientemente clara para autorizar uma classificação, não sendo assim confirmada a classificação zoológica.

b) Classificação pela aglutinação com germes aquecidos 1 hora a 100°C..

Como não foi possível uma classificação pela aglutinação com germes vivos, repetimos as experiências com antígeno aquecido. Nessas condições, a aglutinação foi mais uniforme. As amostras inaglutináveis quando não aquecidas, foram tôdas aglutináveis. Os resultados, porém, foram em geral os mesmos obtidos com germes vivos. Por êste motivo, deixamos de apresentar o protocolo da experiência e o comentário.

III — FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

A fixação foi feita com os mesmos soros usados para a aglutinação. Antígeno preparado com germes mortos a 60°C., 1/2 hora. Como dose usámos a quantidade máxima não anticomplementar. Fixação de 1 1/2 hora a 37°C.. Sistema hemolítico anti-carneiro. Leitura feita no momento da hemólise total do tubo testemunha do antígeno. Como na aglutinação, os resultados foram muito complexos. Não foi possível, na sua base, estabelecer classificação alguma e tampouco confirmar a classificação zoológica. Também não apresentamos o protocolo da experiência por não oferecer interesse.

IV — CLASSIFICAÇÃO PELAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS

Como não conseguíssemos pela sorologia, constatar fatos que autorizassem conclusões seguras para reunir os germes em uma

única espécie, como querem alguns autores, ou dissociá-los, em várias espécies, como querem outros, orientámos as nossas pesquisas para as propriedades bioquímicas, base importante de classificação em bacteriologia.

Os substratos empregados foram os seguintes:

l-Arabinose, *d*-xilose, *d*-manitol, *d*-sorbitol, dulcitol, dextrose, *d*-manose, *d*-galactose, *d*-lactose, sacarose, maltose, trealose, dextrina, amido e salicina, marca Pfanstiehl.

Verificámos também a produção de indol, H₂S, crescimento em água de levedo, em batata natural e em leite tornasolado.

Para as provas de fermentação, empregámos o meio semi-sólido de Hiss, com 1% do substrato (Pfanstiehl) a estudar. Sulfo-fenol-ftaleína como indicador. Encubação de 15 dias.

Sendo as pasteurelas germes fracamente produtores de ácidos, é necessário preparar o meio com bastante cuidado, com pH não superior a 7,4 e sempre recentemente preparado. Sem estes cuidados pode haver discordância principalmente com *l*-arabinose que, além de tudo, constitue o elemento básico para a classificação que proporemos. Ver os resultados no protocolo n.º 2.

Nenhuma amostra fermentou a *d*-lactose, dextrina, dulcitol e amido. Tôdas as amostras fermentaram com ácido sem gás a dextrose, *d*-manose e *d*-sorbitol. Nenhuma amostra cresceu em batata natural e na água de levedo e nem alterou o leite tornasolado. Tôdas produziram indol e H₂S.

Foi variável a ação sobre a *l*-arabinose, *d*-xilose, trealose e maltose. Não observámos relação entre estas diferenças e a espécie animal hospedeira. Observa-se, porém, uma significativa relação entre a ação sobre a *l*-arabinose e a classe animal hospedeira. A trealose e a maltose não têm valor diferencial, A *d*-xilose ($[\alpha]_D = +18,5$) tem certo valor.

As amostras isoladas de aves fermentam com expressiva regularidade a *l*-arabinose, enquanto que as amostras isoladas de mamíferos não a fermentam. Fâto também digno de nota é que, quando há fermentação da *l*-arabinose, não há fermentação da *d*-xilose.

Em vários trabalhos publicados, a arabinose figura como carbohidrato infermentecível, tanto pelas amostras isoladas de aves, como pelas isoladas de mamíferos. Os autôres não fazem, porém, alusão à variedade ótica da arabinose, empregada. Levantamos aqui a

PROTOCOLO N.º 2

Propriedades bioquímicas das amostras estudadas

AMOSTRAS	Animal de origem	Características bioquímicas													
		i-arabinose	d-xilose	trealose	maltese	amido	dulcita	dextrina	d-galactose	d-manita	d-manose	d-sorbita	água de levedo	H ₂ S	indol
127 — Manninger	Avis.	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
128 — Manninger	"	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
129 — Manninger	"	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
151 — Instituto Pasteur	"	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
1716A — Instituto Biológico de São Paulo ..	"	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Instituto Biológico (Faz. B. Vista R. Preto)	"	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
114 — Instituto Biológico (isol. p/ Dr. Fehna)	"	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Receb. Dra. J. P. do Amaral	"	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
2479 — N. C. T. C. — org. Prof. Eber — Leipzig	"	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
1287 — Inst. Lister, N. C. T. C.	Bovis.	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Inst. Biológico	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Inst. Biológico (Leme)	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
6653 — Inst. Biológico (Pindamonhangaba) ..	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
124 — Inst. Osvaldo Cruz — col. Dr. G. Pacheco	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
1 — L. R. Leite (por interm. Dr. Vasconcelos)	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
2 — L. R. Leite (por interm. Dr. Vasconcelos)	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Receb. Dra. J. P. do Amaral	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
2484 — Inst. Lister	Cavis.	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Pirie — Por interm. Inst. Biológico S. Paulo	Desmodilli.	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
322 — Inst. Adolfo Lutz (Iso. de homem) ..	Homem.	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
1033 — Inst. Adolfo Lutz (Isol. de homem) ..	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
1876 — Inst. Lister, N. C. T. C.	Lepis.	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
2417 — Inst. Lister	"	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
0137 — Inst. Biológico	"	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Receb. Dra. J. P. do Amaral	"	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
491140 — Inst. Bact. Buenos Aires	Muris.	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
8 — Inst. Bact. Buenos Aires Ars. Naval ..	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Inst. Osvaldo Cruz — col. Dr. G. Pacheco	Micocastori.	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
1875 — Inst. Lister, N. C. T. C.	Suis.	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
931 — Inst. Lister	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
-- Sutherland — Inst. Lister	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
131 — Manninger	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
126 — Manninger	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
363 — Inst. Osvaldo Cruz — col. do Dr. G. Pacheco	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
4 — L. R. Leite (por interm. Dr. Vasconcelos)	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
5 — L. R. Leite (por interm. Dr. Vasconcelos)	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
3 — L. R. Leite (por interm. Dr. Vasconcelos)	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n
6532 — Inst. Biológico	"	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	n

LEGENDA: + = fermenta; — = não fermenta; n = neutro.

hipótese de que foi usada a *d*-arabinose em vez da *l*-arabinose. Os resultados são bem diferentes, conforme a variedade ótica usada. Ver a êste respeito o trabalho publicado por um de nós (E. R.), neste número da revista.

Dos nossos estudos, podemos dividir as pasteurelas em dois grupos:

- 1.º — Grupo da *l*-arabinose positiva;
- 2.º — Grupo da *l*-arabinose negativa.

As amostras por nós estudadas (9 originadas de aves e 31 de mamíferos) distribuem-se da seguinte maneira:

<i>l</i> -Arabinose positiva	{	8 das raças isoladas de aves	88,88%
		5 das raças isoladas de mamíferos	16,12%
<i>l</i> -Arabinose negativa	{	26 das raças isoladas de mamíferos	83,87%
		1 das raças isoladas de aves	11,11%

Se computarmos as raças estudadas por Khalifa (18 isoladas de aves e 31 de mamíferos) e as estudadas por Rosenbusch e Merchant (5 isoladas de aves e 39 de mamíferos) teremos:

KHALIFA:

Arabinose positiva	{	18 das isoladas de aves	100%
		1 das isoladas de mamíferos	3,22%
Arabinose negativa	{	30 das isoladas de mamíferos	96,78%
		0 das isoladas de aves	0%

ROSENBUSCH e MERCHANT:

Arabinose positiva	{	5 das isoladas de aves	100%
		11 das isoladas de mamíferos	28,20%
Arabinose negativa	{	28 das isoladas de mamíferos	71,80%
		0 das isoladas de aves	0%

Em conjunto, os estudos dêsses autôres e os nossos, teremos (32 cepas isoladas de aves e 96 de mamíferos):

<i>l</i> -Arabinose positiva	{	31 das isoladas de aves	96,88%
		17 das isoladas de mamíferos	17,70%
<i>l</i> -Arabinose negativa	{	79 das isoladas de mamíferos	82,30%
		1 das isoladas de aves	3,12%

Assim vemos que, das raças *isoladas de aves* 96,88% fermentaram a *l*-arabinose e sòmente 3,12% não fermentaram e que das

raças isoladas de mamíferos, 82,30% não fermentaram a *l*-arabinose, enquanto que 17,70% fermentaram.

Pelo exposto podemos concluir:

I — Existe uma relação estreita entre a fermentação da *l*-arabinose e a classe do animal hospedeiro do germe.

II — Em condições naturais as amostras fermentadoras da *l*-arabinose são patogênicas para os mamíferos, mas, principalmente para as aves.

III — Nas mesmas condições, as amostras não fermentadoras desse carboidrato são patogênicas para os mamíferos e raramente para as aves.

Possivelmente a diferença entre a temperatura normal das aves (42°C.) e a dos mamíferos (36°, 5 C.) explica o fato. As amostras fermentadoras da *l*-arabinose, que consideramos próprias das aves, podem com certa frequência (17,70%) segundo a estatística acima, infeccionar os mamíferos; enquanto que as amostras da *l*-arabinose negativa, que consideramos próprias dos mamíferos, infeccionam as aves, mas com frequência muito menor (3,12%) segundo a mesma estatística.

A passagem de um germe de um animal de temperatura elevada (aves) para um de temperatura mais baixa (mamíferos) é mais fácil do que o inverso.

Tipos de mutação e adaptação podem aparecer, mas o que não resta dúvida é que êstes grupos por nós estabelecidos, são constituídos por entidades de caracteres bioquímicos constantes.

Cabe aqui lembrar que Pasteur conseguiu, em 1878, infeccionar galinhas com o bacterídia do carbúnculo, abaixando-lhe a temperatura, pela imersão em água fria.

Finalmente, considerando que pela sorologia não se conseguiu preencher a lacuna que a sistemática apresenta com relação a esta bactéria;

considerando que a classificação zoológica não resistiu incólume às críticas;

considerando que quasi tôdas as classificações se baseiam nas propriedades bioquímicas e no habitat dos agentes infecciosos; e

considerando que existe uma relação estreita entre as propriedades bioquímicas e a classe do animal hospedeiro, pois vimos que das raças isoladas de aves 96,87% fermentaram a *l*-arabinose e somente 3,12% não fermentaram e que das raças isoladas de mamíferos 82,30% não fermentaram a *l*-arabinose, enquanto que 17,70% fermentaram:

Propomos reunir estes germes em duas únicas espécies dando, para o grupo das pasteurelas fermentadoras da *l*-arabinose a denominação de *Pasteurella gamaleiae* e para as que não fermentam a *l*-arabinose, o de *Pasteurella bollingeri*.

De conformidade com as regras internacionais de nomenclatura biológica estabelecidas, damos a denominação "gamaleiae" em substituição ao adjetivo "avicida" da espécie tipo, criado por Gamaléia, para as fermentadoras da *l*-arabinose; conservando-se a denominação *P. bollingeri*, para as não fermentadoras de *l*-arabinose, por ter sido esta a primeira pasteurela isolada de mamíferos (Kitt — 1885), assim denominada por Trevisan em homenagem a Bollinger, que fez os primeiros estudos sobre a septicemia hemorrágica dos bovinos.

Teremos então:

Gênero *Pasteurella* — Trevisan.

Bacilos Gram-negativos, ovóides, apresentando coloração bipolar com métodos especiais; aeróbio facultativo; requer baixo potencial oxi-redutor nas culturas primárias, capacidade fermentativa baixa; não fermenta a *d*-lactose; não produz gás; não liquefaz a gelatina; não coagula o leite; parasita o homem, outros mamíferos e aves.

Espécie tipo: *Pasteurella gamaleiae*; *Pasteurella avicida* (Gamaléia) Trevisan; (*Pasteurella aviseptica* (Kitt) Schütze).

CHAVE DAS ESPÉCIES DO GÊNERO PASTEURULA

I — Cresce em meios comuns; cresce em leite.

A. Imóvel, não flagelado a 18° — 26°C. Não altera, ou acidifica levemente o leite, sem coágulo.

1 — Produz indol e H₂S. Não cresce em bile. Fermenta a *d*-sorbita.

a) Fermenta a *l*-arabinose — 1. *Pasteurella gamaleiae*.

aa) Não fermenta a *l*-arabinose — 2. *Pasteurella bollingeri*.

2 — Não produz indol. Cresce em bile. Não fermenta a *d*-sorbita — 3. *Pasteurella pestis*.

B. Moveis, flagelados a 18° — 26°C. Alcaliniza o leite. Produz H₂S. Não produz indol — 4. *Pasteurella pseudotuberculosis*.

II — Não cresce em meios comuns; não cresce em leite — 5. *Pasteurella tularensis*.

RESUMO

Os A.A. revendo a literatura verificaram que não foi ainda apresentada uma classificação satisfatória para as Pasteurelas do grupo da Septicemia hemorrágica dos animais.

A classificação zoológica proposta por Lignières é impraticável, não resistindo à crítica e deve ser substituída por não haver relação entre a espécie animal hospedeira e as propriedades bioquímicas ou sorológicas dos germes isolados.

Verificaram que, antigênicamente, os germes apresentam diferenças que não são satisfatórias para permitir uma classificação.

Estudando as propriedades bioquímicas, verificaram existir uma relação entre a ação fermentativa da l-arabinose e a classe do animal hospedeiro. Das Pasteurelas isoladas de aves, 96,88% fermentavam a l-arabinose e somente 3,12% não fermentavam e, das isoladas de mamíferos, 82,30% não fermentavam a l-arabinose, enquanto que 17,7% fermentavam.

Baseados na fermentação da l-arabinose, propuseram reunir as pasteurelas do grupo da septicemia hemorrágica em duas únicas espécies: *Pasteurella gamaleiae*, para o grupo que fermenta a l-arabinose e *Pasteurella bollingeri*, para o grupo que não fermenta a l-arabinose.

Propõem a seguinte chave para o gênero *Pasteurella*:

GÊNERO PASTEURELLA — TREVISAN

Bacilos Gram-negativos, ovoides, apresentando coloração bipolar com métodos especiais; aeróbio facultativo; requer baixo potencial oxido-reduzidor nas culturas primárias, capacidade fermentativa baixa; não fermenta a d-lactose; não produz gás; não liquefaz a gelatina; não coagula o leite; parasita do homem, outros mamíferos e aves.

Espécie tipo: *Pasteurella gamaleiae*; *Pasteurella avicida* (Gamaleia) Trevisan (*Pasteurella aviséptica* (Kitt) Schütze).

CHAVE DAS ESPÉCIES DO GÊNERO PASTEURELLA:

I — Cresce em meios comuns; cresce em leite.

A. Imóvel, não flagelado, a 18°—26°C. Não altera ou acidifica levemente o leite sem coágulo.

1 — Produz indol. e H₂S. Não cresce em bile. Fermenta a d-sorbita.

a) Fermenta a l-arabinose — 1. *Pasteurella gamaleiae*.

aa) Não fermenta a l-arabinose — 2. *Pasteurella bollingeri*.

2 — Não produz indol. Cresce em bile. Não fermenta a d-sorbita —
3. *Pasteurella pestis*.

B. Móvel, flagelado a 18°—26°C. Alcaliniza o leite. Produz H₂S.
Não produz indol — 4. *Pasteurella pseudotuberculosis*.

II — Não cresce em meios comuns; não cresce em leite. — 5. *Pasteurella tuberculosis*.

ABSTRACT

On going the rough the literature the authors verified that there was not yet proposed a satisfactory classification for the *Pasteurella* of the hemorrhagic septicemia group of animals.

The zoological classification proposed by Lignières is impracticable, cannot resist the critics and ought to be substituted as there is no relation between the animal host and the biochemical or serological properties of the isolated germs.

It was observed that, with reference to the antigen, the germs show such differences which are not sufficient to establish a classification.

Studying the biochemical properties, the authors observed that there exists a relation between the fermentative action of the l-arabinose and the class of the host animals. Of the *Pasteurellae* isolated from fowl, 96,88% fermented the l-arabinose and only 3,12% did not ferment it and, from those isolated from mammals 82,50% did not ferment the l-arabinose, whilst 17,7% have fermented it.

Based on the fermentation test of the l-arabinose, the authors proposed to group the *Pasteurellae* responsible for the hemorrhagic septicemia in only two species: *Pasteurella gamaleiae*, for the group fermenting l-arabinose and *Pasteurella bollingeri* for the group which does not ferment the l-arabinose.

The following key was proposed for the genus *Pasteurella*:

Genus I. PASTEURELLA Trevisan

(*Octopsis* Trevisan, Atti della Accad. Fisio-Medico-Statistica, Milano, Ser. 4, 3, 1885, 102; Trevisan, Rendiconti Reale Istituto Lombardo di Scienze e Lettere, 1887, 94; *Coccobacillus* Gamaleia, Cent. F. Bakt., 4, 1888, 167; *Eucystia* Enderlein, Sitzber. Gesell. Naturf. Freunde, Berlin, 1917, 317.) Named for Louis Pasteur, the French scientist.

Small, Gram-negative, ovoid to elongated rods showing bipolar staining by special methods; aerobic, facultative; require low oxidation-reduction potential on primary isolation; powers of carbohydrate fermentation slight; no lactose fermentation; no gas production; gelatin not liquefied; milk not coagulated; parasitic on man, other mammals and birds.

The type species is: *Pasteurella gamaleiae* — *Pasteurella avicida* (Gamaleia) Trevisan (*Pasteurella aviseptica* (Kitt) Schütze).

KEY TO THE SPECIES OF GENUS PASTEURELLA

I — Growth on ordinary media; growth in milk.

A. Non-motile and non-flagellated at 18° to 26°C.. No change or slight acid in milk without clot.

1 — Indol and H₂S produced. No growth in bile. d-sorbitol fermented.

a) l-arabinose fermented — 1. *Pasteurella gamaleiae*.

aa) l-arabinose not fermented — 2. *Pasteurella bollingeri*.

2 — Neither indol nor H₂S produced. Growth in bile. d-sorbitol not fermented — 3. *Pasteurella pestis*.

B. Motile and flagellated at 18° to 26°C.. Milk alkaline. Hydrogen sulfide produced. Indol not produced. — 4. *Pasteurella pseudotuberculosis*.

II — No growth on ordinary media; no growth in milk. — 5. *Pasteurella tularensis*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos senhores:

Dr. Arlindo de Assis, Dr. Henrique F. de Vasconcellos, Dr. Floriano de Almeida, Dra. Jandyra P. do Amaral, Dr. José Carlos Ribas, Dr. Ariosto Büller Souto e Dr. Nelson Gioia Planet, pelas culturas de pasteurelas que nos enviaram.

BIBLIOGRAFIA

- CHAMBERLAND e JUAN — 1906 — *Ann. Inst. Pasteur*, 20: 81.
 CORNELIUS, J. T. — 1929 — *Jour. Path. Bact.*, 32: 355.
 FROHBÖSE, H. — 1926 — *Zent. f. Bakt.*, 100: 213.
 HUEPPE — 1886 — citado por ROSENBUSCH e MERCHANT.
 JONES, F. — 1921 — *Jour. Exp. Med.*, 34: 561.
 JONES, F. — 1921 — *Jour. Am. Ass.*, 60: 271.

- KITT — 1885 — citado por ROSENBUSCH e MERCHANT.
KHALIFA, I. A. — 1936 — *Vet. Bull.*, 6: 792.
LAL, R. B. — 1927 — *Am. Jour. Hyg.*, 7: 561.
LANGENER, P. H. — 1941 — *Jour. Immun.*, 40: 153.
LIGNIÈRES, J. M. — 1901 — *Ann. Inst. Pasteur*, 15: 734.
MATSUDA, T. — 1910 — *Zeit. f. Hyg. u. Inf.*, 66: 383.
MORCH, J. R. e KROGH-LUND, G. — 1930 — *C. R. Soc. Biol.*, 105: 319.
NÜMI, O. — 1924 — *Jour. Jap. Soc. Vet. Sci.*, 3: 309.
RODERICK, L. M. — 1922 — *Jour. Inf. Dis.*, 31: 313.
ROSENBUSCH, C. T. e MERCHANT, I. A. — 1939 — *Jour. Bact.*, 37: 69.
TANAKA, A. — 1926 — *Am. Jour. Inf. Dis.*, 38: 421.
YUSEF, H. S. — 1935 — *Jour. Path. Bact.*, 41: 203.

DA IMPORTÂNCIA DA VARIEDADE ÓTICA DOS SUBSTRATOS EMPREGADOS NA IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

ETTORE RUGAI

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

A identificação das bactérias por meio das suas propriedades bioquímicas constitui, atualmente, um método precioso e imprescindível em bacteriologia.

Referimo-nos, especialmente, à identificação pela ação das bactérias sobre hidratos de carbono, álcooes, etc., com produção de ácido ou gás nas reações positivas. É, sem dúvida, um método prático e de grande valor quando cercado dos devidos cuidados.

O objeto deste trabalho é demonstrar a influência exercida pela variedade ótica dos substratos, sobre a fermentação.

Consultando as obras e revistas de bacteriologia veremos que os autores, via de regra, não levam em consideração este fato. Na descrição das propriedades fermentativas das bactérias, não mencionam qual a variedade ótica dos substratos empregados.

Para exemplo, entre as substâncias mais empregadas em bacteriologia, citaremos a arabinose e a xilose, nas variedades óticas *d* e *l*.

Como veremos mais adiante, as bactérias não fermentam indiferentemente as duas variedades. Entretanto, estas pentoses são mencionadas, em geral, pelos bacteriologistas, sem alusão alguma às suas propriedades óticas. O manual de Bergey, uma das obras mais completas em classificação bacteriológica, é falho neste ponto. O mesmo podemos dizer dos compêndios de bacteriologia, em geral.

Possivelmente, esta omissão é uma das causas de divergência de resultados obtidos, às vezes, entre autores, em matéria de fermentação.

No protocolo abaixo, registramos os resultados que obtivemos com as variedades óticas *d* e *l* da arabinose e da xilose.

PROTOCOLO DAS FERMENTAÇÕES

AMOSTRAS EMPREGADAS		d-arabinose [α] D = -104,5 Pfanstiehl	d-arabinose [α] D = +104,5 Pfanstiehl	d-xilose [α] D = +18,5 Pfanstiehl	d-xilose [α] D = -18,5 Pfanstiehl
<i>E. typhosa</i>	Amostra 4.446 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 901-H — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 23 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 638 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 627 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosq</i>	Amostra 621 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosq</i>	Amostra 600 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosq</i>	Amostra 362 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosq</i>	Amostra 364 — Inst. Lister	—	—	—	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 601 — Inst. Lister	—	—	—	—
<i>E. typhosq</i>	Amostra 604 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 340 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 190 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 659 — Inst. Lister	—	+ 5 dias	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 657 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 656 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>E. typhosa</i>	Amostra 662 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>S. paratyphi</i>	de Kauffman	⊕ 10 dias	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 1 — deste Instituto	⊕ 5 "	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 2 — deste Instituto	⊕ 5 "	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 3 — deste Instituto	⊕ 5 "	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 4 — deste Instituto	⊕ 10 "	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 5 — deste Instituto	⊕ 5 "	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 6 — deste Instituto	±	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 7 — deste Instituto	⊕ 5 dias	⊕	—	—
<i>S. paratyphi</i>	N.º 8 — deste Instituto	⊕ 5 "	⊕	—	—
<i>S. schottmül.</i>	de Kauffman	⊕	⊕	⊕	⊕
<i>S. sp. Oslo</i>	(K 47) de Hormaeche	⊕ 5 dias	⊕	⊕	⊕
<i>S. enteritidis</i>	(K 64) de Hormaeche	⊕ 5 "	⊕	⊕	⊕
<i>S. sp. London</i>	(K 76) de Hormaeche	⊕ 5 "	⊕	⊕	⊕
<i>S. sp. Aberdeen</i>	(K 90) de Hormaeche	⊕ 5 "	⊕	⊕	⊕
<i>S. sp. Poana</i>	(K 91) de Hormaeche	⊕ 5 "	⊕	⊕	⊕
<i>S. sp. Hvittingfoss</i>	(K 95) de Hormaeche	—	+10 dias	+	—
<i>S. enteritidis</i>	Chicago — 535 — Am. T. C. C.	⊕ 5 dias	⊕	⊕	⊕
<i>S. enteritidis</i>	Chicago — 633 — Am. T. C. C.	⊕ 5 "	⊕	⊕	⊕
<i>S. enteritidis</i>	Chicago — 905 — Am. T. C. C.	⊕ 10 "	⊕	⊕	⊕
<i>S. paradysenteriae</i>	Amostra Willesden — Inst. Lister	—	+	—	—
<i>S. paradysenteriae</i>	Amostra Oxford — Flexner	—	+	—	—
<i>S. paradysenteriae</i>	Amostra 24 — deste Instituto	—	—	—	—
<i>S. paradysenteriae</i>	Amostra 710 — deste Instituto	+ 5 dias	+	—	—
<i>S. paradysenteriae</i>	Amostra 70 — deste Instituto	—	—	—	—
<i>S. paradysenteriae</i>	Amostra 645 — deste Instituto	—	—	—	—
<i>S. paradysenteriae</i>	Amostra Northampton 1934	—	—	—	—
<i>S. ambigua</i>	Amostra 21	—	—	—	—
<i>S. ambigua</i>	Amostra 23	—	—	—	—
<i>S. dysenteriae</i>	Amostra 49 — deste Instituto	—	—	—	—
<i>S. dysenteriae</i>	Amostra Parker — Inst. Lister	—	—	—	—
<i>S. sonnei</i>	Amostra N. C. T. C. 268 Thysotta	—	—	—	—
	Christ. 20	—	+	—	—

AMOSTRAS EMPREGADAS		<i>d</i> -arabinose [α] D = -104,5 Pfanstiehl	<i>l</i> -arabinose [α] D = +104,5 Pfanstiehl	<i>d</i> -xilose [α] D = +18,5 Pfanstiehl	<i>l</i> -xilose [α] D = -18,5 Pfanstiehl
<i>S. sonnei</i>	Amostra N. C. T. C. 2182 Allan ..	+ 5 dias	+	—	—
<i>S. a'kalescens</i>	Grupo A. — Dr. A. de Assis	+ 5 "	+	+	—
<i>S. a'kalescens</i>	Grupo B. — Dr. A. de Assis	+ 5 "	+	+	—
<i>S. a'kalescens</i>	Amostra 347 — deste Instituto	+ 5 "	+	+	—
<i>S. a'kalescens</i>	Amostra 363 — deste Instituto	+ 5 "	+	+	—
<i>S. a'kalescens</i>	Amostra 190 — deste Instituto	+ 5 "	+	+	—
<i>S. a'kalescens</i>	Amostra 504 — deste Instituto	+ 5 "	+	+	—
<i>S. a'kalescens</i>	Amostra 746 — deste Instituto	+ 5 "	+	+	—
<i>Pasteurella suis.</i>	Am. 6532 — Inst. Biológico	—	—	+	—
<i>Pasteurella bovis.</i>	Am. 1287 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>Pasteurella lepis.</i>	Am. 1876 — Inst. Lister	—	—	—	—
<i>Pasteurella suis.</i>	Am. 1875 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>Pasteurella avis.</i>	Am. 151 — Inst. Pasteur	—	—	+	—
<i>Pasteurella bovis.</i>	Am. Leme — Inst. Biológico	—	—	+	—
<i>Pasteurella suis.</i>	Am. 931 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>Pasteurella desmodilli.</i>	Am. Pirie	+	—	—	—
<i>Pasteurella bovis.</i>	Am. 6653 — Inst. Biológico	—	—	+	—
<i>Pasteurella lepis.</i>	Am. 0137 — Inst. Biológico	—	—	+	—
<i>Pasteurella suis.</i>	Am. Sutherland	—	—	+	—
<i>Pasteurella cavis.</i>	Am. 2484 — Inst. Lister	—	—	+	—
<i>Pasteurella muris.</i>	Am. 491148 — Inst. Bact. B. Aires ..	—	—	+	—
<i>Pasteurella avis.</i>	Am. env. pela Dra. J. P. Amaral ..	—	—	—	—
<i>Pasteurella avis.</i>	Am. 128 — Manninger	—	+	—	—
<i>Pasteurella avis.</i>	Am. 129 — Manninger	—	+	—	—
<i>Pasteurella avis.</i>	Am. Faz. B. Vista — Inst. Bio.	—	+	—	—
<i>Pasteurella avis.</i>	Am. 1716 — Inst. Biológico	—	+	—	—
<i>Pasteurella avis.</i>	Am. 114 — Dr. Penha	—	+	—	—
<i>Pasteurella suis.</i>	Am. 363 — Da col. Dr. G. Pacheco ..	—	+	—	—

LEGENDA: + = fermenta com produção de ácido; ⊕ = fermenta com produção de ácido e gás;
± = fermentação duvidosa; — = não fermenta.

Na fermentação com o bacilo tífico a *d* e *l* arabinose divergiram uma vez em 17 e com a *d* e *l* xilose divergiram 15 vèzes.

Com as salmonelas, a *d* e *l* arabinose divergiram duas vèzes em 19 e a *d* e *l* xilose 10 vèzes.

Com a *S. paradysenteriae* a *d* e *l* arabinose divergiram duas vèzes em 7 e a *d* e *l* xilose funcionaram da mesma maneira.

Com a *S. sonnei* a *d*-e *l* arabinose discordaram uma vez em duas e com a *d* e *l* xilose não houve discordância.

Com a *S. alkallescens* não houve discordância entre a *d* e *l* arabinose mas com a *d* e *l* xilose a divergência foi total.

Com as pasteurelas a *d* e *l* arabinose divergiram 8 vèzes em 20 e a *d* e *l* xilose divergiram 11 vèzes em 20.

Russo, (1939) em trabalho sôbre pasteurelas já verificou que a *d*-arabinose portava-se de maneira diferente da *l*-arabinose.

Além do exposto, podemos notar ainda que a fermentação da *d*-arabinose é sempre mais lenta, mais fraca e menos frequente, ao passo que a *l*-arabinose fermenta com mais rapidez, intensidade e frequência.

A *l*-xilose revelou-se infermentecível com tôdas as espécies ensaiadas, enquanto que a *d*-xilose fermentou com metade das amostras, aproximadamente.

Os sais de ácidos orgânicos também dão resultados diferentes, segundo o podêr rotatório. Os trabalhos de Brown, Duncan e Henry (1924) demonstraram claramente a diferença entre os ácidos *d* e *l*-tartárico, conforme pode-se ver no quadro que transcrevemos dos trabalhos dos referidos autores:

Organism and number of strains tested.	Trisodium citrate	Sodium <i>d</i> -tartrate	Sodium <i>l</i> -tartrate
5 — <i>B. paratyphosus</i> A	—	—	—
13 — <i>B. paratyphosus</i> B	+	—	+
11 — <i>B. paratyphosus</i> C	+	+	—
12 — <i>B. suispestifer</i>	+	+	—
10 — <i>B. Aertrycke</i> Mutton	+	+	+
2 — <i>B.</i> " Newport	+	+	+
2 — <i>B.</i> " Binns	+	+	+
2 — Type Stanley	+	+	+
1 — Type Reading	+	+	—
2 — Type "G"	+	+	—
2 — <i>B. Glässer</i>	—	—	—
2 — <i>B. Voldägsen</i> (Damman) ...	—	—	—
1 — <i>B. Voldägsen</i> (Wegener) ...	+	+	+

(+ = decomposition, — = no change)

A diferença entre as duas variedades do ácido tartárico é evidente e dispensa qualquer comentário.

Aliás, estes ensinamentos são bastante antigos, pois Pasteur já fazia, quando as pesquisas sôbre as propriedades ótica dos corpos ainda estavam no nascedouro, a separação dos ácidos *d* e *l*-tartárico entre sí, pela fermentação com o *Penicillium glaucum* que destrôe a forma *d* e respeita a *l*.

Pelos resultados obtidos podemos afirmar categoricamente que é imprescindível citar as variedades óticas dos substratos empregados para a determinação das propriedades bioquímicas das bactérias.

Não há dúvida que no comércio, por motivos vários, encontra-se quasi sempre uma só das variedades óticas das substâncias usadas em fermentação. Este fato constitue o bastião graças ao qual são afastadas, quasi totalmente, as possibilidades de enganos. Mas, é obra do acaso; não oferecendo garantia, não merece fé e não deve ser considerado convencional.

Nós já nos vimos na contingência de optar para uma ou outra das variedades *d* e *l* da xilose. Este fato nos embarçou e estimulou a publicação destas notas.

E' interessante notar, ainda, que a xilose natural, dextrógira, denominada por Fischer, *l*-xilose, é chamada *d*-xilose em grande número de publicações inglesas. (J. Schmidt — *Traité de chimie organique*, p. 318, nota 6).

RESUMO

Os autôres, em geral, quando falam em fermentações não se referem à variedade ótica dos substratos empregados na identificação das bactérias.

A fermentação da mesma substância varia conforme a sua variedade ótica.

A *d*-arabinose é menos fermentecível que a *l*-arabinose. A *l*-xilose ($[\alpha]_D = -18,5$) mostrou-se infermentecível com todos os germes ensaiados enquanto que a *d*-xilose ($[\alpha]_D = +18,5$) fermentou com grande número dêles.

Nas provas de fermentação, sempre que a substância empregada pode ser óticamente ativa, é necessário mencionar qual a variedade empregada.

SUMMARY

The authors, as a rule, when speaking of fermentation, do not record the optical property of the substrate used for bacterial identification.

The fermentation of the same substance varies in accordance with its optical activity.

The *d*-arabinose is less prone to fermentation than the *l*-arabinose. No fermentation at all was produced in the *l*-xylose ($[\alpha]_D = -18,5$) by the bacterial strains tested, whilst about half of them set up fermentation in the *d*-xylose ($[\alpha]_D = +18,5$).

Whenever the substance used for fermentation test is optically active, it is necessary to record, which is the optical variety used.

BIBLIOGRAFIA

- BROWN, H. C., DUNCAN, J. T. e HENRY, T. A. — 1924 — *Jour. Inf. Dis.*, 13: 1.
RUSSO, E. 1939 — *O Hospital*, 16: 57.

ANAERÓBIOS EM INFECÇÕES DE FERIDAS

CELSO RODRIGUES

do Instituto Biológico de São Paulo

ARIOSTO BÜLLER SOUTO

do Instituto Adolfo Lutz

Entre os graves acidentes das feridas, se colocam as infecções por microorganismos anaeróbios patogênicos.

Estão registadas nos anais da medicina militar, as enormes devastações entre os exércitos em luta, produzidas pela infecção das feridas por germes do tétano e da gangrena gasosa, nos séculos 18 e 19.

Com o advento de Pasteur e de Lister, todos os esforços foram dirigidos para serem obtidos processos destinados a combater os microorganismos de infecção das feridas.

Os métodos de tratamento visavam, quase exclusivamente, os germes de contaminação; os problemas da defesa dos tecidos, de higiene e de medicina preventiva, foram relegados a planos secundários.

A guerra de 1914 veio evidenciar novos aspectos de infecções das feridas. Prejulgava-se que o aperfeiçoamento da técnica cirúrgica e a introdução da esterilização sistemática haviam imposto a certas infecções das feridas, um caráter de raridade. O desenvolvimento de batalhas em terrenos cultivados e adubados e, em épocas frias e úmidas, o uso de roupas de lã, a fisionomia particular que tomou a guerra de posição, contribuíram para o aparecimento de infecções julgadas raríssimas: a gangrena gasosa e o tétano fizeram seu dramático reaparecimento nos ferimentos.

Os médicos militares foram tomados de surpresa. A mortalidade por essas infecções anaeróbias assumiu tal relêvo que parecia haver retornado o período anterior a Lister.

A questão pois, não se resumia só na técnica cirúrgica apurada, na remoção dos focos gangrenados e no uso de antissépticos adequados; era necessário também cuidar dos tecidos vizinhos e, sobretudo, do estado geral do paciente; além da remoção dos tecidos com-

prometidos, deviam ser tomadas medidas adequadas, destinadas a combater o choque, o frio, a fadiga e as hemorragias; sem estes cuidados estaria perdido todo o esforço empregado no tratamento das feridas de guerra.

Demonstraram ser medidas de grande alcance, o estabelecimento de postos avançados de socorro, a limpeza pronta da ferida, a excisão rápida das partes afetadas, a sutura precoce ou retardada, e o uso de soros específicos. Revelou-se impossível e desinfecção rápida e total das infecções depois de estabelecidas, porque as bactérias não poderiam ser removidas nem mecânicamente pela excisão, nem quimicamente, com antissépticos fortes. Três orientações distintas se mostraram vantajosas:

- a) no exército francês, a combinação da drenagem livre, o curativo absorvente abundante e a imobilização no aparelho gessado;
- b) a técnica preconizada por Carrel, da irrigação intermitente com soluções de hipoclorito de sódio;
- c) no exército inglês, os "linfagogos", sob a forma de soluções hipertônicas de cloreto de sódio e sulfato de magnésio.

Era comum a todos estes métodos a insistência da drenagem perfeita e, da imobilização, tão rígida quanto possível na sua execução. Além disso, cuidadosa hemostasia, reconstituição dos planos no fim da operação com perfeita obliteração de grandes espaços mortos e uso de material de sutura de calibre mais fino, mostraram também utilidade como fatores de melhor afrontamento e de coaptação mais perfeita dos bordos das feridas, condições promotoras de cicatrização mais consistente e por primeira intenção.

Caracterizou-es o período de após guerra pelo interesse que tomou o cirurgião pelo cosmos bacteriano e, pela influência dêste na evolução das feridas. Com o contínuo progresso da bacteriologia foi verificado que espécies bacterianas tidas e havidas como altamente temíveis, só eram na realidade patogênicas quando concomitantemente presentes os germes de associação. O sinergismo microbiano dêstes germes de associação era seguido pelo efeito coadjuvante das espécies em simbiose, fator importante para o estabelecimento das gangrenas pútridas.

A guerra civil da Espanha, trouxe como novidade o tratamento gessado oclusivo da feridas. O cirurgião espanhol Trueta (1939) obteve bons resultados em 976 casos, registando somente 6 mortes.

em um total de 1.073 casos tratados. Conforme acentuou posteriormente Trueta (1942), esta proporção de recuperados deveria ser, em grande parte, atribuída ao virtual desaparecimento da gangrena gasosa e ao extraordinário bem estar que êsse tratamento proporcionava aos feridos. A combinação da excisão completa e precoce, da drenagem livre e da imobilização gessada oclusiva, foram os fatores do grande sucesso da técnica espanhola.

* * *

Novos e importantes problemas estão se apresentando na guerra atual, sobressaindo entre outros, o aspecto particular da guerra aérea que, transformou tôdas as zonas da retaguarda e do interior, em outros tantos "fronts" de batalha, conseqüente ao bombardeio indiscriminado das populações civis.

O perigo das infecções de feridas por germes anaeróbios nas campanhas atuais, parece estar diminuído. A vacinação profilática antitetânica, os progressos da técnica cirúrgica, os aperfeiçoamentos introduzidos no preparo de soros específicos, a dosagem mais rigorosa dêsses soros, conforme padrões internacionais, o uso local e geral das sulfanilamidas, o atencioso cuidado com o estado geral do paciente, concorreram fundamentalmente, para o evento. E' necessário, porém, não perder de vista que o problema não é idêntico em tôdas as regiões. Com efeito, com exceção da campanha da Rússia, a "Campanha do Pacífico Sul" se processa em regiões pouco propícias às infecções pelos anaeróbios. A "Campanha do Norte da África" se desenvolveu quase tôda em terrenos pobres de germes anaeróbios. Ogilvie (1941), já havia verificado a raridade da gangrena na África do norte, principalmente no Egito. As areias tórridas predominantes nestas regiões, não oferecem condições propícias à sobrevivência quer das bactérias anaeróbias, quer dos seus esporos. O exame dos solos das regiões de *El Daba* e de *Benghazi* (inclusive a Depressão de *Quattara*) para a procura de esporos do tétano, deu resultados positivos em 8,8% das amostras examinadas. Entre *El Daba* e *Tobruk*, região mais deserta, o tétano foi verificado três vêzes em 60 amostras de terras examinadas. Nas terras mais férteis e mais cultivadas do Oeste de *Tobruk*, Boyd e MacLennan (1942) verificaram a presença de 16,4% ou seja, em 5 das 31 amostras examinadas. Tôdas as amostras de *Clostridium tetani* isoladas, demonstraram poder toxigênico.

Não obstante a relativa raridade do bacilo do tétano nesses solos, êle foi assinalado em 18 casos ou seja, 8,4%. Em um hospi-

tal, de janeiro de 1941 a julho de 1942, em 494 casos examinados, uma ou mais espécies de bacilos anaeróbios foram assinalados em 66, sendo que em 20 casos foram vistos anaeróbios com esporos terminais.

Mas, se no Norte da África o problema da gangrena gasosa não tem sido motivo de grandes preocupações, é de supor e prever que o desenvolvimento da campanha em campos de batalha onde o solo seja mais intensamente cultivado e adubado com excretas animais, ricos de esporos de anaeróbios, resulte numa frequência muito maior das gangrenas gasosas e do tétano.

Assim, o exame do solo em 193 zonas de guerra, feito na Europa por Zeissler e Rasfeld (1928), na guerra de 1914, demonstrou que o *Clostridium Welchii* estava presente em 100% desses solos, o *Clostridium septicum* em 8%, o *Clostridium Novyi* em 64%, o *Clostridium histolyticum* em 2% e o *Clostridium tetani* em 27%. Embora um terço das amostras de *Clostridium Novyi* se tenha revelado não patogênicas para os animais de prova, 100% das amostras de *Clostridium Welchii* isoladas desses mesmos solos se revelaram patogênicas. Na Inglaterra, o exame feito por Fildes (1929) em amostras de terras provenientes de campos cultivados, demonstrou a presença de *Clostridium tetani* em 57 das 79 amostras examinadas. É, pois, admissível que a gangrena gasosa venha a constituir ainda um problema e devemos estar preparados para ir ao seu encontro.

O problema da gangrena gasosa acha-se estreitamente condicionado ao tempo decorrido entre o momento em que se produziu a ferida e o socorro prestado ao ferido. Em apôio a êste ponto de vista, tem três exemplos recentes: 1.º) a campanha da Polônia; 2.º) o ataque a Pearl Harbour; e 3.º) a campanha da Rússia.

Na "Campanha da Polônia" a gangrena foi bastante frequente. Lâwen (1942) atribuiu êste fato à extrema mobilidade da guerra motorizada, tornando difícil o tratamento dos feridos pelo deslocamento rápido das tropas. As amputações, por esta razão, foram muito frequentes na campanha polonesa.

No ataque a Pearl Harbour, devido ao perfeito socorro aos feridos, a mortalidade "post" operatória não foi além de 3,8%. Moorhead (1942) verificou graças às medidas tomadas "the almost complete prevention of suppuration and the absence of deaths from gas gangrene".

Finalmente, na "Campanha da Rússia", embora a proporção dos soldados gravemente feridos seja mais elevada do que na guerra

passada, o número de mortos é muito menor e, sobretudo, o número de "recuperados" é incomparavelmente maior. Isto se deve ao estabelecimento dos hospitais de campanha completamente aparelhados, junto às linhas de combate. Esses hospitais deslocam-se paralelamente a essas linhas. Assim, as intervenções cirúrgicas muito precoces, concorrem tanto para o grande decréscimo da mortalidade baixado a 1,1%, como para a elevada recuperação dos feridos, que atingiu a incrível proporção de 73%. Embora a maior força viva dos projetís e a constituição mais complexa dos novos meios de destruição, causando muito maior número de fraturas e de ferimentos nos membros, a proporção de amputações na frente russa foi reduzida de um terço em relação às estatísticas da guerra de 14-18. De 18% de amputações naquela época, passou atualmente para 6%.

As técnicas cirúrgicas adequadas e o socorro precoce, prevenindo as complicações gangrenosas, concorreram de maneira substancial e evidente, para o resultado alcançado pelos médicos russos.

* * *

E' de se admitir a existência de alguns outros possíveis fatores de infecção anaeróbia, além da terra. Entre esses fatores, alguns investigadores têm lembrado a possibilidade das roupas de lã poderem ser as promotoras de maior frequência dos casos de gangrena.

Foi Maes (1940) quem aventou a teoria de que o vestuário de lã poderia ser considerado como uma das causas de infecção gangrenosa e não o solo, tendo em conta a maior frequência dos casos de gangrena gasosa em estação úmida e fria. Em apóio de sua teoria lembrou êle, que, na guerra ítalo-etíope, onde os soldados usavam roupas de algodão, a gangrena gasosa quase não foi registada. Para confirmação da sua teoria refere que Wall (1939) observou, em relação à atual luta sino-nipônica, que não existe solo mais intensamente cultivado que o delta do *Yang-tse*, sôbre o qual está situada Shangai; comparativamente, poucos casos de gangrena gasosa foram observados nos feridos em combates naquela região. Somos de opinião que, nem a campanha ítalo-etíope, nem o conflito da China apresentaram condições muito favoráveis ao desenvolvimento da gangrena. Pensamos que esta teoria requer documentação mais abundante.

* * *

A gangrena gasosa evolue rapidamente e se manifesta em geral, dentro das primeiras horas ou dos primeiros dias, raramente após o 7.º dia seguinte ao ferimento; ao contrário, justamente, do que ocorre na infecção tetânica, onde o período de incubação varia entre 3 e 21 dias, dependendo do local do ferimento e da inoculação preventiva do sôro, podendo o período de incubação se prolongar por tempo muito maior em casos análogos.

Os germes da gangrena gasosa são eminentemente toxigênicos; a intoxicação, é um dos sintomas dominantes porém a pululação microbiana, sempre muito ativa, desempenha também papel importante.

E' pois, indispensável que os soros antigangrenosos usados para a profilaxia e para o tratamento dessas infecções que evoluem tão rapidamente, sejam, além de antitóxicos, também antimicrobianos.

Os ingleses (1923), usando profilaticamente a antitoxina do *Welchii* associada à antitoxina tetânica, conseguiram sensível diminuição de incidência da gangrena gasosa, fazendo cair com isso a mortalidade de 50%.

No Chile, no terremoto de janeiro de 1939, a soroterapia anti-gangeronsa foi sistematicamente aplicada aos socorridos, em grandes doses e por via venosa, depois de 24 e 36 horas do acidente, produzindo essa prática, excelentes resultados.

Zonas de "barragem" pelo sôro específico, ao redor da área atingida, são auxílio de grande alcance no tratamento da gangrena; no combate do choque secundário que facilita a evolução da gangrena gasosa, são recomendadas ainda a transfusão de sangue total e do plasma (Nota A).

Devendo os soros antigangrenosos ser também polivalentes, condição imposta pela etiologia polimorfa da doença, seu preparo é forçosamente influenciado pela fisionomia da guerra, através de sua correlação com o quadro etiológico.

Na guerra de movimento o *Clostridium Welchii* é o germe preponderante, ao passo que, na guerra de estabilização a flora se torna mais complicada, com predominância ora de um, ora de outro, ora de vários dentre os germes anaeróbios de contaminação como o

NOTA A — Em virtude dos inconvenientes que o uso do plasma acarreta, estão sendo ativamente procurados substitutos para este; substâncias não tóxicas, obtidas da adequada digestão de proteínas e associados aminoácidos, muito prometem neste sentido, em razão de sua estabilidade, concentração, uso fácil e ausência de efeitos tóxicos. A plasmofereze, colocando o animal de experiência em condições de hipoproteinemia, tem permitido realizar observações sobre o uso das misturas de aminoácidos. Estas observações talvez venham a ter aplicação no tratamento do choque secundário, conseqüente a gangrena gasosa, onde o metabolismo do nitrogênio se encontra alterado.

Clostridium septicum, *Clostridium Novyi*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium sporogenes*, aliados à rica flora anaeróbia de invasão secundária. Além dêles, inclue-se o *Clostridium tetani*, frequente também no solo e cuja significação particular todos conhecem. Poderão surgir como coadjuvantes da infecção gangrenosa, bactérias como o *Streptococcus pyogenes*, o *Staphylococcus aureus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* e outras, que exercem influência não pequena na evolução das infecções das feridas.

Em consequência dêstes fatos, importante aspecto deve ser levado em consideração no preparo dos soros antigangrenosos polivalentes e de estoque: é o exame da frequência ou o percentual dos germes responsáveis pelas infecções das feridas, da relativa significação dos anaeróbios na flora dos ferimentos complicados de gangrenas gasosa. Numerosas observações procedidas em diferentes sectores de luta, em guerras anteriores, têm verificado que o *Clostridium Welchii* está presente em 60 a 80% dos casos examinados, o *Clostridium septicum* em 15 a 30%, o *Clostridium Novyi* em 5 a 35% e o *Clostridium histolyticum* em 2%.

O *Clostridium Novyi* é sobretudo toxigênico; o *Clostridium Welchii* é mais toxigênico do que invasivo, enquanto que o *Clostridium septicum* é igualmente toxigênico e invasivo. Assim, o *Clostridium septicum* poderá ser encontrado no sangue de pacientes, durante a evolução do processo gangrenoso, ao passo que a invasão do sangue pelo *Clostridium Welchii* só ocorre no período final, embora possam ocorrer bacteriemias temporárias.

Difere, fundamentalmente, a êsse respeito, a gangrena gasosa dos ferimentos de guerra ou de acidente, das septicemias de *Clostridium Welchii*, que se desenvolvem nas infecções puerperais. Com efeito, nestas infecções causadas pelo *Clostridium Welchii*, de acôrdo com o especificado por um de nós (Souto — 1942): “As condições do útero após o parto ou o abôrto são favoráveis ao desencadeamento da infecção. Um foco local ou muscular pode semear continuamente grandes quantidades de germes nos plexos venosos, os quais, dilatados, acarretam focos metastáticos no fígado e em outros órgãos”. A presença do *Clostridium Welchii* no sangue e a hemólise intravascular são sintomas demonstrativos da invasão por aquele germe.

Na infecção puerperal por *Clostridium Welchii* “A icterícia é um dos sintomas típicos” e precoces do estado mórbido, ao passo que, na gangrena gasosa, de outros órgãos, a icterícia só aparece

tardamente, nos períodos finais do processo infeccioso, no estado pré-agônico.

Outro fato importante a considerar é a particularidade de serem os germes de infecção inicial da gangrena gasosa pouco proteolíticos, sendo a maior parte da destruição dos tecidos e digestão, seguintes à infiltração gasosa e ao edema, devidas a comensais proteolíticos dos quais o mais frequente e ativo é o *Clostridium sporogenes*.

A questão da dosagem terapêutica do sôro antigangrenoso, depende da natureza da infecção. Doses maiores deverão ser empregadas no tratamento de feridos, socorridos tardiamente, com intervalos grandes de tempo. Estas doses deverão ser maiores do que as doses empregadas no tratamento de pacientes, nos casos de infecção puerperal anaeróbia. As doses de 7.500 unidades para o *Clostridium Welchii*, de 4.000 unidades para o *Clostridium septicum*, de 2.500 unidades para o *Clostridium novyi* e de 1.000 unidades para o *Clostridium histolyticum*, parecem ser satisfatórias no tratamento profilático dos feridos e acidentados. Nos casos de diagnóstico firmado, o tratamento curativo deverá comportar doses 4 a 5 vezes maiores do que essas.

Cabe aqui um reparo ao método usual de mistura dos soros antigangrenosos monovalentes para preparação dos soros polivalentes. A técnica normalmente seguida, consiste em agrupar quantidades de antitoxinas relacionadas à frequência percentual das diversas espécies de anaeróbios existentes na região onde se contamina o ferido, esperando-se desta forma simplista usar uma arma igualmente eficiente contra qualquer gangrena aí surgida.

Num local em cuja flora predomina o *Clostridium Welchii*, predominam gangrenas por *Clostridium Welchii*. Onde predomina o *Clostridium septicum*, teremos em maioria gangrenas por *Clostridium septicum*. Nos casos de gangrena de etiologia mista, todos os agentes etiológicos terão, possivelmente, a mesma influência, independentemente de sua presença original na substância contaminante. Acresce que poderemos ter, naturalmente, gangrena monotípica e por *Clostridium septicum* ou por *Clostridium Novyi*, em zonas de predominância do *Clostridium Welchii*, desde que os outros anaeróbios estejam presentes, embora se mostrem raros na substância contaminante que entrou em contacto com a ferida.

Torna-se evidente a necessidade de criar com a sôro prevenção, uma proteção passiva igualmente efetiva contra os componentes da flora de gangrena da região, independente de sua proporcionalida-

de. E para que o tratamento seja de fato eficiente e econômico há necessidade da determinação prévia das espécies de significância etiológica existentes na região onde há possibilidade de luta, como se faz durante as guerras atuais.

Petrie e Steabben (1943) descreveram um método que permite um diagnóstico bastante precoce dos *Clostridia* patogênicos produtores da gangrena gasosa. Baseia-se o método no crescimento da sementeira feita em ágar-sôro-específico. Este método já havia sido utilizado por Petrie como "test" diferencial para o meningococo, pneumococo e bacilo disentérico de Shiga, e, parece ser também eficiente para o bacilo diftérico. Os resultados obtidos são a formação dos anéis de Liesegang, muito característicos, nos placas de culturas em tórno das colônias dos germes correspondentes dos soros onde se formam. Talvez o método venha permitir o uso das antitoxinas monovalentes pelo emprêgo precoce de sôro homólogo curativamente.

* * *

Na guerra de 1914-1918 a antitoxina tetânica reduziu a incidência do tétano de 9 por mil em 1914 a menos de 1 por mil em 1915, e abaixou a mortalidade dos casos de 53,3% para 22,6%. A antitoxina tetânica deve ser empregada sistematicamente em todos os feridos, não vacinados com o toxóide, ou em casos de profundas lacerações tissulares.

O tétano local ocorre com alguma frequência nos casos tratados pela antitoxina. Atualmente, com o uso intensivo de vacinação com toxóide tetânico, o problema do tétano está mais simplificado. A imunização ativa contra o tétano, por meio de toxóide tetânico, vem dando resultados excelentes. Na campanha do norte da África, as tropas da Inglaterra e dos Domínios foram previamente inoculadas com o toxóide tetânico. As tropas da União Sul-Africana não foram vacinadas preventivamente, de modo sistemático contra o tétano, nem as tropas do "Africa Korps", no início da campanha, sendo baixa também a porcentagem nos soldados italianos vacinados; só nos últimos períodos de guerra é que as farmácias italianas de campanha capturadas, incluíam no seu estoque vacinas TAB-T.T.. (O toxóide dessas vacinas era bastante ativo, conforme comprovaram as dosagens).

Pois bem, entre as tropas dos Domínios e da Inglaterra que receberam o toxóide, a incidência do tétano foi de 0,13 por 1.000 feridos, ao passo que, entre as tropas Sul-Africanas não vacinadas,

no mesmo período, a incidência foi de 1,6 por 1.000. Na apreciação desses resultados é necessário ter em conta a baixa incidência do esporo do tétano (8,8%) nos desertos africanos. Vimos acima entre poucos feridos alemães e italianos tratados, foram observados 7 casos de tétano, demonstrando o fato, elevada incidência do tétano nessas tropas. Embora o número dos casos observados até o presente seja muito pequeno, conforme observaram Boyd e MacLennan (1942), a evidência da proteção a favor da imunização ativa contra o tétano é bem definida.

* * *

Os compostos sulfanilâmídicos de real valor no curativo dos feridos, não substituíram totalmente o soro antigangrenoso no tratamento das toxemias gangrenosas, principalmente nos feridos tratados tardiamente. Nesses casos, além da abundante pululação microbiana, também a toxemia gangrenosa desempenha importante papel. Assim, o soro antigangrenoso eminentemente antitóxico, embora também antibacteriano, encontra indicação formal na neutralização das toxinas circulantes e, portanto, na desintoxicação do organismo. Em trabalho anterior, um de nós passou em revista o tratamento geral e local das infecções anaeróbias com os sulfanilâmídicos (Souto — 1942), razão pela qual não abordaremos esse assunto com mais detalhes.

Algumas outras substâncias medicamentosas modernas parecem também exercer ação no tratamento da gangrena gasosa. Assim, MacIntosh e Selbie (1942) investigaram comparativamente a ação da penicilina, da proflavina, do peróxido de zinco e da sulfanilamida sobre a infecção pelo *Clostridium Welchii*. Em suas mãos a penicilina demonstrou ser superior às demais drogas experimentadas. Está sendo investigada também a ação de certos produtos do metabolismo das bactérias esporuladas aeróbias: a tirotricina, gramicidina e tirocidina e substâncias quimioterápicas como: as monoaminoacridinas ou proflavinas.

O raio X, nas verificações de Braislford (1940), Kelly, Dowell, Rossun e Collien (1938), parece de valor no diagnóstico precoce e produz bons resultados no tratamento da gangrena. Harris (1938) assinalou que os resultados dessa terapêutica se aproximam da terapêutica específica, em certos casos.

* * *

E' evidente que o melhor processo no tratamento da infecção gangrenosa será o tratamento preventivo, por meio de toxóides antigangrenosos, suficientemente ativos, capazes de gerar um substancial estímulo antigênico contra a infecção gangrenosa.

A continuação das investigações bem iniciadas por Penfold e Tolhurst (1937 e 1938) e por Kolmer (1942), talvez permitam, no futuro, a preparação de toxóides gangrenosos bastante ativos e capazes de produzir o aparecimento em níveis elevados, de antitoxina suficiente para promover proteção contra esta terrível complicação das feridas, a exemplo do que já se obteve com relação ao *Clostridium tetani*.

A obtenção de toxóides igualmente eficientes contra o *Clostridium Welchii* que concorre em 60 a 80% das infecções civis e militares contra o *Clostridium Novyi* (que concorre com 5 a 35%), contra o *Clostridium septicum* (15 a 30%) e contra o *Clostridium histolyticum* (2%), tornariam a gangrena gasosa, como o tétano, um problema resolvido; seria esta uma das questões que mais deveria preocupar a atenção dos que estudam os problemas correlacionados aos germes anaeróbios.

* * *

O tratamento cirúrgico da gangrena é o básico em todos os casos; as feridas de paz e de guerra, em princípio, não oferecem diferença apreciável, porém, devido à alta percentagem das contaminações das feridas de guerra, as complicações são nelas mais frequentes. Nas feridas de guerra, as lacerações dos tecidos, o extravasamento difuso do sangue, as extensas feridas cutâneas, os ferimentos profundos, principalmente nas nádegas, com o comprometimento do reto e da bexiga, e a penetração de fragmentos de roupa e terra largamente contaminados, são suscetíveis de gerar aspectos fisionômicos particulares. As feridas de guerra apresentam condições ótimas para o desenvolvimento da gangrena gasosa. Como escrevem Ross e Paterson (1942): "Futhermore, they would appear to be ideal for establishing gas gangrene, especially as the organisms are present not only in soil, but also in rubble which contains enough calcium to encourage their growth".

Não existe cirurgia de guerra e de paz. O mecanismo das defesas orgânicas é idêntico no soldado e no civil; no entanto, existe uma regra diretiva na cirurgia de guerra: "Salvar o máximo de feridos e salvar o máximo de membros dos feridos". As interven-

ções cirúrgicas têm êste escôpo primarcial, mesmo que depois sejam necessárias novas intervenções para corrigir o que, de certa maneira, não foi possível ser bem feito da primeira vez.

São notáveis os resultados obtidos pela excisão precoce e debridamento largo, segundo verificaram Carling (1942), Ross e Paterson (1942) nos ferimentos produzidos pelos fragmentos de bombas, de vidro, de madeira, e de pedra. A excisão precoce e o debridamento largo, removendo mecânicamente os espaços mortos, diminuindo as condições potenciais de infecção que constituem ótimos ninhos para a proliferação de anaeróbios, são a melhor salvaguarda contra as infecções grangrenosas.

Trueta (1942), estabeleceu pelo processo de tratamento das gangrenas, denominado "tratamento biológico das feridas", 5 pontos: tratamento cirúrgico precoce, limpeza e excisão da ferida, provisão de drenagem, imobilização pelo gesso. Para Trueta, a grande vantagem dêsse tratamento estaria na possibilidade de impedir ou diminuir as perigosas consequências das gangrenas gasosas.

RESUMO

1.º — Os microorganismos patogênicos anaeróbios são a causa das mais graves infecções de feridas.

2.º — E' nas feridas de guerra que as complicações por germes anaeróbios são mais frequentes.

3.º — O bombardeio aéreo indiscriminado das populações civis, acarretou novos problemas com relação às infecções de feridas por germes anaeróbios.

4.º — A despeito da maior fôrça viva dos projetís e o uso de novos engenhos de destruição, diminuiu a mortalidade entre os feridos de guerra e aumentou a proporção dos "recuperados". Estes fatos são devidos ao deslocamento dos hospitais de campo, paralelamente aos deslocamentos das linhas de combate. A perfeita aparelhagem dêsses hospitais, permitindo realizarem-se operações nas linhas de frente, possibilita uma eficiente prevenção das gangrenas gasosas.

5.º — Como consequência do tratamento cirúrgico precoce, fator da mais alta importância na prevenção das gangrenas gasosas, a porcentagem de amputações foi reduzida de um terço na frente russa, a proporção dos recuperados para as linhas de combate subiu a 73%. A mortalidade nos hospitais russos baixou a 1,1%.

6.º — Nas guerras de movimento como as do início da guerra atual, a flora de contaminação das feridas é pobre. Nas guerras de estabilização, a flora de contaminação é muito complexa.

7.º — Nas guerras de movimento o *Clostridium Welchii* é o anaeróbio contaminante mais frequente.

8.º — Nas guerras de estabilização a flora anaeróbia é rica, sobressaindo como contaminante mais frequente o *Clostridium septicum*, e o *Clostridium Novyi*.

9.º — Os exames das amostras dos solos do Norte de África, onde se desenvolveu a campanha, demonstraram ser extremamente baixa a porcentagem de germes anaeróbios nos mesmos.

10.º — E' elevada a proporção de microorganismos anaeróbios nos solos das regiões cultivadas da Europa.

11.º — Os exames do solo das zonas de guerra da Europa (1918), demonstraram estar o *Clostridium Welchii* presente em 100% dos casos; o *Clostridium Novyi* em 64%; o *Clostridium septicum* em 8%, o *Clostridium histolyticum* em 2% e o *Clostridium tetani* em 27%.

12.º — E' possível que, com o deslocamento das linhas de combate para outras regiões, volte a se apresentar o problema das infecções de feridas por germes anaeróbios.

13.º — A vacinação profilática antitetânica, os progressos da técnica cirúrgica, os sulfamídicos, a obtenção de soros antigangrenosos mais ativos e o rigoroso cuidado com o estado geral do paciente, estão concorrendo para diminuir perigo das infecções das feridas por germes anaeróbios.

14.º — E' possível esperar que a exigência de dosagem dos soros antigangrenosos em unidades internacionais, permita obter resultados ainda não suspeitados no tratamento profilático e curativo de gangrena gasosa.

15.º — Os progressos no diagnóstico rápido das infecções anaeróbias permitem esperar que possam ser usados os soros monovalentes.

16.º — O método atual de mistura dos soros polivalentes é sujeito a críticas.

17.º — São excelentes os resultados obtidos das primeiras observações dos feridos vacinados anteriormente contra o tétano, por meio do toxóide tetânico.

18.º — E' necessário estimular os estudos para obtenção de toxóides igualmente ativos contra os principais germes da gangrena gasosa.

19.º — As experiências em animais permitem esperar a obtenção de toxóides ativos contra os principais agentes da gangrena gasosa.

20.º — Os sulfamídicos têm dado excelentes resultados no tratamento das infecções anaeróbias. Porém, nas intoxicações que ocorrem nos feridos socorridos tardiamente, os sulfamídicos têm pouca ou nenhuma ação.

21.º — Só o sôro específico é capaz de neutralizar as toxinas circulantes e desintoxicar o organismo.

22.º — Várias substâncias medicamentosas novas têm produzido bons resultados terapêuticos na gangrena experimental, entre outros: a penicilina, gramicidina, a tirocina, a tirotricina, e o peróxido de zinco.

23.º — O raio X permite o diagnóstico precoce da gangrena gasosa e produz resultados apreciáveis no tratamento de certos casos.

24.º — O tratamento cirúrgico precoce pela excisão e o debridamento largo é o tratamento básico da gangrena gasosa.

25.º — O tratamento biológico das feridas, segundo Trueta, impede ou diminui o perigo das gangrenas gasosas.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BOYD, J. S. K. e MACLENNAN, J. D. — 1942 — *Lancet*, 243: 745.
- 2 — CARLING, R. — 1942 — *Lancet*, 1: 474.
- 3 — FILDES, P. — 1929 — *System of Bacteriology in Relation to Medicine*, London, vol. I||, 321.
- 4 — HARRIS, J. H. — 1934 — *Am. Jour. Roentgenology and Radiumtherapy*, 41: 498.
- 5 — *History of the Great War, Medical Services, Pathology*, London, 1923.
- 6 — KELLY, J. F., DOWELL, D. A., ROSSUM, B. C. e COLLIER, F. E. — 1938 — *Radiology*, 31: 608.
- 7 — KOLMER, J. — 1942 — *Jour of Immun.*, 42: 289.
- 8 — MACINTOSH, J. e SELBIE, F. R. — 1942 — *Lancet*, 243: 750.
- 9 — MADDEN, S. C., CARTER, J. R. KATHUS, A. A., MILLER, L. L. e WHIPPLE, G. H. — *Jour. Exp. Med.*, 77: 277.
- 10 — MAES, V. — 1940 — *Arch. Surg.*, 41: 393.
- 11 — MAIA, M. — 1942 — *Rev. Med. Cir. Bras.*, 50: 617.
- 12 — MOORHEAD, J. H. — 1942 — *Lancet*. 1: 942.

- 13 — OGILVIE, W. — 1940 — Wound infection, Lancet War Primer., London.
- 14 — PENFOLD, W. P. e TOLHURST, J. C. — 1938 — *Med. Jour. of Australia*, 25: 604.
- 15 — PENFOLD, W. P. e TOLHURST, J. C. — 1937 — *Med. Jour. of Australia*, junho 26, 982, (Reprinted).
- 16 — PRIGGE, R. — 1937 — *Deut. Med. Wochensc.*, 51: 1906.
- 17 — RAMMELKAMP, C. H., WEINSTEIN, L. — 1942 — *Jour. Inf. Dis.*, 71: 166.
- 18 — ROSS, J. e PATERSON, J. — 1942 — *British Med. Jour.*, 4244: 589.
- 19 — SOUTO, A. B. — 1942 — *Anais Brasil. de Ginec.*, 13: 110.
- 20 — SOUTO, A. B. e LIMA, C. — 1938 — *Compt. Rendu Soc. Biol.*, 129: 767.
- 21 — SOUTO, A. B. e LIMA, C. — 1938 — *Compt. Rendu Soc. Biol.*, 129: 76.
- 22 — SOUTO, A. B. e LIMA, C. — 1938 — *Compt. Rendu Soc. Biol.*, 129: 79.
- 23 — SOUTO, A. B. e LIMA, C. — 1938 — *Compt. Rendu Soc. Biol.*, 129: 763.
- 24 — SOUTO, A. B. e CALAZANS, S. C. — 1938 — *An. Paul. Med. Cir.*, 36: 255.
- 25 — TRUETA, J. — 1939 — *Proc. R. Soc. Med.*, 33: 95.
- 26 — TRUETA, J. — 1942 — *Brit. Med. Jour.*, 4245: 616.
- 27 — United States History of the World War, 1929 — Med. Depart. of the U. S. Arm. in the World War. Washington, 12: 413.
- 28 — ZEISSLER, J. e RASSFELD, L. — 1928 — *Veröffentl. Kriegs Konstit. Pathol.*, 5: 199.

CONSIDERAÇÕES EM TÔRNO DA CULTURA DA ENDAMEBA HISTOLÍTICA

JOSÉ DA SILVA COSTA

Técnico de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz

Entre muitos assuntos que têm servido de tema para demorados e exaustivos trabalhos dos estudiosos de parasitologia, destaca-se pela sua grande importância, a cultura da *Endameba histolítica*.

Desde longa data tem-se procurado realizar culturas desse microorganismo, que é responsável por uma série de perturbações da saúde humana.

Entre os trabalhos de valor que têm sido publicados sobre a cultura da *Endameba histolítica*, merecem especial menção os realizados no Instituto Adolfo Lutz, pelos Drs. Augusto de E. Taunay e Marcelo Osvaldo Álvares Corrêa e Sr. Gabriel Garcia de Figueiredo.¹

Reconhecida a possibilidade de se cultivar *in vitro*, a *Endameba histolítica*, não tem nosso trabalho outro mérito que o de procurar tornar mais prático aquilo que já se vinha realizando entre nós. Assim sendo, começamos a experimentar meios de cultura diferentes dos que eram empregados, modificando algumas vezes, a composição desses meios, e outras, apenas a técnica de preparação. Após uma série de pesquisas conseguimos resultados que consideramos plenamente satisfatórios.

MEIOS DE CULTURA

Entre os meios por nós preparados e modificados, dois revelaram condições ótimas para o desenvolvimento da *Endameba histolítica*.

Descreveremos em detalhes a técnica de preparação: tomam-se 1.000 cm³ de sangue de boi, estéril, em balão Erlenmeyer de 2.000

(1) Revista do Instituto Adolfo Lutz — V. II, n.º 1 — maio 1942.

cm³, deixa-se este sangue em repouso até a coagulação espontânea e completa, retirando-se por pipetagem ou sifonagem o sôro sobrenadante. Este, irá servir para a preparação do meio de cultura claro, que chamaremos "B"; o coágulo que ficou no balão, servirá para a preparação do outro meio, escuro, que designaremos por "A". O rendimento em coágulo para sangue de boi, pode ser estimado em cerca de 450 gramas.

PREPARAÇÃO DO MEIO ESCURO "A"

O balão contendo o coágulo, tendo o gargalo convenientemente protegido com tampão de algodão, é aquecido em banho-maria pelo espaço de 30 minutos; depois do aquecimento é o balão transferido para a geladeira à temperatura de 2-4° C.. E' conveniente repetir esta operação por duas vezes com intervalos de 24 horas.

Consegue-se assim, não só a esterilização do coágulo, como também a coagulação, pelo calor, dos protídeos nele existentes. E' então retirado o balão da geladeira e a êle juntados cerca de 400-500 cm³ de solução Locke estéril (pH 7,9 — 8,2).

Feita a mistura, o balão é levado à geladeira, onde permanecerá 6-10 dias, agitando-se-o suavemente duas vêzes por dia.

Reconhece-se que o meio está em condições de ser usado, quando o líquido sobrenadante apresentar-se com uma coloração vermelho-escura. Por decantação, distribue-se-o em tubos esterilizados, na quantidade de cerca de 4-5 cm³ para cada tubo. Êsses tubos assim preparados, devem ser guardados em geladeira até o momento da sementeira. Não esterilizar.

PREPARAÇÃO DO MEIO CLARO "B"

Sôro de sangue de boi ou de cavalo	350 cm ³
Solução de Locke	600 cm ³

Coloca-se o sôro em balão Erlenmeyer de 2.000 cm³, cuja abertura é protegida por um tampão de algodão. O balão é levado ao banho-maria até obter-se a coagulação do sôro. Uma vez obtida esta é ele imediatamente retirado do banho. Deixa-se resfriar e juntam-se aos poucos, 600 cm³ de solução de Locke estéril, abandonando-se a mistura ao repouso, à temperatura ambiente tendo-se o cuidado de agitá-la suavemente 2-3 vezes ao dia. O líquido sobre-

nadante (solução de Locke) tem, a princípio, um pH igual a 7,9 — 8,2. Em virtude da incorporação, por difusão, pela solução de Locke, dos princípios solúveis contidos no sôro coagulado, o pH desta solução tende a baixar progressivamente, atingindo, ao cabo de três a quatro dias, o valor de 7,6—7,2. (*)

Quando o pH atinge êsse valor, o líquido sobrenadante se apresenta com coloração amarela característica. E' de grande importância frisar que o pH é uma das condições essenciais para obtenção de um meio capaz de satisfazer às condições exigidas pela técnica. Por decantação, transvasa-se o líquido sobrenadante para balões estéreis, os quais deverão ser conservados em geladeira. No momento de sementeira distribue-se o líquido dêstes balões para tantos tubos de ensaio estéreis, quantos forem necessários, voltando a sobra dos balões à geladeira.

Êste meio claro B é preferível ao meio escuro A para as culturas iniciais e para repiques sucessivos, pois que parece ser um tanto impediante para o desenvolvimento de Blastocistis.

Meios semelhantes foram preparados, partindo-se de sôro de sangue humano. Os resultados obtidos com êles em provas culturais, foram concordantes com os alcançados com o sangue de boi. Presentemente, estamos experimentando a preparação de meios de cultura partindo de sangue de animais de outras espécies, tais como sôro de cavalo, coelho, carneiro, etc. e podemos adiantar que os resultados obtidos com êles são bons, sobretudo com o sôro de cavalo, de obtenção fácil e em boas condições de assepsia.

Esperamos poder, oportunamente, relatar estes resultados em nova publicação.

ESTERILIZAÇÃO

Aconselhamos não filtrar nem esterilizar pelo calor êste meio. A prática nos mostrou que o crescimento das *Endamebas* é tanto maior quanto menos sofrer o meio a ação do calor.

No momento de se fazer a sementeira dos cistos, distribue-se o meio do balão para os tubos de ensaio estéreis (16x16) na quantidade de 4 a 5 cm³ para cada tubo. Conforme já foi dito o balão contendo o meio deverá ser sempre conservado na geladeira.

(*) Êste valor é atingido naturalmente pela própria mistura.

Uma vez exposto o modo de preparação dos meios de cultura, passaremos a fazer algumas considerações sobre o processo para a obtenção das culturas da *Endameba histolítica*.

TÉCNICA

E' evidente que a obtenção de culturas de *Endameba histolítica* está condicionada à sementeira partindo de material contendo cistos desta espécie; entretanto, cuidados especiais devem ser tomados para esse desiderato.

Esses cuidados resumem-se nas duas condições seguintes: separação dos cistos das fézes e sementeira dos mesmos em meios apropriados.

MANEIRA DE PROCEDER

Reconhecida a existência dos cistos nas fézes examinadas, procede-se do seguinte modo: 5-10 gramas das fézes são colocadas em pequenos recipientes de vidro (copo Becker, cálice comum, frasco de Borrel), no qual se juntam alguns centímetros cúbicos de água. Agita-se a mistura com bastão de vidro e vai-se juntando água até que ela perca a consistência pastosa, tornando possível a centrifugação do líquido. Essa mistura fluida, de água e fézes, é então passada através de uma tela fina, para reter as partículas grosseiras. O líquido que passa, é recebido em copo de vidro, distribuído em tubos e centrifugado. Cuidados especiais devem ser tomados durante a centrifugação. Assim, a velocidade de centrifugação não deve ultrapassar a 2.000 r/m., durante cerca de 5 minutos e nunca além de 10. Separa-se o líquido sobrenadante por decantação, junta-se água, agita-se bem com um bastão de vidro o sedimento, atritando-o contra as paredes do tubo. Centrifuga-se de novo, repetindo-se essa operação de lavagem do sedimento tantas vezes quantas sejam necessárias para obter o líquido sobrenadante mais ou menos claro. A prática ensina-nos a conhecer o momento em que o sedimento está convenientemente lavado; nestas condições, temos um sedimento rico em cistos de mistura com outros detritos, porém razoavelmente lavados. Em geral, três lavagens são suficientes.

Segue-se então a suspensão dos cistos. O método por nós empregado é o de Faust, ligeiramente modificado. Ao sedimento que

ficou no tubo, junta-se pequena quantidade de solução de sulfato de zinco, de densidade 1.180 e, com um bastão de vidro, por agitação, procede-se à suspensão dos cistos procurando-se tornar a mistura bem homogênea. Novas quantidades de solução de sulfato de zinco são juntadas até completar o seu volume útil, agitando-se o tubo enérgicamente.

Esta operação deve ser realizada no mínimo espaço de tempo, porque o contacto demorado dos cistos com o sulfato de zinco pode determinar a morte dos mesmos, apesar da sua conhecida resistência. A seguir, centrifuga-se a suspensão dos cistos, em velocidade de 500 r/m., pelo espaço de 60-90 segundos.

É importante lembrar que a velocidade não deve ultrapassar 500 r/m., porquê poderia ocasionar a não flutuação dos cistos. Retira-se o tubo, cuidadosamente do centrifugador e, com uma pipeta aspira-se a camada superficial do líquido, rica em cistos que, graças à densidade da solução, vem à superfície juntamente com pequenas quantidades de outros detritos. A solução de sulfato de zinco que ficou no tubo, pode ser recuperada. (*)

O líquido aspirado é rapidamente transvasado em outro tubo. Junta-se então água destilada, agita-se para homogeneização e centrifuga-se por espaço de 5-6 minutos, com velocidade de 2.500 r/m.

Repete-se esta operação de lavagem tendo muito cuidado durante a decantação, para que os cistos não passem com a água. A lavagem dos cistos é terminada quando todo o sulfato de zinco tiver sido retirado por diluição. Em geral três lavagens são suficientes.

Assim isolado, o sedimento composto em sua maior parte por cistos, deve ainda sofrer o tratamento seguinte: ao tubo contendo sedimento, junta-se um pouco de solução normal de ácido

(*) A recuperação do sulfato de zinco, já usado no Processo de Faust, representa um fator econômico que deve ser levado em linha de conta. Depois de utilizada para a suspensão dos cistos de *Endameba histolítica* das fêzes a solução é armazenada em um recipiente a isso destinado. Quando o volume da solução de sulfato de zinco atingir uma quantidade razoável então procede-se à sua purificação. Esta consiste em filtração do líquido contendo detritos alimentares, cistos, ovos, etc., em papel de filtro comum. Depois de diversas filtrações, o líquido se apresenta mais ou menos claro. Ao filtrado junta-se 5-8 gramas de carvão ativo que ficará em contacto com ele cerca de 2-4 horas, agitando-se de vez em quando a mistura. Filtra-se o todo uma ou mais vezes até que o filtrado torne-se completamente claro e desodorado.

Toma-se a densidade do filtrado e corrige-se a falta de sulfato de zinco, juntando-se pequenas quantidades desse sal. Pode-se ainda, acertar a densidade da solução de sulfato de zinco, evaporando-se a água.

Este processo, apesar da sua simplicidade, permite a recuperação de quase 100% da solução de sulfato de zinco empregada.

clorídrico (36,5 em 1.000 de água), agita-se a mistura com bastão e deixa-se em repouso por alguns minutos (5-10). Decorrido este prazo, leva-se o tubo ao centrifugador (com velocidade de 2.000-2.500 r/m.) durante cerca de 5-6 minutos. Retira-se o ácido clorídrico por decantação e lava-se o sedimento com água destilada 3 a 4 vezes por centrifugação (2.000-2.500 r/m., cerca de 5-6 minutos).

E' de notar que se pode obter cultura de *Endameba histolítica* sem o tratamento do sedimento pelo ácido clorídrico. Mas, nesse caso, as culturas apresentam-se altamente contaminadas. E essa maneira de proceder é aconselhável para reduzir tanto quanto possível o desenvolvimento de microorganismos outros que não a *Endameba histolítica* e que acarretariam conseqüentemente uma redução no crescimento do parasita desejado.

Antes de semear é sempre conveniente o exame microscópico de uma pequena porção de sedimento, corado pelo lugol, afim de verificar se a morfologia dos cistos não foi alterada pelas operações sofridas.

SEMEADURA

O sedimento separado, por decantação, da última água de lavagem é tratado dor 1-2 cm³ do meio claro B, e semeado após ser bem misturado por aspirações sucessivas com pipeta.

Essa semeadura será feita em 2 ou 3 tubos contendo meio, tendo-se o cuidado de juntar a cada um desses tubos alguns miligramas de amido de arroz, previamente esterilizado e conservado em estufa a 37°C., para que se mantenha sempre sêco.

Levam-se os tubos à estufa, à temperatura de 37-38°C..

Ao cabo de 20-24 horas, o exame microscópico revela a presença de 2-5 amebas em forma vegetativa, por campo (ocular 3b, objetiva 40, E. Leitz Wetzlar).

Decorridas 48 horas, constata-se cerca de 15-20 amebas por campo microscópico.

A experiência tem demonstrado que se pode aumentar a capacidade de desenvolvimento da *Endameba histolítica*, enriquecendo-se o meio. Junta-se, para isso, a um ou dois tubos contendo meio claro B, além do amido de arroz, um pequeno fragmento de coágulo

do sangue de boi que foi prèviamente aquecido em banho-maria (100°C.) * (Fotografia n.º 1).

A princípio usávamos o coágulo sem ser tratado pelo calor, mas os resultados ficavam prejudicados pela presença de hemátias que, disseminadas no meio, atrapalhavam o crescimento das amebas, como também a sua boa observação. Nessas condições, obtêm-se culturas que apresentam, por campo microscópico, 40-50 amebas, como mostram as microfotografias 1, 2 e 3.

Vimos, anteriormente, que o pH do meio de cultura é um fator primordial para obtenção de resultados culturais satisfatórios. As nossas experiências mostraram que o pH não influe tão sòmente no desenvolvimento da *Endameba histolítica* mas, determina também, uma modificação no tamanho de cada forma vegetativa de per si. Assim, verificámos que, culturas realizadas em meio escuro A com pH 8,2 tiveram um crescimento satisfatório com relação ao número de amebas, apresentando-se porém, estas, sensivelmente diminuídas em tamanho. Amostras dessas mesmas culturas repicadas para novos tubos contendo o mesmo meio, porém com pH baixado para 8,0 cresceram de maneira satisfatória, com relação ao número de amebas por campo; mas o mesmo não aconteceu com referência ao tamanho dessas formas vegetativas, que, muito embora se apresentando maiores do que as anteriores, não tinham,

(*) Na preparação dèste coágulo deve-se obedecer à técnica seguinte: recorta-se uma pequena porção de coágulo fresco, em pedacinhos, numa placa de Petri e leva-se ao banho-maria (100°C). Depois de aquecidos, os pedaços de coágulo são resfriados na geladeira e transferidos para tubos de ensaio estéreis 20×20, passando por esterilização ao vapor corrente durante 20-30 minutos após o que, serão conservados em geladeira.

No momento da semeadura dos cistos, junta-se ao meio claro B, um fragmento mínimo dèste coágulo, juntamente com alguns miligramos de amido de arroz; êste processo, conforme já o dissemos, serve para enriquecer os primeiros tubos de cultura, não devendo ser usado para os casos de repique.

Para enriquecer os repiques usaremos o soro de boi ou de cavalo (de preferência êste último), segundo a técnica que iremos descrever: tomam-se 20-50 cm³ de soro de cavalo em balão estéril de 500 cm³, contendo pérolas de vidro. Coagula-se o soro em banho-maria; assim que o soro começar a coagular retira-se o balão do banho e com um bastão procura-se fragmentar o soro, agitando-se-o enérgicamente para facilitar a maior fragmentação do soro pelas pérolas. Deixa-se resfriar o todo e junta-se 100-150 cm³ de solução fisiológica. Agita-se diversas vezes e deixa-se repousar a mistura. Decanta-se o soluto fisiológico, repetindo-se 4-5 vezes a mesma operação, afim de se obter completa lavagem dos fragmentos do soro coagulado. Depois da última lavagem, junta-se ao sedimento mais ou menos o dôbro do volume de solução fisiológica e esteriliza-se a suspensão por tinalização, levando, depois, à geladeira.

No momento de se fazer o repique de Endamebas, junta-se pequeníssima porção dèstes fragmentos do soro ao meio claro B, juntamente com alguns miligramos de amido de arroz. Desta maneira obtêm-se um extraordinário crescimento de amebas, nos repiques sucessivos, graças à adição do soro lavado.

contudo, atingido as dimensões normais. Com o abaixamento do pH para 7,8 verifica-se que o desenvolvimento obtido dá-se de maneira satisfatória, atingindo seu tamanho quase normal. Com pH igual a 7,6-7,2 em meio claro B, obtém-se finalmente, formas vegetativas exuberantes em qualidade e quantidade. O exame microscópico revela então, não só a riqueza por campo, como também, permite observar que as formas vegetativas apresentam-se em suas dimensões normais, como se se fizesse cultura partindo de um meio de pH 7,6-7,2.

Faz-se a verificação das amebas semeadas, colhendo-se amostras que são colocadas entre lâmina e lamínula e examinadas ao microscópio.

Nos exames microscópicos para verificação e contagem das amebas por campo, cuidados especiais devem ser tomados para obtenção de resultados concordantes, principalmente no que diz respeito à tomada da amostra. Descrevemos em detalhes êsse particular. O tubo contendo a cultura é retirado da estufa, cuidadosamente, e mantido em posição inclinada. Com uma pipeta estirada, munida de pera de borracha, retira-se da porção junto aos grãos de amido, uma quantidade de sedimento suficiente para a preparação de uma lâmina. Insistimos na necessidade de se seguir rigorosamente essa técnica porquê a prática tem demonstrado que é junto aos grãos de amido depositados no fundo do tubo, que as amebas se apresentam em maior número.

Aconselhamos também o exame periódico após 24 e 48 horas, porquê, em alguns casos, a passagem dos cistos para as formas vegetativas, dá-se ao cabo dêsse tempo; casos há em que, decorridas 48 horas, não se encontram ainda no tubo de cultura amebas em formas vegetativas. Êsse fato não quer dizer que o desenvolvimento não venha a dar-se, mas mostra que há apenas um retardamento na transformação dos cistos, podendo-se atribuir isso a um êrro de técnica ou qualquer outro fator ainda desconhecido.

Nossa experiência e observação conduz-nos a admitir que o tempo de desenvolvimento dos cistos em formas vegetativas é dependente do número de núcleos existentes nos cistos. Assim, se semearmos cistos ou formas pré-císticas predominantemente mononucleadas, as culturas desenvolvem-se em geral no espaço de 18-24 horas; se partirmos de amostras cujos cistos predominantes sejam binucleados, veremos que o crescimento se dá depois de 24 horas.

De um modo geral, podemos, pois, adiantar que, quanto maior for o número de núcleos existentes nos cistos, mais vagarosa é a passagem da forma de resistência à forma vegetativa e daí o maior tempo para se obter culturas ricas partindo-se de material contendo, predominantemente, cistos com quatro núcleos.

O material que serviu para o exame em lâmina, poderá servir de elemento de repique, uma vez que seja rico em formas vegetativas. Para isso basta que, por meio de uma pinça, retire-se a lâminula, fazendo-se escorrer sôbre ela cêrca de 0,5 cm³ do meio claro B, deixando-se cair o líquido de lavagem sôbre a outra parte do material que ficou na lâmina. O todo é então levado a um outro tubo de meio de cultura ao qual se juntam alguns miligramos de amido de arroz. Ao cabo de 48 horas temos outro tubo de cultura.

REPIQUE DA CULTURA DE ENDAMEBA HISTOLÍTICA

Quando procurámos realizar culturas de *Endameba histolítica*, tínhamos em mira a obtenção de meios ricos dêsses parasitas, visando o emprêgo prático das suas múltiplas aplicações.

As culturas pelos métodos usuais são geralmente pobres de amebas (12-20 amebas por campo), porisso que, ao seu lado, há uma enorme proliferação de bactérias que muito lhe prejudicam o crescimento. E, sabe-se que, como único meio de purificação dessas culturas, usam-se apenas os repiques sucessivos. E' nos repiques, entretanto, que residem as maiores possibilidades de êxito nas culturas de *Endameba histolítica* e porisso chamamos a atenção para os detalhes que exporemos a seguir.

Acontece que, nem sempre a primeira sementeira de cistos de *Endameba histolítica*, isolados diretamente das fêzes, atinge o desenvolvimento desejado. Desenvolvimento apreciável, porém, poderemos obter nas sub-culturas, se seguirmos a técnica abaixo indicada.

A cultura obtida como anteriormente descrevemos deve ser examinada cada 48 horas. O primeiro repique será feito sempre depois de 48 horas.

Um outro fato que se deve levar em consideração na obtenção de bons repiques de ameba é o referente à presença de Blastocistis, cuja maior capacidade reprodutiva, como já o demonstraram vários pesquisadores, inibe o desenvolvimento daquele protozoário. As-

sim, se durante os primeiros repiques, os Blastocistis estiverem comprometendo o bom desenvolvimento das amebas, a cultura deverá ser forçosamente despresada.

As vezes acontece de se ter poucos Blastocistis na cultura, podendo êles desaparecer com os repiques sucessivos; daí a vantagem de se tentar um ou dois repiques para ver si os Blastocistis continuam ou não a sua proliferação.

Uma vez conseguida uma cultura livre ou quasi livre de Blastocistis, estamos em condições de praticar o primeiro repique. Dois são os caminhos a seguir para êste repique:

1.º — Fazê-lo depois de 48 horas, utilizando-se para isso do sedimento do tubo de cultura, que será transferido para novos tubos contendo meio claro B e ao qual se juntou alguns miligramos de amido de arroz.

2.º — Fazê-lo lavando-se primeiro o sedimento em sôro fisiológico, para depois então transferi-lo a novos tubos de cultura com meio claro B, aos quais se juntam alguns miligramos de amido de arroz e, também, uma parcela mínima da suspensão do sôro coagulado de cavalo, de cuja preparação falámos.

O sedimento de cada tubo de cultura pode ser repicado para 5 outros tubos novos.

A técnica dêste segundo processo é a seguinte: depois de 48 horas retira-se do fundo dos tubos das culturas iniciais, por meio de pipeta, todo o sedimento que será transferido para tubos de centrífuga. Ao sedimento juntamos solução fisiológica até completar o volume útil do tubo. Por meio da mesma pipeta, mistura-se solução fisiológica e sedimento, o que se poderá também fazer com pequeno bastão de vidro. Centrifuga-se com velocidade de 500-600 r/m. durante 3-4 minutos. Esta operação deve ser feita mais ou menos rapidamente e somente uma única vez. Ao sedimento rico em amebas, junta-se então pequena porção do meio claro B; depois de bem homogeneizado o material, é êle distribuído em tubos de cultura, contendo sempre o meio claro B, juntamente com alguns miligramos de amido de arroz e 1-2 gotas da suspensão de soro de cavalo em solução fisiológica. Os tubos são levados à estufa a 37°-38°C..

Depois de 48 horas processa-se novo repique, tendo-se o cuidado de não lavar mais o sedimento em solução fisiológica.

O número de amebas vai então aumentando gradativamente de um repique para outro. Notável é, porém, o desenvolvimento

das amebas do segundo até o quinto repique. Quando, portanto, se pretender grande quantidade de *Endameba histolítica* em cultura, deve-se fazer o segundo, terceiro e quarto repiques, não para poucos tubos de cultura, mas para muitos, utilizando-se sempre o meio claro B, com alguns miligramas de amido de arroz e quando necessário, 1-2 gotas da suspensão de sôro de cavalo para o enriquecimento dos repiques.

Procedendo dessa forma obtivemos culturas cujos campos microscópicos revelaram a existência até de 140 unidades (ocular 3b, objetiva 40, idem).

Durante nossos estudos em culturas que apresentavam 30-40 elementos por campo, o Dr. Marcelo O. Álvares Corrêa, competente e laborioso biólogo deste Instituto, logrou contar cêrca de 1.500.000 amebas em média, por centímetro cúbico de cultura. Esta cifra ultrapassa de muito os resultados até então obtidos nos outros laboratórios que estudam o assunto.

Daí para cá, temos conseguido ainda culturas muito mais ricas cujas contagens, porém, não fizemos.

O fato de se conseguir culturas ricas e em relativa pureza, graças à técnica de repique acima descrita, permitiu-nos a obtenção de *Endameba histolítica* em estado sêco.

SECAGEM DA ENDAMEBA HISTOLÍTICA; PREPARAÇÃO DO ANTIGENO

Depois de lavado duas vezes com água destilada (por centrifugação) o sedimento da cultura é espalhado nas paredes do tubo e pôsto no secador a vácuo. 30-40 horas, em geral, são suficientes para a secagem. Depois de sêco é o sedimento triturado e conservado em tubo fechado a lâmpada.

Nessas condições temos a Ameba histolítica sob a forma de um pó branco-amarelado, contendo alguns detritos microbianos ao lado de fragmentos de grãos de amido. (Fotografia n.º 2.)

E' óbvio que, quando se pretende reduzir as culturas a pó, deve-se colocar nos tubos do último repique apenas o mínimo possível de amido de arroz, devendo-se ter o cuidado de não colocar fragmentos de sôro lavado.

Dessa forma, obtém-se um pó com o máximo de pureza em amebas.

A partir dêsse pó conseguimos antígeno alcoólico incolor e inodoro que, experimentado nas reações de fixação do complemento para amebiase, deu ótimos resultados.

Continuamos estudando a atividade do antígeno em função do pêso da substância sêca, por unidade de volume de álcool absoluto empregado, e do maior ou menor tempo para a sua preparação.

O método habitual de obtenção do antígeno para as reações de fixação de complemento é o descrito por Craig, que se resume no seguinte: lava-se uma vez em soluto fisiológico e por centrifugação a 2.500-3.000 r/m. durante 8-10 minutos o sedimento contendo amebas. Junta-se depois, a êsse sedimento, álcool absoluto na proporção de 1 de sedimento para 7,5 volumes, de álcool absoluto, conforme preconiza Craig. Coloca-se o todo em frasco estéril contendo pérolas de vidro para facilitar a fragmentação dos trofozoitos.

Êste extrato alcoólico de amebas deverá permanecer quinze dias na estufa a 37°C., tendo-se o cuidado de agitá-lo 2-3 vezes por dia. Filtra-se em papel de filtro, obtendo-se finalmente o antígeno.

CONCLUSÕES

Pelo exposto é lícito concluir:

1.º — que é possível a obtenção de cultura de Endameba histolítica em meio preparado a partir dos soros de boi, cavalo, carneiro ou de coelho;

2.º — que a adição a êsses meios, de uma pequena parcela de coágulo de sangue de boi, previamente aquecido, enriquece grandemente as primo-culturas, o mesmo acontecendo com os repiques, quando ao meio se adiciona fragmentos de sôro coagulado de cavalo, suspensos em sôro fisiológico;

3.º — que os meios de cultura por nós preparados e alguns apenas modificados, prestam-se não só às culturas iniciais de Endameba histolítica, partindo de cistos isolados de fezes, como também ao repique das formas vegetativas já desenvolvidas;

4.º — que pelos repiques sucessivos obtêm-se culturas de Endameba histolítica razoavelmente puras e com um número tal de unidades vegetativas que poderá atingir numa gota de material, a cifra de 140 por campo microscópico (obj. 40, oc. 3b);

5.º — que dada a sua facilidade, este método cultural apresenta-se vantajoso sempre que houver dúvidas referentes à identificação direta dos cistos de ámebas;

6.º — que é possível obter-se de culturas ricas, a *Endameba histolítica* em estado sêco;

7.º — que este pó de *Endameba histolítica* presta-se à preparação de um antígeno para reações de fixação do complemento, mais puro e ativo e sem o cheiro repugnante característico das preparações semelhantes até então conhecidas.

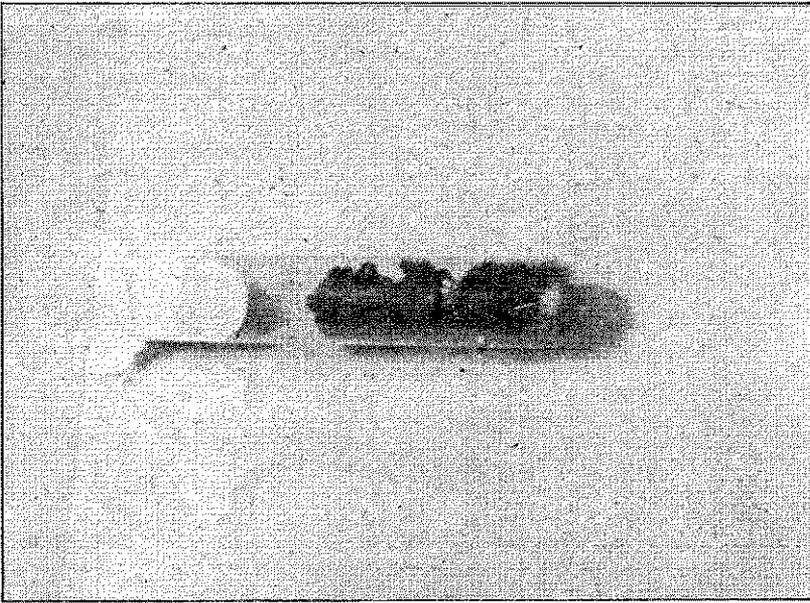
AGRADECIMENTOS

Nosso trabalho não tem outro mérito além daquele a que possa porventura aspirar um técnico de laboratório, habituado à prática cotidiana da protozoologia intestinal humana. Assim, se êle lograr ser objeto de algum interesse, embora mínimo, por parte dos cientistas, dar-nos-emos por muito bem pago de todo o esforço dispendido na sua elaboração.

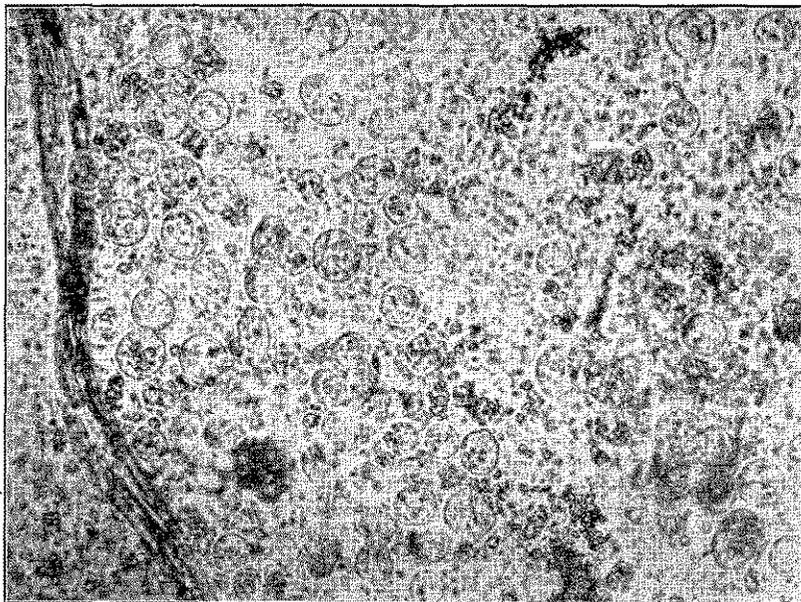
Exercendo nossa atividade num ambiente científico onde a curiosidade, por mais modesta que seja, encontra sempre carinhoso agasalho, conseguimos realizá-lo e hoje publicá-lo.

Esse desiderato, porém, não seria certamente conseguido, se não contássemos, nos momentos de incertezas e de dúvidas, com as luzes e a infinita bondade de alguns mestres do Instituto e, também com a boa vontade e o desinteressado auxílio de alguns colegas de trabalho.

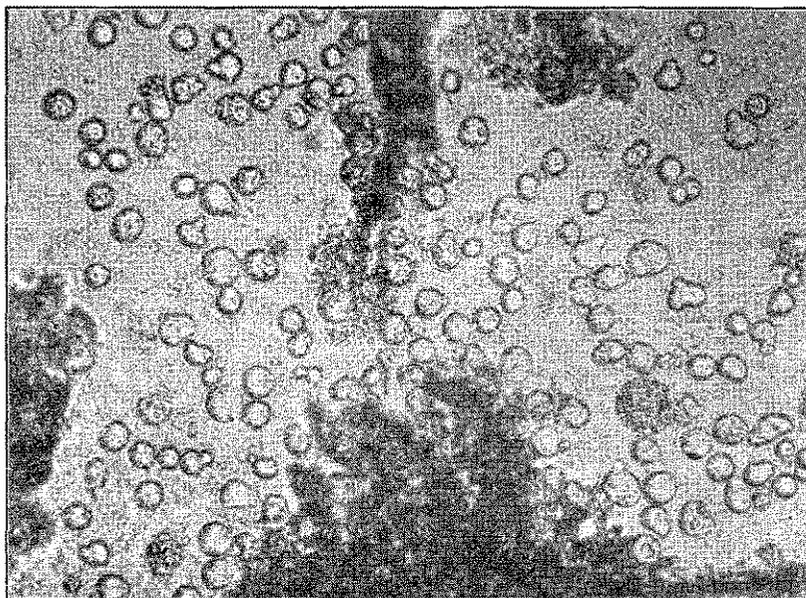
Deixamos, pois, aqui consignada tôda a nossa imperecível gratidão aos ilustres Drs. Bruno Rangel Pestana, Luiz de Sales Gomes, Augusto de E. Taunay, Marcelo O. Álvares Corrêa, ao Sr. Ettore Rugai e também, aos presados colegas Srs. Gabriel Garcia de Figueiredo, Antônio Amorosino, Alexandre Malvéstio, Adrião Neves de Moraes, Neli Braga de Macedo e Vail Natali.



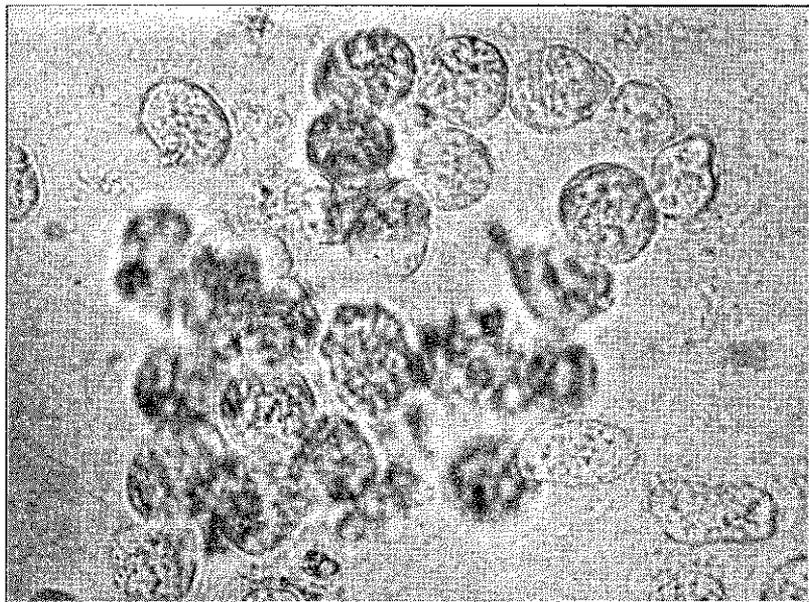
FOTOGRAFIA N.º 1



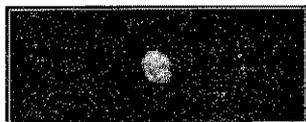
MICROFOTOGRAFIA N.º 1



MICROFOTOGRAFIA N.º 2



MICROFOTOGRAFIA N.º 3



FOTOGRAFIA N.º 2

SOROS ANTIANAERÓBIOS

ARIOSTO BÜLLER SOUTO

do Instituto Adolfo Lutz

CELSO RODRIGUES

do Instituto Biológico de São Paulo

“Para consagrar o acerto e a realização daqueles dispositivos preciosos do nosso Regulamento, não há senão apelar para um esforço de conjunto, afim de que todos os nossos laboratórios, pelo menos aqueles que têm sobre os ombros o peso dos encargos oficiais, se inscrevam na tarefa de proteger, amanhã, os interesses da coletividade, empenhando-se num entendimento mútuo sobre o que poderá constituir, tão solidamente quanto o ficar provado, as bases de uma uniformização de técnicas”. ARLINDO DE ASSIS.

Esclarecimentos necessários relativos à uniformização de técnicas oficiais para o controle e à interpretação da dosagem dos soros antigangrenosos e antitetânicos, nos Institutos Estaduais de Controle, constituem o motivo do presente trabalho.

I — SORO ANTIGANGRENOSO

Diante de um caso de gangrena gasosa, existe sempre a incerteza quanto ao agente etiológico responsável e, portanto, quanto à antitoxina específica a ser empregada.

Devido à complexidade da flora da gangrena gasosa, o soro antigangrenoso dificilmente poderá conter tôdas as substâncias protetoras específicas contra os agentes infectantes encontrados nas infecções gangrenosas. E' porém necessário que contenha os anticorpos específicos contra os germes mais frequentes, tais como: o *Clostridium Welchii*, o *Clostridium septicum*, o *Clostridium Novyi*, o *Clostridium Sordellii*, o *Clostridium sporogenes* e outros. O efeito flora das gangrenas gasosas, agentes secundários, tais como o *Clostridium sordellii*, o *Clostridium sporogenes* e outros. O efeito

coadjuvante que resulta da coexistência dessas espécies microbianas em simbiose, explica, pelo sinergismo microbiano, a gravidade insólita que apresentam certas infecções gangrenosas. Essa sinergia de efeitos tóxicos tem grande importância, na evolução de certos tipos de gangrena gasosa.

Daí a importante consequência terapêutica resultante da concorrência dos antisoros específicos monovalentes antigangrenosos no soro polivalente. A ação reforçadora desses antisoros é do mais alto interesse, tanto na profilaxia, como no tratamento das feridas fortemente contaminadas.

Os antisoros antigangrenosos monovalentes agem sinèrgicamente, reforçando-se reciprocamente no soro polivalente. A *cataxia*, a *paraespecificidade dos soros* e a *sinergia* dos anticorpos, permitem explicar essa ação coadjuvante dos soros gangrenosos monovalentes nos soros polivalentes.

Denomina-se *cataxia* à ruptura de atividade da associação microbiana, isto é, do sinergismo microbiano, quando se neutraliza a toxina do germe dominante da infecção pelo antisoro específico, permitindo ao organismo dominar eficazmente os germes secundários de menor atividade no processo mórbido.

Na explicação do mecanismo da ação *paraespecífica do soro* é admitida a hipótese seguinte: os soros polivalentes exercem uma dupla ação — 1.º pelos anticorpos específicos de que são dotados; 2.º pelos anticorpos “normais” ou “inespecíficos” presentes no soro de grande número de espécies animais. Esses anticorpos “normais” ou “inespecíficos” são, em muitos casos, eficientes para ajudar o organismo a combater os germes secundários de associação. Além disto, os anticorpos “normais” ou “inespecíficos” existentes nos soros, reforçam de maneira considerável, o efeito dos anticorpos específicos que entram na composição do soro polivalente. Torna-se assim, o soro polivalente, muito mais ativo, pela ação *sinérgica* desses anticorpos “normais” ou “inespecíficos”.

* * *

Tendo em conta a maior frequência do *Clostridium Welchii* na flóra das gangrenas, êle é considerado como o agente principal dessa infecção. Esta espécie é muito espalhada na natureza: foi encontrada em 100% das amostras de terra examinadas em 1917, em tôdas as frentes de batalha; foi encontrada em cerca de 99% das fezes humanas e em 90% dos casos de apendicite.

A rigor não existe um *Clostridium Welchii*, porém um grupo dessas bactérias. No grupo *Welchii*, o tipo humano é designado como tipo A, o tipo B é o *Clostridium agni*, o tipo C é o *Clostridium paludis* e o tipo D é o *Clostridium ovitoxicus*. Somente o tipo A, por suas propriedades toxicológicas e sorológicas oferece interesse na patologia humana.

O *Clostridium Welchii* tipo A produz uma exotoxina verdadeira, termolábil, neutralizada pela antitoxina específica; produz também, nos meios glicosados, um veneno de ação aguda, não específico, capaz de matar instantaneamente os camundongos inoculados por via venosa. A toxina verdadeira possui diferentes fatores tóxicos:

a) hemotóxicos: hemolisinas, hemoaglutininas, leucoaglutininas;

b) não hemotóxicos: neurotóxicos, miotóxicos, hepatóxicos,

A imunização de animais com a exotoxina *Welchii* tipo A, rica de diferentes componentes tóxicos, produz um soro antitóxico específico capaz de neutralizar esses componentes tóxicos nos seus efeitos hemolítico, necrosante e na toxicidade geral.

Baseia-se o processo de dosagem do soro antitóxico na neutralização de alguns desses efeitos tóxicos. Foi verificada a possibilidade de certos desses fatores tóxicos não estarem presentes na toxina que serviu para a produção da antitoxina específica. É lógico que, estando ausentes, esses fatores tóxicos, não produzirão os fatores antitóxicos correspondentes. Assim, os soros que contenham somente alguns fatores antitóxicos, jamais poderão neutralizar a totalidade dos fatores tóxicos, tanto "in vitro" como "in vivo". E isto é possível verificar experimentalmente. Com efeito, as dosagens feitas em animais, pelos mesmos métodos e com os mesmos soros, mas não com as mesmas toxinas, podem fornecer resultados discordantes, ultrapassando grandemente os limites do erro. Porém, se forem sempre empregados nessas dosagens os mesmos métodos e "toxinas equivalentes", serão obtidos resultados estatisticamente aceitáveis, tendo em conta o número de animais empregados.

É possível afastar, em grande parte, as diferenças de resultados observadas, quando se realizam as medições de antitoxinas por meio de toxinas cujo conteúdo de fatores tóxicos é equivalente.

O efeito tóxico da toxina do *Clostridium Welchii* foi primeiramente atribuído à toxina hemolítica "alfa" sendo, posteriormente, ligado à toxina "beta". A toxina "beta" é presentemente aceita

como sendo o fator principal da intoxicação perfríngica, representando a toxina “alfa” um fator de importância secundária. Esses diversos fatores são produzidos desigualmente pelas diferentes amostras de *Clostridium Welchii*, variando grandemente a sua proporção nas diferentes toxinas, o que permite explicar as diferenças dos resultados das dosagens de antitoxinas quando se empregam toxinas não equivalentes produzidas por amostras de *Clostridium Welchii*.

Nós consideramos como “toxinas equivalentes” as toxinas ricas de “toxina beta” e, para as dosagens do soro anti *Welchii* aconselhamos empregar só toxinas cujo conteúdo de “alfa toxina” — proporcionalmente ao conteúdo de “beta toxina” — seja diminuto. Somente com essas toxinas é permitido esperar determinações uniformes do poder neutralizante dos soros em relação à toxina “beta”. Toxinas ricas de fator “alfa” produzem resultados duvidosos nas dosagens não dando títulos reais e sim títulos aparentes.

O teor de toxina “alfa” poderá ser dosado pela verificação do conteúdo de hemolisinas “in vitro”.

Assim, só deverão ser empregadas, quer no preparo quer na dosagem dos soros anti *Welchii*, toxinas sem ou com ação hemolítica muito reduzida.

Não se pôde confirmar a hipótese de que com o uso de toxinas oriundas de culturas de amostras “unicelulares” os resultados seriam mais exatos.

Contudo, os resultados mais exatos ainda são obtidos quando se emprega a mesma amostra de germe toxigênico e se utilizam técnicas uniformes no preparo do meio de cultura e da toxina.

O emprêgo de meios de cultura de composição uniforme, permite obter toxinas de composição mais constante em relação aos seus diferentes fatores tóxicos.

Ao lado do soro anti *Welchii*, entram na composição do soro antigangrenoso polivalente vários outros soros monovalentes; assim, o soro anti *Clostridium septicum* é ativo contra a toxina e produtos tóxicos desse germe.

O *Clostridium septicum* produz uma exotoxina genuína que atua quase sem período de incubação. Doses tóxicas sublimiares nada produzem no animal de experiência, ao passo que, doses ligeiramente superlimiares produzem 100% de mortes. Esses efeitos tóxicos da toxina *Clostridium septicum* que seguem a lei do tudo ou nada, foram bem verificados por Lautenschläger e por nós.

O *Clostridium Novyi* é outro agente primário da gangrena gasosa. Nos meios de cultura esse germe produz exotoxina após 5 a 6 dias de incubação. A toxina do *Clostridium Novyi*, quando inoculada on animal de laboratório, necessita certo período de latência antes de fazer aparecer os sintomas de intoxicação.

O *Clostridium histolyticum* é considerado, por certos autôres, como agente secundário da gangrena gasosa. A toxina do *Clostridium histolyticum* produz no corpo humano e nos animais de laboratório as lesões mais terríveis observadas na gangrena gasosa. Para a toxina histolítica não existem barreiras. Transforma tudo em um líquido sanguinolento.

No preparo do sôro antigangrenoso, reúnem-se as diferentes antitoxinas monovalentes para os diferentes germes da gangrena, obtidas separadamente. Para essa reunião de antisoros monovalentes, toma-se por base a frequência relativa dos germes anaeróbios nas gangrenas gasosas. Assim, a antitoxina do *Clostridium Welchii* que é observado em 60 a 80% dos casos, entra em maior proporção e, as antitoxinas do *Clostridium Novyi*, presente em 5 a 35%, do *Clostridium septicum*, em 15 a 30% e do *Clostridium histolyticum*, em 2%, entram em quantidades proporcionalmente decrescentes.

Este método de mistura das antitoxinas monovalentes, para o preparo do sôro polivalente, é um método simplista sujeito a críticas. Notadamente se considerarmos que nenhum trabalho foi feito entre nós, para comprovar, nos casos de gangrena gasosa, da exatidão das frequências relativas dos diferentes agentes etiológicos.

* * *

Passemos agora à questão relacionada com a interpretação dos títulos de dosagens do sôro antigangrenoso.

Um dos grandes problemas relativos à soroterapia antigangrenosa é o título de dosagem dos soros do comércio, isto é, do seu conteúdo real em antitoxina.

Na "Conferência Cirúrgica Inter-Aliada sôbre a Gangrena Gasosa", Wright já se admirava e, com justa razão, que os cirurgiões empregassem soros antigangrenosos sôbre os quais não possuíam qualquer indicação quanto ao conteúdo antitóxico.

Os trabalhos sôbre os soros antigangrenosos empregados na guerra, vieram demonstrar que os mesmos eram absolutamente fracos e que alguns soros alemães não possuíam qualquer valor anti-

tóxico específico. Prigge (1937) antes de ser iniciada a presente guerra, por ordem do Ministério da Guerra da Alemanha, tendo em conta as necessidades daquela nação, controlou os estoques dos soros antigangrenosos existentes no mercado alemão e verificou que vários desses soros examinados não continham antitoxina alguma.

Daf a conclusão de Prigge (1937) porquê, até agora, não foi possível julgar do justo valor profilático e terapêutico do soro antigangrenoso.

Com raras exceções, no Brasil os soros antigangrenosos em geral estão sofrendo contrôlo deficiente de dosagem pelos laboratórios comerciais, devido às dificuldades técnicas e à falta de técnicos especializados.

Vários laboratórios nacionais nos enviam consultas frequentes sobre a interpretação do resultado das dosagens dos soros antigangrenosos. A êste respeito as publicações sobre o preparo do soro antigangrenoso são omissas. Nada consta nas "Vorschriften für die Staatliche Priifung des Gasbrand (perfringens) Sera" — do Ministério da Guerra da Alemanha, de 1937.

Prigge (1937), em sua publicação "Uber Wirksamkeit und Antitoxingehalt des Gasbrandseruns" nada esclarece a êste respeito. Na monografia que um de nós publicou com Rivarola "Preparacion del suero antigangrenoso" (Souto e Rivarola, 1938) não abordámos o assunto.

Bengtson (1931, 1934, 1936), nos vários padrões oficiais dos Estados Unidos, relativos aos soros antigangrenosos, não se deteve sobre a questão.

No estudo comparativo dos padrões antigangrenosos soviéticos e internacionais, Glotova (1937) é omissa a êsse respeito.

Jensen (1936), Hartley e White (1935), Walburn e Reymann (1935, 1936), Weinberg, Davesne e Prevot (1932), Weinberg e Guillaumie (1936, 1937) e os numerosos "Rapport de la Comission Permanente de Standartisation Biologique" (1931, 1935) não trataram da interpretação do resultado das dosagens dos soros antigangrenosos.

Estabelecendo as técnicas padrões para dosagem do soro antigangrenoso, a "Comissão Permanente de Padronização Biológica da Organização de Higiene da Liga das Nações" recomendou sua adoção oficial.

Glotova (1937) criticou nessas técnicas as unidades e a via de introdução adotadas para certos soros e Weinberg (1936) verificou

que os títulos antitóxicos obtidos em certos soros eram aparentes e não reais.

A interpretação dos títulos de dosagem dos soros antigangrenosos é, pois, uma das razões da presente nota. Vamos definir primeiramente as unidades, as test-dose e, depois, a interpretação dos resultados, não passaremos em revista a questão da preparação e da dosagem do soro, porquê, em trabalho anterior, um de nós (Souto e Rivarola, 1938), já tratou longamente desse assunto.

A Comissão de Padronização Biológica assim especificou as diferentes unidades:

- a) para o *Clostridium Welchii*, unidade antitóxica é a atividade antitóxica exercida por 0,322 mg. da antitoxina sêca e estável, conservada no "National Institute of Health" de Washington;
- b) para o *Clostridium septicum*, unidade antitóxica é a atividade antitóxica e específica exercida por 0,2377 mg. da antitoxina sêca e estável conservada no "Institute Pasteur" de Paris;
- c) para o *Clostridium Novyi*, a unidade antitóxica é a atividade antitóxica exercida por 0,2681 mg. da antitoxina sêca e estável, conservada no "Statens Serum Institute" de Copenhagen;
- d) para o *Clostridium histolyticum*, unidade antitóxica é a atividade antitóxica exercida por 0,3575 mg. da antitoxina sêca e estável, conservada no "Statens Serum Institute" de Copenhagen.

Essas preparações sêcas e estáveis ou padrões (standards) são conservadas também em outros Institutos Oficiais de Contrôlo.

As quantidades especificadas nas definições representam a *unidade de antitoxina*.

Quantidades rigorosamente pesadas dessas preparações sêcas e estáveis, dissolvidas em mistura de duas partes de glicerina, duplamente destilada, e uma parte de salina a 0,85%, constituem os solutos padrões. Esses solutos padrões são enviados periodicamente pelos Institutos Oficiais de Contrôlo aos laboratórios interessados no preparo dos soros antigangrenosos. Os solutos padrões, conservados na obscuridade e à temperatura de 0 a 5°C., segundo verificamos, mantêm-se estáveis até 10 meses, não devendo ser usados, porém, além do prazo prescrito pelo Instituto remetente.

Os soros antigangrenosos são titulados em unidades internacionais, com a mesma exatidão que os demais soros padronizados. Baseia-se o processo de dosagem em animal, na comparação do efeito de um *soluto padrão*, e do sêro a ser examinado, em relação a test-dose da toxina. As definições das test-doses de toxinas variam de acôrdo com as toxinas em consideração.

Vamos definir rapidamente as várias "test-doses":

I — *Clostridium Welchii* (*perfringens*) — A test dose internacional (Lt) de toxina *Welchii* é a quantidade de toxina *Welchii* que, misturada a 1/5 de unidade antitóxica internacional de antitoxina padrão anti-*Welchii*, provoca a morte de alguns, porém não de todos os camondongos, de 17 a 20 grs., inoculados por via venosa.

A test dose francesa — (Weinberg e Guillaumie (1936)), de toxina *Welchii* é a quantidade de toxina *Welchii* que, misturada a uma unidade antitóxica de antitoxina padrão anti *Welchii* (de fabricação francesa), provoca a morte da metade dos camondongos inoculados.

Essas duas definições diferem do que se entende por *unidade de toxina* que é a quantidade correspondente a 20 D.M.L. de uma dada toxina *Welchii*. Se o título antitóxico de um sêro anti *Welchii* fôr determinado com auxílio da unidade de antitoxina, êste título é geralmente, inferior ao que se obtém quando se utiliza a test dose (Lt) de toxina, pois a test dose (Lt) de toxina tem, em geral, um valor inferior a 20 D.M.L.

Não é aconselhável adotar a unidade de toxina como base para determinações porquê a mesma está baseada na definição da D.M.L. A definição da D.M.L. pode ser motivo de controvérsia. Se a maioria dos autores admitem como D.M.L. a quantidade de toxina que mata cêrca de 50% dos camondongos inoculados com o pêso variante entre 17 e 20 grs., outros, como Benzoni (1938) consideram a D.M.L. como a menor quantidade de toxina que mata 100% dos camondongos de 17 grs. de pêso; assim estas divergências são susceptíveis de ocasionar diferenças muito acentuadas nos resultados finais.

II — *Clostridium septicum* (*oedematis* — *maligni*) — A test dose (Lt) de toxina *Clostridium septicum* é a quantidade de toxina que, misturada a uma unidade antitóxica internacional

de antitoxina padrão anti-*Clostridium septicum*, provoca a morte de alguns, porém, de nem todos os camondongos de 17 a 20 grs., inoculados por via venosa.

III — *Clostridium Novyi (oedematiens)* — Test-dose (Lt) de toxina *Novyi* é a quantidade de toxina *Novyi* que, misturada a dois centésimos de unidade antitóxica internacional de antitoxina padrão anti-*Clostridium Novyi*, provoca a morte de alguns mas não de todos os camondongos de 17 a 20 grs., inoculados por via muscular.

IV — *Clostridium histolyticum* — Test dose (Lt) de toxina *histolyticum* é a quantidade de toxina *histolyticum* que, misturada a uma unidade antitóxica internacional de antitoxina padrão, anti-*Clostridium histolyticum*, provoca a morte de alguns, mas não de todos os camondongos de 17 a 20 grs., inoculados por via venosa.

Pela própria natureza dessas definições, verifica-se a necessidade de serem sempre empregadas séries grandes de animais reativos. A sensibilidade dos animais à toxina gangrenosa influe grandemente nos resultados obtidos e varia, em certos pontos, da mesma maneira que a sensibilidade dos animais reativos varias em relação a toxina tetânica, conforme um de nós teve ocasião de demonstrar em colaboração com Von Ubish (1939).

O fator individual só poderá ser menos presado, se forem empregadas séries grandes de animais, capazes de assegurar resultados estatisticamente aceitáveis. Infelizmente isto é extremamente difícil, dentro das possibilidades práticas. Assim, o uso de pequenas séries de animais, o único aplicável dentro das finalidades de rotina, está sujeito a erros.

Nem sempre é possível esperar que sobrevivam 50% dos animais inoculados e que morram 50% nas séries animais; o número de sobreviventes poderá ser bastante variável: assim, por exemplo, si empregamos séries de 6 animais poderemos ter: 2/6, 4/6, e até 1/6. Estas variações devem ser tomadas em consideração quando se organizam os coeficientes morte-sobrevida.

São considerados dosando bem os soros que, comparados com o sôro padrão, protegem um número maior de animais ou número aproximado àqueles protegidos pelo sôro padrão. Essa comparação é impossível quando todos os animais testemunhas morrem ou

quando todos os animais sobrevivem. É, pois, necessário usar várias séries de testemunhas: séries inoculadas com quantidades de toxinas exatamente correspondentes à test-dose e ao sôro padrão e séries com quantidades mínimas de toxina, superiores e inferiores à test-dose empregada.

Passemos agora a interpretar os resultados das dosagens baseados nas definições descritas acima.

Antitoxina Welchii

1 cm³ da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.

Diluindo 1 cm³ da antitoxina padrão em 19 cm³ de salina, obtém-se uma solução em que 1 cm³ contém uma unidade, donde 0,2 cm³ contém 1/5 de unidade. Assim, 0,2 cm³ da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camundongos inoculados, é equivalente a 1/5 de unidade do sôro padrão.

Antitoxina septicum

1 cm³ de antitoxina padrão internacional contém 50 U. I.

Diluindo 1 cm³ da antitoxina padrão em 9 cm³ de salina, obtém-se uma diluição em que 1 cm³ contém 5 unidades, donde 0,2 cm³ contém uma unidade. Assim, 0,2 cm³ da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camundongos inoculados, sendo equivalente a 1 unidade padrão, 1 cm³ do sôro em prova equivale a 5 unidades.

Antitoxina histolyticum

1 cm³ da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.

Diluindo 1 cm³ da antitoxina padrão em 3 cm³ de salina, obtém-se uma solução em que 1 cm³ contém 5 unidades, donde 0,2 cm³ contém uma unidade. Assim, 0,2 cm³ da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camundongos inoculados, sendo equivalente a 1 unidade padrão, 1 cm³ do sôro em prova equivale a 5 unidades.

Antitoxina Novyi

1 cm³ da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.

Diluindo 1 cm³ da antitoxina padrão em 99 cm³ de salina, obtém-se uma solução em que 1 cm³ contém 0,2 unidades. Assim 0,1 cm³ da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camondongos inoculados sendo equivalente a 0,02 unidade padrão, 1 cm³ do sôro em prova equivale a 0,2 unidade padrão, 1 cm³ do sôro em prova equivale a 0,2 unidade e 5 cm³ equivalem a uma unidade.

* * *

Achamos útil adotar como base para uniformização das técnicas para o exame oficial dos soros antigangrenosos, nos Institutos oficiais, as instruções que o Ministério da Guerra da Alemanha fez expedir para o exame oficial do sôro antigangrenoso anti *Welchii*. Essas instruções poderão servir também como norma diretriz para o exame oficial dos demais soros antigangrenosos nos Institutos Estaduais de Contrôlo e de base para uniformização da técnicas.

ANEXO

*Instruções para o exame oficial dos soros gangrenosos
(Welchii)*

- § 1. (1) Os soros contra a toxina do principal causador da gangrena (*Cl. welchii*) ou que contêm um componente contra a toxina deste germe, deverão ser entregues, antes de postos no mercado, ao exame oficial.
- (2) Os soros gangrenosos (*Welchii*) que contêm um componente antitóxico já oficialmente examinado, serão provados segundo as instruções a este respeito. O exame será completado pela medição do valor indicada sob § 13.
- § 2. (1) Os soros não devem conter mais de 0,5% de fenol ou 0,4% de tricresol. Tôdas as adições devem ser feitas antes da entrega do produto aos fiscais oficiais.
- (2) O sôro deve conter no mínimo 100 unidades de antitoxina gangrenosa (*Welchii*) em 1 cm³.

Entrega para o exame oficial

- § 3. (1) A pedido do fabricante o fiscal oficial deve proceder ao exame oficial dos soros.
- (2) O fiscal recebe o soro a ser examinado em um recipiente com número de controle, dando um recibo e registrando a entrada em seu livro oficial.
- § 4. (1) Se o soro é preparado de tal maneira, que as mesmas misturas são feitas em diversos recipientes, o fiscal deve controlar o preparo das misturas, convencendo-se de sua igualdade completa, afim de dar aos recipientes o mesmo número de controle. Neste caso ele deve registrar no seu livro oficial os números das operações de cada porção e anotar a composição das misturas feitas em sua presença.
- (2) Se uma quantidade maior de soro é distribuída em vários recipientes, a distribuição também deve ser feita na presença do fiscal, afim de se dar o mesmo número de controle às diversas porções. Sobre esta distribuição feita em sua presença, o fiscal deve fazer registros exatos em seu livro.
- § 5. (1) Para o exame oficial deve retirar-se de cada soro na presença do fiscal:
- a) 6 amostras de sempre 5 cm³;
 - b) 4 amostras de sempre 10 cm³;
 - c) 4 amostras de sempre 5 cm³;
- colocando-as em recipientes estereis.
- (2) Quando o soro for entregue em vários recipientes originais ao fiscal, deve retirar-se as amostras mencionadas sob a) e b) de cada recipiente, marcando-as correspondentemente. As amostras mencionadas sob c) devem conter uma mistura composta de partes iguais do conteúdo dos vários recipientes.
- § 6. Os frascos com as amostras devem ser lacrados, antes da entrega ao Instituto Estadual de Controle, em presença do fiscal e providos de uma etiqueta, indicando o nome exato do soro, número de controle e, na conservação do estoque em diferentes recipientes originais, a indicação exata do recipiente de conservação e o dia de retirada das amostras.

§ 7. O laboratório onde foi feito o sôro deve mandar acompanhar a remessa por um cartão do modelo A, que deve conter indicações exatas quanto ao teor de fenol e tricresol, esterilidade, o comportamento na experiência animal e o teor de antitoxina do sôro. Além disso, devem ser anotados os números e as espécies dos animais, dos quais foi tirado o sôro, a quantidade, o conteúdo e as marcas dos recipientes de conservação; o fiscal deve conferir o cartão, passando o visto. Se se tratar de soros entregues ao fiscal em vários recipientes originais, o Instituto Estadual de Controle exigirá indicações complementares quanto ao preparo e composição das misturas.

§ 8. Depois de retiradas as amostras os recipientes devem ser lacrados em presença do fiscal e conservados em uma sala sob a responsabilidade dêste.

Exame oficial

§ 9. O sôro deve ser claro, mostrando muito pouco sedimento; sôro com turvação nítida, permanente, ou com sedimento grande não pode ser admitido.

§ 10. Cada sôro deve ser examinado quanto ao seu teor de albumina; êste não pode exceder 12%. A determinação do teor de albumina é feita segundo os métodos químicos comuns.

§ 11. (1) Para o exame da esterilidade deve colocar-se sempre 4-5 gotas de sôro em:

- a) um tubo de ágar-peptona de carne;
- b) um tubo de ágar-glicosado (camada alta);
- c) um tubo de caldo de cultura;
- d) um tubo de caldo glicosado
- e) um tubo de caldo de fígado,

misturando-se bem com o meio de cultura. O conteúdo do primeiro tubo é colocado em placa.

- (2) As culturas a), b), c), e d), devem ser observadas durante 6 dias na estufa a 37°C. A cultura e) deve ser incubada durante 10 dias sob isenção de oxigênio a 37°C. Se durante êste tempo se desenvolverem germes no sôro, êste deve ser recusado.
- (3) Se no exame bacteriológico o conteúdo de um dos recipientes se mostrar contaminado, enquanto que

as amostras retiradas dos outros recipientes se mostram estéreis, só não se deve admitir o recipiente do qual fôra retirada a amostra contaminada.

- § 12. (1) Para a verificação do teor de substâncias impedi-
dentes (antisépticas) inoculam-se subcutanea-
mente 0,5 cm³ do sôro em um camondongo. Se o
animal apresentar sintomas, dos quais se deduz
uma porcentagem elevada de fenol ou tricresol no
sôro, ou conteudo elevado de substâncias tóxicas,
não se deve admitir êste sôro.
- (2) Para o exame da inocuidade inoculam-se, além dis-
so, por via subcutânea, 10 cm³ de sôro em cobaia.
O animal não deve apresentar sintomas de infec-
ção durante os 6 dias consecutivos.
- (3) Se o conteudo de um recipiente se mostrar nocivo,
deve recusar-se todo o sôro.
- § 13. (1) Como padrão para a medição do valor serve um
sôro Standard de conteudo antitóxico exatamente
conhecido, conservando em porções sêcas e em tu-
bos de vácuo no Instituto Estadual de Controle.
Quantidades bem dosadas dêsse sôro standard são
dissolvidas em uma mistura de duas partes de gli-
cerina duplamente destilada e uma partê de solu-
ção fisiológica a 0,85% de maneira a se formar
uma solução mãe, contendo 50 unidades antitóxicas
por 1 cm³.
- (2) Como toxina test serve uma toxina sêca retirada
de culturas micromanipuladas de bacilo gangrenoso
(*Cl. welchii*) de atividade sempre igual, se-
cada em porções, dividida e colocada em tubos de
vácuo. Como toxinas test empregam-se toxinas
sêcas que, na experiência do tubo de ensaio, não
possuem nenhum ou muito pequeno efeito hemolí-
tico contra as hemátias de carneiro.
- (3) Como dose de exame emprega-se a dose L + 50
(0,2 de unidade antitóxica) da toxina padrão, isto
é, uma dose de toxina que, após mistura com 0,2
de unidade antitóxica, produz morte dentro de 48

horas em mais ou menos metade dos animais de experiência. Para sua determinação misturam-se quantidades gradativas da toxina padrão com 0,2 unidades antitóxicas no volume de 0,5 cm³, injetando-se após conservação durante 1 hora em temperatura ambiente, em camundongos brancos de 16-18 grs. de pêso, por via intravenosa. O valor médio determinado por experiências realizadas em épocas diferentes do ano deve ser empregado como test dose de exame.

- (4) Para realização do exame dissolvem-se porções dosadas da toxina test em uma quantidade de solução tampão isotônica de cloreto-fosfato de sódio (blutisotonische Kochsalz-Phosphat Pufferlösung), medidas com pipetas padrão (pH = cêrca de 7,3), de maneira tal, que em 1 cm³ esteja contido o quádruplo da dose necessária para o exame.
- (5) Do soluto mãe do sôro standard faz-se uma diluição com soluto tampão, usando pipetas padrão de maneira que em 1 cm³ esteja contida uma unidade antitóxica.
- (6) Da mesma forma faz-se uma diluição do sôro a ser examinado, que corresponde aproximadamente à indicação do valor expresso pelo fabricante, devendo conter cada 1 cm³, 1 unidade antitóxica.
- (7) Para a determinação do valor misturam-se quantidades de 0,25 — 0,22 — 0,20 — 0,18 e 0,16 cm³ da diluição feita dos solutos mãe do sôro standard, correspondendo a 0,25 — 0,22 — 0,20 — 0,18 e 0,16 unidades antitóxicas e quantidades iguais da diluição feita do sôro a ser examinado, sempre contido no mesmo volume de líquido (0,25 cm³), com 0,25 cm³ do soluto da toxina test. As diversas misturas são injetadas, após conservação durante uma hora em temperatura ambiente, em camundongos brancos do pêso de 16-18 grs. por via intravenosa. Para o exame de cada mistura devem ser usados seis camundongos.

(8) Por conseguinte recebem:

Camondon- gos Série	Diluição de sôro (VO 1:0,25 cm ³)	Soluto de toxina
1	2	3
1	Sôro Standard 0,25 cm ³ = 0,25 UA ⁽¹⁾	0,25 cm ³ (Test - dose)
2	" " 0,22 cm ³ = 0,22 UA	0,25 cm ³ " "
3	" " 0,20 cm ³ = 0,20 UA	0,25 cm ³ " "
4	" " 0,18 cm ³ = 0,18 UA	0,25 cm ³ " "
5	" " 0,16 cm ³ = 0,16 UA	0,25 cm ³ " "
6	Sôro examinado 0,25 cm ³	0,25 cm ³ " "
7	" " 0,22 cm ³	0,25 cm ³ " "
8	" " 0,20 cm ³	0,25 cm ³ " "
9	" " 0,18 cm ³	0,25 cm ³ " "
10	" " 0,16 cm ³	0,25 cm ³ " "

(9) O tempo de observação dos animais é de dois dias. Se durante êste período o sôro examinado proteger um número maior, ou, mais ou menos o mesmo número de animais com vida que o sôro standard, é aprovado com a indicação do valor dada pelo fabricante. O sôro examinado que conservar menor número de animais com vida que o sôro standard, deverá ser recusado.

§ 14. (1) Quando o sôro é conservado em vários recipientes originais, deve proceder-se ao exame indicado sob § 11 e 12 com amostras de cada recipiente.

(2) O exame descrito sob § 13 de um sôro conservado em diversos recipientes, é feito uma só vez com as amostras indicadas sob § 5 c).

Distribuição do sôro

§15. O Instituto Estadual de Controle comunica o resultado do exame oficial ao fabricante, enviando-lhe o boletim do modelo B.

(1) UA = unidade antitóxica.

§ 16. (1) O fiscal oficial é responsável para que os soros gangrenosos (*Welchii*) oficialmente examinados sejam postos no comércio com rótulo “aprovado oficialmente”, desde que o exame tenha sido satisfatório.

(2) A retirada do sêlo de chumbo dos recipientes originais, o enchimento das empolas e o lacramento destas só podem ser feitos na presença do fiscal e segundo as determinações de suas indicações oficiais.

§ 17. Na etiqueta das empolas devem constar as seguintes indicações:

- a) local da fabricação (fabricante);
- b) nome exato do sôro;
- c) número de contrôle;
- d) indicação do valor;
- e) o rótulo “aprovado oficialmente”, como também a indicação do local e data do exame;
- f) até que data o sôro pode ser empregado (§ 20).

§ 18. O sôro que à base do exame oficial foi verificado não corresponder às exigências, é devolvido pelo fiscal ao fabricante, registrando-se o fato no livro oficial.

§ 19. O Instituto Estadual de Controle deve ordenar a retirada imediata de um sôro, cujo reexame mostrou uma diminuição do teor antitóxico de mais de 10% abaixo do valor indicado originalmente ou, então, se uma outra verificação qualquer coíbe a aplicação do sôro.

§ 20. Os soros examinados oficialmente são retirados em série do mercado, por ordem do Instituto, depois de três anos a contar da data do exame, devido ao vencimento do tempo de garantia certificada oficialmente.

§ 21. Nas farmácias não pode ser conservado ou vendido sôro, cuja retirada do mercado já tenha sido publicada.

MODELO A

CARTÃO N.º

PARA O INSTITUTO ESTADUAL DE CONTRÔLE

do sôro gangrenoso enviado por
em..... de..... de.....
N.º de contrôle (livro oficial).....
Denominações (número dos animais doadores de sôro)
.....
Dia da sangria
Quantidade de sangue
Quantidade total de sôro
Denominação e conteudo dos recipientes diversos
Quantidade de sôro enviada para exame
Espécie e quantidade de substâncias impiedientes adicionadas
.....
Resultado do exame no local de preparo:
Animais de experiência N.º
Indicação do valor vêzes
(1 cc. = UA)
Comportamento
Conteudo em germes
Dia da retirada oficial das amostras destinadas ao Instituto Estadual de
Contrôle
Dia da remessa para o Instituto Estadual de Contrôle
Observações:
.....

Assinaturas

Do fiscal oficial

e

do representante do fabricante

.....

.....

MODELO B

BOLETIM

sobre o resultado do exame oficial do sôro antigangrenoso enviado por

.....

com cartão n.º

em

recebido em de manhã
à tarde

N.º de contrôle (livro oficial)

Quantidade enviada para o exame

I. O sôro corresponde às exigências legais e possui valor indicado
de unidades antitóxicas em 1 cc.

II. O sôro foi recusado, porquê

O Instituto Estadual de Contrôle exige a taxa de exame de Cr\$

Observações

.....

....., de de

(Carimbo de officio)

O Diretor do Instituto de Contrôle

.....

(Assinatura e indicação do cargo).

.....

II — SORO ANTITETÂNICO

São descritas aqui modificações da técnica de dosagem da toxina e do soro que, em nossas mãos, produziram resultados satisfatórios.

O soro antitetânico é exclusivamente antitóxico. Por isso, é dosado com a toxina do *Clostridium tetani*, medindo-se a capacidade neutralizante de proporções variáveis do soro contra doses fixas de toxina.

Para isso, deixa-se em contacto quantidade constante de toxina com quantidades diferentes de uma diluição apropriada de soro a dosar, inoculando-se a mistura subcutaneamente, em camundongo ou em cobaia, após determinado período de contacto.

Na execução de uma dosagem de soro antitetânico, requer-se:

- a) *toxina padrão*. Esta pode ser fornecida pelo "National Institute of Health", ou ser preparada no próprio laboratório;
- b) *soro padrão*. Fornecido pelo "National Institute of Health", e também por outras instituições. Em tese, também pode ser preparado no laboratório.

As toxinas líquidas, obtidas por filtração de cultura de "*Clostridium tetani*", não são apropriadas para servir como toxina padrão. Para serem utilizáveis, devem ser previamente precipitadas, e depois padronizadas. Um bom método de precipitação é o descrito por Istrati e atribuído a Kirksch. Consiste na saturação do caldo tóxico por sulfato de sódio e subsequente junção de sulfato de amônio, até que o precipitado antes de formado, sobrenade francamente. A vantagem do método é obter um precipitado menos ácido que sobrenada mais facilmente e que, sendo mais compacto, escorre melhor. O seguinte protocolo ilustra o processo:

Cultura em caldo de coração peptonado, sob vaselina:

Volume do filtrado	5.000 cm ³
Sulfato de sódio, juntado lentamente, até saturar	appte. 1.800
Sulfato de amônio, até sobrenadar o precipitado	appte. 1.000

O precipitado colhido com escumadeira de tela estanhada é escorrido e colocado em placa de Petri de 15 cm². Esta é disposta

num dissecador hermêticamente fechado contendo cloreto de cálcio, onde é feito vácuo de 600 mm.Hg., indo em seguida para à estufa a 37°C., aí permanecendo 48 horas.

Estando o preparado perfeitamente sêco, é passado para um gral e moído, sendo, em seguida, peneirado em tamiz de seda, tudo feito dentro de um aparelho protetor, envidraçado. O pó obtido em pesafiltros sêco, é conservado no escuro, na geladeira, no vácuo de um dissecador fechado, contendo cloreto de cálcio.

A toxina padrão, fornecida pelo "National Institute of Health", é recebida sêca. As toxinas usadas em laboratório devem ter os seus índices perfeitamente estabelecidos: importa fazer as seguintes medições:

- a) *DLM (Dose letal mínima)* — Convencionada como a menor dose de toxina capaz de matar a cobaia de 350g. em 96 horas, ou o camondongo de 20 g. em 6 dias.
- b) *L+ (Limes mortis)* — A quantidade de toxina que, misturada a 1 test-dose (TD) de sôro antitetânico, provoca a morte do animal de prova. Sendo a medição praticada em cobaia, o prazo de observação é de 96 horas; sendo praticada em camondongo, o prazo é de 6 dias.

Para determinar o DLM, procede-se da seguinte maneira:

- a) Medidas preliminares:

Material necessário: Tubos neutros;
 Pipetas certificadas;
 Balões certificados;
 Dedais ou mamadeiras;
 Seringas de precisão;
 Pesa-filtros;
 Microespátula.

Tôda a vidraria deve ser rigorosamente desengordurada pela permanência em solução sulfocrômica, e convenientemente lavada com água destilada. Em seguida será sêca em estufa ou fôrno, com exceção do aparelhamento certificado, que secará naturalmente. Também as seringas devem estar perfeitamente sêcas.

- b) Técnica da dosagem:

Tratando-se de uma toxina de teor desconhecido é conveniente fazer primeiro uma dosagem de largos limites, para, numa segunda série, aproximar melhor os intervalos medidos. Pode-se prever

para uma toxina sêca um teor variando entre 500.000 e 5.000.000 DLM por centímetro cúbico, de acôrdo com a pureza do precipitado obtido. Um primeiro "test" deverá abranger estas duas dosagens extremas. Para isso, devemos diluir inicialmente a toxina a 1/500.000, da seguinte maneira:

Verificada a balança, toma-se com uma pinça apropriada, um pesa filtros sêco e coloca-se em um dos pratos. Tara-se em seguida. Retira-se depois da geladeira o dissecador com a toxina e com a microespátula colhe-se uma quantidade mínima desta, colocando-se no pesa filtros. Se a balança for de tipo periódico, deve-se usar de preferência, para a pesada, o pesa-filtros fechado. E' aconselhável urna balança de pesada rápida.

De qualquer forma, nunca se deve pesar uma quantidade inferior ao décuplo da sensibilidade da balança, para manter a pesada em nível suficientemente baixo.

Sendo a toxina sêca extremamente higroscópica, a pesada deve ser a mais rápida possível, sem prejuizo da exatidão. Daí a grande vantagem da balança periódica, de leitura imediata.

Terminada a pesada, e enquanto um auxiliar se encarrega de fazer o vácuo no dissecador, e novamente resguardá-lo na geladeira, entorna-se no pesa-filtros a quantidade de solução fisiológica necessária para estabelecer uma solução de título exato, por exemplo a 1/10.000. Desta forma, se a pesada foi de 2 mg., juntámos 20 cm³ de salina.

Para completar a dissolução a 1/500 adiciona-se 1 cm³ desta solução primária em um balão tarado de 50 cm³, e completa-se o volume com solução fisiológica.

Partindo-se desta solução mãe a 1/500.000, as rediluições seguintes se fazem da maneira seguinte:

Solução mãe	Sol. fisiológica	Diluição obtida	N.º de DML por cm ³ .
1 cc.	—	1/500.000	500.000
0,5 cc.	0,5 cc.	1/1.000.000	1.000.000
0,2 cc.	0,8 cc.	1/2.500.000	2.500.000
0,1 cc.	0,9 cc.	1/5.000.000	5.000.000

Os cuidados essenciais a serem tomados na execução das diluições são: rapidez e precisão nas medidas e menor exposição possível à luz e ao oxigênio. A mistura deve ser feita por agitação delicada, com movimentos circulares largos, cadenciados, ou enrolamento entre as mãos, nunca por choques bruscos e antagônicos,

evitando o mais possível a formação de espuma. Uma boa técnica, que evita completamente a necessidade de agitação, é fazer as diluições finais em dedais ou mamadeiras e no volume requerido para a inoculação.

Prontas as diluições, cada uma delas é recolhida numa seringa e inoculada imediatamente nos animais de prova. Para cada diluição deve-se usar uma seringa marcada, para evitar confusões.

Para a prova podem ser usadas cobaias ou camondongos.

a) *Cobaias*: Devem ser usados animais de 350 g. de peso, indicando uma idade aproximada de 5 meses.

Os resultados constantes e rigorosamente interpretáveis só podem ser obtidos com animais de uma mesma família, ou animais geneticamente "puros", a não ser que se possa lançar mão de séries extensas (Souto e Ubisch, 1939). De qualquer forma é boa praxe tomar dois animais para cada diluição.

A inoculação se faz de ordinário, no volume de 1 cm³ subcutaneamente. A região preferida é a abdominal, mas há vantagens evidentes na escolha da face interna da coxa (Sordelli, com. verbal). Os animais inoculados ficarão isolados devendo ser o menos perturbados possível. Observações diárias precisam entretanto ser feitas, anotando-se o progresso dos sintomas. Estes podem, por exemplo, ser assim simbolizados, quando se trata de inoculação na coxa:

- c — contratura completa do membro inoculado;
- l c — contratura incompleta do membro inoculado;
- cc — contratura completa dos membros posteriores;
- ccc — envolvimento de todos os membros. Sinais gerais;
- q. m. — agonia;
- + — morte.

A cobaia é observada até o 5.^o dia, só tendo valor a morte dentro dos 4 primeiros dias; a morte no 5.^o dia poderá dar indicação remota para as dosagens mais aproximadas.

b) *Camondongos*: Camondongos também podem ser utilizados e empregam-se animais de 20 g., cuja idade estará entre 45-50 dias. Tomam-se 3 ou 4 camondongos para cada diluição. É conveniente que se usem animais de uma mesma família.

A sensibilidade do camondongo é admitida como sendo apenas a metade da cobaia, o que indicaria uma dose aproximadamente 9 vezes menor, considerada a diferença em peso. Na verdade temos observado que, para matar o camondongo em 6 dias, requer-se uma quantidade de toxina apenas 4 vezes menor que a necessária para

matar a cobaia em 4 dias, de forma que, para obter resultados comparáveis, esta é a dose a empregar.

Injetam-se portanto, 0,25 cm³ sob a pele da raiz da cauda e, tomando as mesmas precauções que no caso das cobaias, prolonga-se a observação por mais dois dias. A dosagem final poderá, dessa forma, ser sempre referida a cobaias.

Os resultados desta primeira dosagem de tateamento, vão indicar o esquema a seguir na determinação mais aproximada, tornando-se tão exata quanto possível.

Na suposição das cobaias inoculadas com a diluição de 1/100.000 terem morrido em 60 horas e de terem sobrevivido as que receberam a diluição de 1/2.500.000, procederemos a nova dosagem, tendo como limite estas duas doses.

Partindo de uma solução mãe de 1/1.000.000 obtida seguindo os mesmos passos já citados, é estabelecida a seguinte tabela de rediluição:

Solução mãe	Sol. fisiológica	Diluição obtida	N.º de DLM contidos em 1 cm ³
1 cm ³	—	1/1.000.000	1.000.000
1 cm ³	0,2 cm ³	1/1.200.000	1.200.000
1 cm ³	0,5 cm ³	1/1.500.000	1.500.000
1 cm ³	0,8 cm ³	1/1.800.000	1.800.000
1 cm ³	1 cm ³	1/2.000.000	2.000.000
1 cm ³	1,5 cm ³	1/2.500.000	2.500.000

Diluições mais aproximadas são desnecessárias, sendo perfeitamente satisfatória uma precisão de 20%. Os demais passos técnicos são idênticos. É claro que as quantidades inoculadas permanecem constantes, 1 cm³ para cobaia e 0,25 cm³ para camundongo.

Determinada a DLM, resta estabelecer o L+ da toxina.

O L+ de uma toxina é a quantidade de toxina que, depois de estar em contacto com 1 T.D. de sêro padrão durante um período certo, é capaz de provocar a morte da cobaia inoculada em 96 horas.

Segundo a medição internacional, ainda relativamente pouco usada no Brasil, a test-dose de sêro padrão internacional é a quinta parte de uma unidade antitóxica padrão, o que faz da unidade internacional exatamente a metade da unidade americana.

Os soros utilizados para determinar 1 L+ das toxinas são soros estandardizados obtidos no "National Institute of Health de Washington", ou no "Statens Serun Institute de Copenhagen", e em alguns outros Institutos Oficiais europeus.

E' possível preparar sôro padrão no laboratório, desde que se tenha um outro sôro padrão para comparar, ou a toxina padronizada; mas é de bom aviso manter sempre um padrão estranho, seja êle toxina ou sôro, pois esta precaução impede erros sistemáticos acumulados.

O sôro padrão americano é enviado sob a forma de solução glicerizada de antitoxina, contendo 50 TD por centímetro cúbico, ou 5 unidades americanas (10 internacionais).

O material necessário para a determinação do limite de morte, L+, é o mesmo exigido para o da DLM. Os cuidados também são os mesmos.

Ainda como naquele caso, é econômico fazer primeiro uma determinação larga e, em seguida, guiado por seus resultados, uma segunda prova, mais aproximada.

Deve-se esperar que o L+ de uma toxina sêca contenha entre 300 e 800 DLM, dependendo de seu teor em toxóide.

Na determinação do limite de morte, L+, a dosagem baixa fornece um bom exemplo; neste esquema de dosagem, foi empregada uma toxina com DLM de 0.000.001 (gama):

Toxina diluída a 1/1.000	Teor tóxico	N.º de DLM em 1 cm ³	sôro diluído a 1/50	Solução fisiológica
0,21 cm ³	219 g.	210	1 cm ³	0,79 cm ³
0,25 cm ³	250 "	250	1 cm ³	0,75 cm ³
0,3 cm ³	300 "	300	1 cm ³	0,7 cm ³
0,36 cm ³	360 "	360	1 cm ³	0,64 cm ³
0,43 cm ³	430 "	430	1 cm ³	0,57 cm ³
0,52 cm ³	520 "	520	1 cm ³	0,48 cm ³
0,62 cm ³	620 "	620	1 cm ³	0,38 cm ³
0,76 cm ³	760 "	760	1 cm ³	0,24 cm ³

A sequência do preparo destas misturas deve ser a seguinte:

a) Preparar as madeiras e seringas; é de bom aviso lutar as junções das agulhas com as seringas, afim de evitar qualquer perda de líquido na inoculação (a mistura cêra-breu, comumente usada nos laboratórios para a lutagem de lâminas, presta-se a êste mister). Coloca-se uma gota de mistura fundida entre a junção da agulha e seringa, bem sêcas; a mistura se insinua na fissura, podendo depois ser retirado o excesso.

b) Adicionar as diferentes quantidades de soluções nas madeiras.

c) Adicionar num tubo neutro, perfeitamente limpo e sêco, 4 cm³, 9 de solução fisiológica; com pipeta de 0,1 cm³, juntar a êste um décimo de centímetro cúbico de solução padrão. Agitar suavemente evitando a formação de espuma. Desta forma, obtém-se uma solução de antitoxinas contendo 1 TD por cm³. Com nova pipeta, distribuir a solução de antitoxina nas mamadeiras, 1 cm³ em cada.

d) Pesar uma quantidade de toxina suficiente (no caso, aproximadamente 4mg) e dissolvê-la no volume de solução fisiológica necessário para obter imediatamente a diluição requerida (no caso, 1 cm³ para cada mg. pesado). Distribuir as diferentes quantidades da solução tóxica e agitar brandamente).

e) Passar imediatamente cada mistura para uma seringa de 2 cm³. Deixar as seringas ao abrigo da luz, na temperatura ambiente, durante 30 minutos.

f) Inocular cada mistura, subcutâneamente, na face interna da coxa de uma cobaia.

Na técnica empregada pelos laboratórios americanos, usa-se fazer as diluições de modo a obter um volume final de 4 cm³.

E' de se esperar que algumas das cobaias inoculadas morram de tétano, em períodos mais ou menos aproximados das 96 horas; estas indicarão o centro da gravidade para a determinação mais aproximada.

Suponhamos que 360 gama representam a dose de toxina mais próxima da dose que produziu a morte em 96 horas; nestas condições, far-se-á então uma dosagem mais precisa, escalonando menos espaçadamente as quantidades de toxina tomando como limites as doses anterior (300 gama) e posterior (430 gama). O espaçamento pode ser de 20 a 30 DLM (representando por 20-30 gama), com o que já se obterá uma precisão suficiente. Desta forma, estabelecemos um novo protocolo de inoculações, semelhante ao primeiro, mas com as seguintes doses tóxicas: 300-330-360-390-420-450 gama.

Todos os demais passos são idênticos, não devendo ficar esquecido, porém, que aquí se torna taxativo usar duas cobaias para cada mistura, que portanto deve ser preparada em dôbro.

E' claro que, havendo interêsse em determinar o L^o, uma segunda série se impõe, centralizada pela maior dose ainda ineficiente; admitindo-se no caso figurado 250 gama como tal, seria ne-

cessário prolongar a série, acrescentando as doses 270 e 240 gama, com o que, numa série única, ficariam determinados ao mesmo tempo o L^0 e o $L+$.

A observação das cobaias deve durar 96 horas. Leituras posteriores são inúteis.

Camondongos também podem ser utilizados nesta determinação. As diferenças fundamentais introduzidas pelo uso dos camondongos são:

a) Compressão do volume da mistura em 1 cm³. Isto se consegue dobrando as concentrações de toxina e de antitoxina nas soluções respectivas (inclusive a antitoxina padrão) e tomando para mistura apenas a metade do volume.

b) Inoculação da quarta parte da mistura total, isto é, 0,25 cm³.

c) Observação por 6 dias, em lugar de 96 horas.

Da posse de uma boa toxina seca, rigorosamente estandarizada e frequentemente reverificada, e de um soro padrão, é possível dosar, com segurança, qualquer soro de valor desconhecido.

Cabe aqui, ainda, ficar em guarda contra o uso, como padrão, de toxinas de preparo muito recente. As características destas toxinas se modificam, a princípio, muito rapidamente, no sentido de uma diminuição da potência e uma elevação do $L+$. Só quando reverificações sucessivas indicarem, pela identidade de seus resultados, uma como que fixação dos caracteres da toxina, é que esta poderá ser utilizada nas dosagens.

DOSAGEM DO SORO ANTITETÂNICO

A potência do soro antitetânico é expressa em unidades por cm³.

Não existe ainda um acôrdo geral em se adotar um único conceito de unidade para os soros antitetânicos, qualquer que seja o país ou laboratório de origem.

A unidade escolhida pela Comissão Permanente de Padronização Biológica da Organização de Higiene da Sociedade das Nações, representa o quádruplo da "test-dose", ou da quantidade de antitoxina necessária para, quando misturada a test-dose de toxina ($L+$), proteger da morte por 96 horas a cobaia inoculada.

A unidade mais geralmente adotada no Brasil é a americana, que representa precisamente o dôbro da unidade internacional.

Desta forma, a transformação da medida americana em internacional, ou vice-versa, é extremamente simples.

A técnica empregada nos EE. UU. e também aqui, já descrita por Rosenau e Anderson (1908), na qual se compara o sôro de valor desconhecido e o sôro padrão em duas séries simultâneas, em relação à mesma dose de toxina.

A técnica de dosagem não difere essencialmente da que rege a determinação do L^o e L+. Apenas, aqui a dose tóxica é invariável, variando a dose da antitoxina de valor ignorado.

Também no caso atual é vantajoso, pela economia de trabalho e de animais de prova, fazer a verificação em dois tempos, comportando inicialmente um tateamento largo e em seguida uma determinação mais aproximada.

Exemplo: Tratando-se de um sôro nativo, não purificado, podem-se tomar como limites extremos da primeira verificação as medidas de 100 U.A. e 1.000 U.A. Tratando-se de um sôro purificado, ficaremos entre os limites de 500 e 5.000 U.A.

É claro que, se na primeira determinação ultrapassarmos o limite de dosagem previsto, nova prova se faz necessária antes de atingir-se a dosagem final.

Para soros não terapêuticos, de caráter experimental e dosando muito baixo, outras técnicas se tornam necessárias. Não serão cuidadas aqui.

Tomando pois, como exemplo, um sôro nativo desconhecido, deveríamos traçar o seguinte esquema para a verificação prévia:

100 U. — 200 U. — 400 U. — 800 U. — 1.600 U.

Devendo o volume estar comprimido em 2 cm³ e ficando 1 cm³ reservado à solução de toxina, é necessário que a maior dose de sôro (equivalente a 100 Unidades) não ultrapasse esta medida. Porisso, devemos fazer a diluição inicial do sôro desconhecido de modo a obter a equivalência de 100 U. em 1 cm³. Sabendo-se que 100 U. representam 1.000 TD, é evidente que a diluição inicial se fará a 1/1.000. As outras equivalências se obterão tomando partes aliquotas desta diluição inicial e completando o volume com solução fisiológica. Desta forma teremos:

sôro a 1/1.000	Solução fisiológica	Toxina diluída (1 cm ³ contém 1L+)	sôro padrão a 1/50	Dosagem provada
1 cm ³	—	1 cm ³	—	100 U.
0,5 cm ³	0,5 cm ³	1 cm ³	—	200 U.
0,25 cm ³	0,75 cm ³	1 cm ³	—	400 U.
0,12 cm ³	0,88 cm ³	1 cm ³	—	800 U.
0,06 cm ³	0,94 cm ³	1 cm ³	—	1.667 U.
—	—	1 cm ³	1 cm ³	—

Para simplificar as medições deve-se evitar trabalhar com mais de duas casas decimais. Qualquer conjunto de equivalência pode ser estabelecido conforme for mais conveniente para o caso confrontado. O cálculo das quantidades a medir se obtém de um modo assás singelo, dividindo-se o número de unidades equivalentes à diluição inicial de 1 por mil, correspondendo a 100 unidades, teremos a quantidade correspondente a 125 U., dividindo por 125. Reciprocamente, se quisermos obter o número de unidades de um volume qualquer da diluição inicial, dividiremos o número de unidades nesta contidos pelo volume considerado. Assim, no caso vertente, 0,6 cm³ equivalem a 100/0,6 ou 167 unidades.

A marcha do método de dosagem em nada difere do já descrito para a determinação do L+. Depois de 30 minutos no ambiente, cada mistura é inoculada sob a pele da coxa da cobaia.

Considerando o grande espaçamento entre os teores verificados é muito provável que os animais que receberam uma dada mistura apresentem sintomas de tétano e os que foram inoculados com a dose imediata, subsequente, morrem com grande rapidez. Estas duas misturas determinarão os limites da nova determinação final; admitamos, para exemplificar, que foram-se representando respectivamente 400 e 800 unidades. O novo esquema deverá guardar uma diferença máxima de 20% entre uma dose de sôro e outra, sendo a ótima 10%. Independente da precisão desejada, a diluição inicial de sôro deve equivaler a 400 unidades, pelo que êle deve ser diluído 4.000 vezes. O 1.º tubo da série receberá 1 cm³ desta diluição (400 U.) e o último 0,5 cm³ (800 U.). Os tubos intercalados serão 3 até 6, dependendo da precisão desejada; ao lado da série com o sôro desconhecido, far-se-á uma outra com o padrão, para permitir a comparação final.

Não esquecer que tôdas as misturas devem ser feitas em dobro, para permitir a inoculação em 2 animais. O esquema de dosagem poderia ficar assim constituído:

Sêro desconhecido a 1/4.000	Unidades dosadas	Sol. fisiológica	Toxina padrão diluída de modo a 1 cm ³ = L+	Sêro padrão a 1/50
2 cm ³	400	—	2 cm ³	—
1,7 cm ³	470	0,3 cm ³	2 cm ³	—
1,44 cm ³	555	0,56 cm ³	2 cm ³	—
1,2 cm ³	667	0,8 cm ³	2 cm ³	—
1 cm ³	800	1 cm ³	2 cm ³	1,8 cm ³
—	—	0,1 cm ³	2 cm ³	1,9 cm ³
—	—	—	2 cm ³	2 cm ³
—	—	—	2 cm ³	2,1 cm ³
—	—	—	2 cm ³	2,2 cm ³

A razão da inclusão de uma segunda série com a antitoxina padrão reside na pequena probabilidade de se obter a morte de qualquer dos grupos de prova, exatamente em 96 horas e ainda na prevenção de uma sempre possível imprecisão técnica, levando ao não balanceamento perfeito das duas TD estimadas para toxina e sêro padrão. Assim procedendo, pequenos desvios podem ser facilmente corrigidos.

No caso ideal, obteremos na série conhecida, a morte das cobaias que receberam a mistura 1 cm³-sêro padrão mais 1 cm³-toxina exatamente em 96 horas. Os animais da série desconhecida que morrem mais perto dêste prazo indicam a dosagem do sêro. A precisão desta medida será considerada tanto maior quanto mais próximo das 96 horas se der a morte. Suponhamos a sequência:

O O — CC CC — + 100 hs. — + 95 hs. — + 60 hs. —
 + 65 hs. — + 30 hs. — + 24 hs.

O que nos daria, com grande aproximação o título de 555 unidades. Se por acaso obtivéssemos na série conhecida ao mesmo tempo a sequência:

+ 72 hs. — + 76 hs. — + 80 hs. — + 88 hs. — + 92 hs. —
 + 97 hs. — + 100 hs. — + 106 hs. — + 112 hs.

na qual o test dose do sêro padrão contra o TD tóxico empregado seria 5% maior, a dosagem final passaria a ser de 555 + 5% = 583 unidades.

Nas dosagens habituais, feitas com frequência, quando há pouca probabilidade de variação da toxina ou do sêro e demais, onde não há necessidade de se levar a precisão a tão extremados limites, é lícito abstermo-nos da segunda série de comparação, limitando-nos

a manter no esquema um par de cobaias testemunhas que recebem LTD da toxina e 1 TD de sôro standard, para surpreender descuido ou erros possíveis.

Sem dúvida a determinação de soros pode também ser feita em camundongos seguidas as prescrições já citadas em relação à dosagem de DLM e de L+ da toxina. Procedendo dessa maneira, a dosagem final em camundongo corresponderá com grande exatidão à obtida em cobaias.

E' um problema frequente no laboratório a reavaliação do título de um sôro. Neste caso, aplica-se o que ficou dito para a determinação final de um sôro desconhecido, tendo-se o cuidado de colocar o título presumido no meio da série entre dois mais elevados e dois mais baixos; assim, se supomos tratar-se de um sôro de 750 unidades, faremos uma série do seguinte tipo: 620-680-750-825-900.

No caso de ainda a redeterminação de um sôro cujo título se supõe ter baixado, coloca-se o título estabelecido no pé da série: 500-560-620-680-750.

PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE L^o E L+ DE UMA TOXINA SÊCA. DLM DA TOXINA

DETERMINAÇÃO PRÉVIA

Âmbito provável de L^o: 100-400 gama. Do L+: 250-700 gama.

Diluir a toxina de modo a 1 cm³ conter 700 gama.

Toxina pesada: 4mgs., 3.

Solução em 6 cm³, 14 salina (1 cm³ contém 700 gama).

O gama, 83. ANIMAL: cobaia 350 grs.

Toxina diluída	Teor tóxico	DLM	Sol. fisiológica	Sôro a 1/50 1 cm ³ tem 1 TD	Resultado
0,14 cm ³	98 gama	118	0,86 cm ³	1 cm ³	OK 4 ds.
0,28 cm ³	196 gama	236	0,72 cm ³	1 cm ³	OK 4 ds.
0,42 cm ³	294 gama	354	0,58 cm ³	1 cm ³	1c 4 ds.
0,56 cm ³	392 gama	472	0,44 cm ³	1 cm ³	cc 4 ds.
0,7 cm ³	490 gama	590	0,3 cm ³	1 cm ³	+ 60 hs.
0,85 cm ³	595 gama	717	0,15 cm ³	1 cm ³	+ 24 hs.
1 cm ³	700 gama	843	—	1 cm ³	+ 24 hs.

A mistura obtida e deixada 30 minutos no ambiente, na seringa e inoculada sob a pele da coxa de uma cobaia.

Resultado: L^o — maior do que 196 gama (236 dlm) menor do que 294 gama (354 dlm).

L+ — maior do que 396 gama (472 dlm) menor do que 490 gama (590 dlm).

DETERMINAÇÃO FINAL

Abrangendo de 200 a 500 gama. Diluir a toxina de modo a 1 cm³ conter 500 gama.

Toxina pesada: 8 mgs., 5.

Solução em 17 cm³ de salina (1 cm³ contém 500 gama).

Toxina diluída	Teor tóxico	DLM	Sol. fisiológica	Sêro a 1/50 1 cm ³ tem 1 TD	Resultado
0,8 cm ³	200 gama	241	1,2 cm ³	2 cm ³	OK 4 ds. OK 4 ds.
0,9 cm ³	225 gama	271	1,1 cm ³	2 cm ³	OK 4 ds. OK 4 ds.
1 cm ³	250 gama	301	1 cm ³	2 cm ³	OK 4 ds. OK 4 ds.
1,1 cm ³	275 gama	331	0,9 cm ³	2 cm ³	OK 4 ds. OK 4 ds.
1,2 cm ³	300 gama	361	0,8 cm ³	2 cm ³	1c 4 ds. 1c 4 ds.
1,6 cm ³	400 gama	482	0,4 cm ³	2 cm ³	+ td. + td.
1,7 cm ³	425 gama	512	0,3 cm ³	2 cm ³	+ 90 hs. + 95 hs.
1,8 cm ³	450 gama	542	0,2 cm ³	2 cm ³	+ 72 hs. + 82 hs.
1,9 cm ³	475 gama	572	0,1 cm ³	2 cm ³	+ 60 hs. + 62 hs.
2 cm ³	500 gama	602	—	2 cm ³	+ 48 hs. + 52 hs.

A mistura obtida é deixada 30 minutos no ambiente, na seringa, e inoculada em 2 cobaias (2 cm³ em cada) sob a pele da coxa.

Resultado: L+: 425 gama (512 DLM)

L^o: 275 gama (331 DLM)

Animal de prova: camundongo de 20 gramas.

Determinação prévia: Diluir a toxina de forma a 1 cm³ conter 1.400 gama.

Distribuir da mesma maneira que para a cobaia, mas tomando a metade do volume. Também de salina será tomado a metade do volume.

Diluir o sêro padrão a 1/25, de modo a ter 2 TD em cada cm³. Desta forma se obterá o volume final de 1 cm³.

Dêste, se inoculará 0,25 cm³ na base da cauda de 1 camundongo. A leitura será feita até o 6.^o dia.

Determinação final: Exatamente como acima, estando a toxina contida em 1 cm³ para 1.000 gama.

Inocular 0,25 cm³ da mistura final em cada um de 4 camundongos

PROTOCOLO DE DOSAGEM DE UMA TOXINA SÊCA DESCONHECIDA
ANIMAL DE PROVA: Cobaia de 350 grs.

DETERMINAÇÃO PRÉVIA

Diluição de partida: 1/500.000.

Solução em 18 cm³ salina (1/10.000).

Diluição: 1 cm³ em 49 cm³ salina (1/500.000) 1 cm³ tem 2 gama.

Toxina a	Toxina pêso	Sol. fisio- lógica	Diluição geral	Resultado
1/500.000				
1 cm ³	2 gama	—	1/500.000	+ 48 hs.
1,5 cm ³	1 gama	0,5 cm ³	1/1.000.000	+ 3 dias
1,2 cm ³	0,4 gama	0,8 cm ³	1/2.500.000	cc 4 dias
1,1 cm ³	0,2 gama	0,9 cm ³	1/5.000.000	OK 4 dias

(mistura inoculada imediatamente sob a pele da coxa)

Resultado: DLM maior do que 0,4 gama menor do que 1 gama
(entre 1/1.000.000 e 1/2.500.000).

DETERMINAÇÃO FINAL

Diluição da partida: 1/1.000.000.

Toxina pesada: 2,20 mg. (2.200 gama).

Diluição: 1 cm³ em 99 cm³ salina (1/1.000.000) 1 cm³ tem 1 gama.

Toxina a	Toxina pêso	Sol. fisio- lógica	Diluição final	Resultado
1/1.000.000	para 1 cm ³ da mistura			
2 cm ³	1 gama	—	1/1.000.000	+ 60 hs. + 66 hs.
2 cm ³	0,83 gama	0,4 cm ³	1/1.200.000	+ 86 hs. + 90 hs.
2 cm ³	0,67 gama	1 cm ³	1/1.500.000	+ td. + td.
2 cm ³	0,55 gama	1,6 cm ³	1/1.800.000	cc 4 ds. td.
2 cm ³	0,45 gama	2,4 cm ³	1/2.200.000	c 4 ds. cc 4 ds.

(1 cm³ de cada mistura inoculado sob a pele da coxa de 2 cobaias).

Resultado: DLM = 0,83 gama (1/1.200.000).

ANIMAL DE PROVA: CAMONDONGO DE 20 GRS.

Determinação prévia: Todos os passos idênticos. A inoculação se faz sob a pele da raiz da cauda.

Inocula-se 0,25 cm³ de cada mistura. A leitura é prolongada até o 6.º dia.

Determinação final: Tomam-se 4 animais para cada dose.

PROTOCOLO DE DOSAGEM DE UM SORO NATIVO DESCONHECIDO
ANIMAL DE PROVA: Cobaia

DETERMINAÇÃO PRÉVIA

Unidades provadas	Soro diluído a 1/1.000	Solução fisiológica	Toxina diluída	1 cm ³ = 1TD Resultado
100	1 cm ³	—	1 cm ³	OK 4 ds.
200	0,5 cm ³	0,5 cm ³	1 cm ³	OK 4 ds.
400	0,25 cm ³	0,75 cm ³	1 cm ³	OK 4 ds.
833	0,12 cm ³	0,88 cm ³	1 cm ³	+ 3 ds.
1667	0,06 cm ³	0,94 cm ³	1 cm ³	+ 2 ds.
Soro standard a 1/50	1 cm ³	—	1 cm ³	+ 90 hs.

Cada mistura é deixada 30 minutos no ambiente, na seringa e injetada sob a pele da coxa de uma cobaia.

Resultado: O título está dentre 400 e 833 unidades.

DETERMINAÇÃO FINAL

Unidades provadas	Soro desconhecido diluído a 1/4.000	Sol. fisiológica	Toxina diluída 1 cm ³ = 1TD	Soro padrão 1/50	Resultados
400	2 cm ³	—	2 cm ³	—	OK 4 ds. OK 4 ds.
470	1,7 cm ³	0,3 cm ³	2 cm ³	—	1c 4 ds. c 4 ds.
555	1,44 cm ³	0,56 cm ³	2 cm ³	—	Morrem tardiam.
667	1,2 cm ³	0,8 cm ³	2 cm ³	—	+ 88 hs. + 94 hs.
800	1 cm ³	1 cm ³	2 cm ³	—	+ 67 hs. + 75 hs.
—	—	0,2 cm ³	2 cm ³	1,8 cm ³	+ 68 hs. + 72 hs.
—	—	0,1 cm ³	2 cm ³	1,9 cm ³	+ 83 hs. + 84 hs.
—	—	—	2 cm ³	2 cm ³	+ 98 hs. +102 hs.
—	—	—	2 cm ³	2,1 cm ³	+108 hs. +118 hs.
—	—	—	2 cm ³	2,2 cm ³	Morrem tardiam.

Cada mistura é deixada 30 minutos no ambiente, na seringa, e injetada subcutaneamente na coxa de 2 cobaias, 2 cm³ em cada uma (Para as duas últimas injeções da série, as cobaias recebem, respectivamente, 2,05 cm³ e 2,1 cm³).

Resultado: o título do soro é 667 unidades americanas.

Determinação em camondongo de 20 grs.

Determinação prévia: Diluir a toxina de forma a 1 cm³ conter 2 TD (2 L).

Diluir o sôro desconhecido de forma a conter em 1 cm³ o dôbro das unidades previstas.

Diluir o sôro padrão de forma a conter 2 TD em 1 cm³ (1/25).

Tomar apenas a metade dos volumes indicados na tabela supra, inclusive a solução fisiológica. Desta forma, obtém-se um volume final de 1 cm³ para a mistura.

Inocular 0,25 cm³ desta mistura na cauda de um camondongo.

Determinação final: Exatamente como acima.

Inoculam-se 4 camondongos com 0,25 cm³ de cada mistura.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BENGTON, J. A. — 1931 — Rapport de la Commission Permanente de Standardisation Biologique. C. H. C. P., 31: 23.
- 2 — BENGTON, J. A. — 1934 — *Public Health Reports*, 49: 1567.
- 3 — BENGTON, J. A. — 1936 — *Public Health Reports*, 51: 266.
- 4 — BENGTON, J. A. — 1936 — *Public Health Reports*, 51: 1263.
- 5 — GLOTOVA, H. W. — 1937 — *An. Inst. Pasteur*, 5: 526.
- 6 — HARTLEY, P. — — Rapport de la Commission Permanente de Standardisation Biologique, C. H. C. P., 31:
- 7 — HARTLEY, P. e WHITE, B. P. — 1935 — *Bull. Trim. de l'Organis. d'Hygiene*, número especial, 33.
- 8 — JENSEN, Cl. — 1936 — *Bull. Trim. de l'Organis. d'Hyg.*, 5: 720.
- 9 — JENSEN, Cl. — 1936 — *Bull. Trim. de l'Organis. d'Hyg.*, 5: 790.
- 10 — KOLMER, J. — 1942 — *Jour. of Immun.*, 42: 289.
- 11 — "Memorandum on the Standard for gas gangrene antitoxin (perfringens) and its application" — 1935 — Permanent Commission on Biological Standardisation, League of Nations, C. H. C. P. S. B., 23, Geneve.
- 12 — ROSENAU, M. J. e ANDERSON, J. F. — 1908 — *Hyg. Laborat. Bull.*, 43: 1.
- 13 — "Serum antigangreneus (perfringens)" — 1931 — Rapport de la Commission Permanente de Standardisation Biologique, C. H., 1056: 5.
- 15 — "Serum antigangreneux a) vibron septique" — 1935 — Rapport de la comission Permanente de Standardisation Biologique, *Bull. Trim. de l'Organisation d'Hyg.*, número especial, 1.
- 16 — SOUTO, A. B. e RIVAROLA, J. B. — 1938 — *Rev. Sanidad Militar*, 103/106: 658.
- 17 — SOUTO, A. B. e VON UBISH, G. — 1939 — *Rev. d'Immunologie*, 5: 54.
- 18 — "Vorschriften für die staatliche Prüfung der Gasbrand (Perfringens) Sera". Ministerioblat d. Reich — und Preus Ministeriums des Intern., — 1937 — 15: 591.

- 19 — WALBUM, L. E. e REYMANN, C. — 1935 — *Bull. Trint. de l'Org. d'Hyg.*, número especial, 42
- 20 — WALBUM, L. E. e REYMANN, C. — 1936 — *Bull. Trint. de l'Org. d'Hyg.*, 5: 752.
- 21 — WALL, A. D. — 1939 — *Brit. Med. Jour.*, 2: 1106.
- 22 — WEINBERG, M., DAVESNE, J. e PREVOT, A. — 1932 — *An. Inst. Pasteur*, 49: 386.
- 23 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1936 — *C. R. Soc. Biol.*, 123: 661.
- 24 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1937 — *C. R. Soc. Biol.*, 126: 656.
- 25 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1936 — *C. R. Acad. Sc.*, 204: 1012.
- 26 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1938 — *C. R. Soc. Biol.*, 1084: 127.

FLORA MICÓTICA DE ALGUNS PRODUTOS ALIMENTARES

FLORIANO DE ALMEIDA

1.º assistente e docente livre de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo

CARLOS DA SILVA LACAZ

2.º assistente de Microbiologia da Faculdade de Medicina de S. Paulo

LUIZ AUGUSTO RIBEIRO DO VALLE

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

O presente trabalho representa contribuição inicial ao estudo da flora microbiana de diferentes produtos alimentares. Foi êle realizado com a colaboração da secção de micologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e da secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz.

Prestamos as nossas homenagens e externamos os nossos agradecimentos ao corpo técnico da secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz, nas pessoas das dedicadas e eficientes técnicas Ema de Lima e Olga Pupo, cujo esforço, dedicação e espírito científico muito contribuíram para o bom êxito do referido trabalho.

O Instituto Adolfo Lutz, na secção de Contrôles Biológicos, desde janeiro de 1941 vem estudando a flora bacteriana e micótica de vários produtos alimentares, para, posteriormente, tentar realizar um possível contrôle na preparação e conservação dos referidos produtos. Assim, Büller Souto e Olivia de Godoy, iniciando tais estudos sistematizados, já realizaram investigações cuidadosas sôbre produtos de tomates.

Na presente comunicação teceremos alguns comentários exclusivamente sôbre a "flora micótica" de alguns produtos e procuraremos tirar algumas conclusões que serão de utilidade para aqueles que se interessarem na feitura de um regulamento para contrôle micológico de produtos alimentares.

Preliminarmente devemos dizer que, mesmo na Argentina e Uruguai, segundo cartas que recebemos dos Professores Pablo Negroni e Juan Mackinon, não existem regulamentos concretos desta natureza, mas apenas uma disposição geral que proíbe o consumo dos produtos quando estejam alterados nas suas propriedades organoléticas ou de apresentação. O Código Brasileiro possui também o mesmo dispositivo regulamentar.

Para melhor sistematização do assunto, dividiremos o presente trabalho em 4 partes:

- a) Emprêgo dos cogumelos (bolos e leveduras) na indústria;
- b) Contrôlo no crescimento dos cogumelos;
- c) Resultados dos exames praticados em 350 amostras de diferentes produtos alimentares;
- d) Algumas conclusões.

a) *Emprêgo dos cogumelos na indústria*: Numerosos bolores (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, etc.) e leveduras (*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, etc.) são utilizados na indústria pela sua alta capacidade fermentativa. Aliás, o estudo das fermentações está ligado em grande parte ao estudo das leveduras.

Os cogumelos, bolores e leveduras, são utilizados frequentemente no preparo dos seguintes produtos:

1 — *Preparo do álcool*: êste produto, de enorme importância particularmente no momento atual, pode ser obtido sob a forma de etanol a partir de açúcares, do amido ou de outros carboidratos. Partindo-se de material amiláceo ou da celulose, deve-se praticar anteriormente a hidrólise dos mesmos em açúcares fermentecíveis, afim de serem depois atacados pela levedura. A fermentação, geralmente é feita com o *S. cerevisiae* ou o *Schizosaccharomyces pombe*. Tais leveduras, chamadas domésticas por Guilliermond, são frequentemente empregadas na indústria do álcool. Existem dois tipos de fermentação alcoólica: a alta, na temperatura ótima de 10 a 25°C., e a baixa, na temperatura ótima de 5 a 10°C.

2 — *Preparo de cerveja*: os vários tipos de cerveja dependem do material empregado, utilizando-se geralmente o malte e o lúpulo, assim como produtos de outros cereais. As leveduras utilizadas são o *S. cerevisiae* e o *S. carlsbergensis*.

3 — *Preparo do pão*: na indústria da panificação, utiliza-se igualmente o *S. cerevisiae*, o qual, produzindo CO₂ serve para dar a "leveza" ou crescimento às massas.

4 — *Vinho*: trata-se de uma substância obtida a partir da fermentação do açúcar da uva. O vinho pode ser sêco, quando a fermentação é praticamente completa, e doce; neste último caso, o processo fermentativo foi suspenso numa determinada fase. Como agente de fermentação emprega-se o *S. ellipsoideus*, e muitas outras espécies, que dão os diversos tipos de vinho.

5 — *Outras bebidas alcoólicas*: as leveduras, de espécies diferentes, ainda são empregadas no fabrico de outras bebidas alcoólicas como:

- a) Kvass (Rússia)
- b) Pulque (México)
- c) Taette (Scandinávia)
- d) Sorgho (Mandchúria)
- e) Sake (Japão)
- f) Rhum
- g) Whisky
- h) Gin, etc.

6 — *Preparo de certos queijos*: na manufatura de certos queijos, utilizam-se os industriais do *Penicillium camemberti* e do *P. roqueforti*.

7 — *Extração de vitaminas*: partindo-se do princípio de que o complexo B₁ encontra-se em grande concentração na levedura da cerveja, vários autôres têm procurado extrair a tiamina ou aneurina dessas leveduras.

8 — *Glicerina*: utiliza-se como agente de fermentação o *S. ellipsoideus*, var. *Steinberg* e o *S. ellipsoideus*, var. *California*.

9 — *Ácido cítrico*: para a fabricação do ácido cítrico partimos de material à base de sacarose, glicose ou maltose e empregamos como agentes de fermentação o *Citromyces pfeifferianus* e o *Citromyces glaber*, cogumelos estes, considerados por Thom como pertencentes ao gênero *Penicillium*. Também são usados alguns *Aspergillus*.

10 — *Ácido glucônico*: a partir de amostras de *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum*, var. *rubisclerotium* e *Penicillium chrysogenum*.

11 — *Ácido láctico*: a partir da glicose pela ação fermentativa de diferentes espécies de *Rhizopus* e *Mucor*.

12 — *Ácido gálico*: resultante da ação do *Penicillium glaucum* sobre a nóz de galhas.

13 — *Ácido fumárico*: empregando-se várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

Por êste ligeiro apanhado verifica-se o papel importantíssimo que os cogumelos desempenham na indústria e, da estreita colaboração entre químicos e micologistas grandes progressos poderão ser realizados neste domínio interessantíssimo das fermentações.

b) *Contrôle no crescimento dos cogumelos*: Se numerosos cogumelos são empregados frequentemente na indústria devido ao seu alto poder fermentativo, outros são nocivos porquê deterioram produtos ou alteram as suas propriedades organoléticas quando nelas se implantam.

Uma esterilização absoluta desses produtos é praticamente impossível, mas, estabelecendo-se um certo número de preceitos ou normas que devem guiar o preparo de um produto, podemos, até certo ponto, diminuir ou mesmo impedir que eles sejam contaminados por cogumelos.

São as seguintes as normas que devem ser adotadas:

1) assegurar um esterilidade relativa ao ambiente em que se trabalha, mantendo as paredes limpas e secas, assim como os forros e assoalhos, afim de impedir a proliferação de bolores.

2) exercer severa vigilância e controle sobre as pessoas que preparam os produtos, visitantes e, particularmente, sobre os utensílios empregados na manufatura dos mesmos.

3) manter o produto em condições físicas nas quais o crescimento dos cogumelos seja limitado ou mesmo evitado inteiramente (sabe-se que o calor destrói mais facilmente os cogumelos que as bactérias).

4) praticar a pasteurização dos produtos. O Código Brasileiro exige, mas não se cumpre, este dispositivo.

5) limitar o crescimento dos cogumelos por meio de substâncias antisséticas. Devemos afirmar que é difícil encontrar-se uma substância antissética ideal para os fungos, pois para que as mesmas tenham ação fungicida, deverão ser empregadas em concentrações muito elevadas, causando, desta maneira, alterações nos produtos, com perigo igualmente para a saúde dos consumidores.

c) *Resultados obtidos em 350 exames realizados:* Em todos os produtos examinados praticava-se o controle bacteriológico e micológico. Para este último exame, semeava-se o material retirado da sua porção central em vários meios de cultura, particularmente Sabouraud glicose e gelose glicosada e acidificada pelo ácido tartárico a 2%. Os resultados obtidos poderão ser avaliados pela leitura do quadro anexo.

d) *Algumas conclusões:* Antes de tirarmos algumas conclusões referentes ao assunto tratado, vejamos qual o possível significado da presença de um cogumelo em um produto alimentício:

1) *Como causa de moléstia:* infelizmente até ao presente momento, não possuímos dados suficientes para sabermos se um determinado cogumelo isolado de um produto pode ou não ser patogênico para o homem. Está claro que tudo depende também do cogumelo isolado. Alguns deles são capazes de produzir toxinas e muitos, deteriorando os produtos, são a causa indireta de into-

xicações alimentares, algumas vèzes graves. Poder-se-ia inocular o cogumelo isolado do produto alimentar em diferentes animais de laboratório, mas, às vèzes, de uma só inoculação não podemos tirar conclusões definitivas pois, como afirma Henrici, precisamos sensibilizar em primeiro lugar o animal com inoculações sucessivas, para que, posteriormente, êle responda a uma dose desencadeante então patogênica.

2) *Como causa de alteração de produtos*: diversas leveduras e bolores isolados de produtos alimentares são a causa de deterioração dos mesmos, alterações do gôsto, turvação de produtos líquidos, tais como turvação de cervejas pelo *S. postorianus*. Todos estes fatos nos levam a tomar as maiores cautelas no preparo e conservação dos referidos produtos.

3) *Como índice de boa ou má preparação do produto*: de um modo geral, a presença de um cogumelo em um determinado produto é índice de má preparação, mostrando pois que o mesmo foi manipulado sem maiores cuidados de assepsia. Outras vèzes, a contaminação corre por conta da própria matéria prima.

Diante dos dados obtidos e, de acôrdo com as considerações expostas, podemos tirar algumas conclusões que julgamos serão úteis aos legisladores e a todos aqueles que se interessam no preparo de produtos ou aos responsáveis pela saúde pública.

1) Deve-se garantir, nas fábricas de produtos alimentares, um estado de relativa esterilidade no ambiente em que se trabalha, mantendo-se vigilância e contrôle sôbre os utensílios, pessoal e visitantes.

2) Deve-se praticar rigorosa limpeza nos vasilhames e utensílios empregados na manufatura dos produtos alimentares.

3) As amostras de leveduras e bolores utilizados para as fermentações industriais devem ser puras e periódicamente controladas. Achamos que o Govêrno, por um serviço especializado, deverá manter uma secção destinada a fornecer amostras de diferentes cogumelos de poder fermentativo e de aplicação industrial.

4) Sabendo-se que a presença de um cogumelo em um determinado produto alimentar é, geralmente, índice de má preparação, deveremos orientar os industriais, por-meio de palestras educativas, sôbre o valor de tais exames, mostrando-lhes os meios de se evitar uma possível contaminação dos referidos produtos.

O presente trabalho de pesquisa está sendo continuado, de tal modo que, posteriormente, novas conclusões serão tiradas, de real interêsse para a saúde pública.

Produtos alimentares	Especificações	N.º de exames	Resultados positivos	%	Diagnóstico
Peixes	Em conserva, secos e preparados	28	4	14,2%	1 <i>Candida</i> . 2 <i>Leveduras</i> não identificadas.
Derivados do leite	Queijo (10) Manteigas (45) Outros derivados (6) (leite condensado, leite-lho, leite em pó, coalho)	61	10 } 42 } 55 3 }	100,0% } 93,3% } 90,1% 50,0% }	Queijos: <i>Leveduras</i> não identificadas: 5; <i>Torulopsis</i> , 2; <i>Geotrichum</i> , 2; <i>Mucor</i> , 2; <i>Saccharomyces</i> , 1. Manteiga: <i>Saccharomyces</i> , 25; <i>Candida</i> , 5; <i>Geotrichum</i> , 16; <i>Rhodotorula</i> , 2; <i>Penicillium</i> , 3; <i>Lev. não id.</i> 1. Outros der.: <i>Lev. não id.</i> , 3.
Doces e similares	Doces de confeitaria Massas (pecegadas, bananadas, goiabadas) Rapadura	75	7	93,0%	Não identificados, 5. <i>Rhizopus</i> , 1. <i>Saccharomyces</i> , 1.
Condimentos	Suco de tomate, Massa de tomate. Molhos, Pickles, Pimenta, etc.	29	1	3,7%	Não identificados, 1.
Carnes e similares	Patés, Salames, Mortadelas Linguça, Toicinho, Presunto.	15	1	6,6%	Não identificados, 1.
Vegetais em conservas	Palmitos, Espargos, Feijão.	8	0	0,0%	—
Total dos produtos sólidos		216	68	26,8%	

Produtos alimentares	Especificações	N.º de exames	Resultados positivos	%	Diagnóstico
Mel de abelhas	—	4	2	50,0%	<i>Aspergillus</i> , 1. <i>Rhizopus</i> , 1.
Vinagre	—	4	1	25,0%	<i>Cogumelo não identificado.</i>
Vinhos e vermouths	—	6	1	16,6%	<i>Cogumelo não identificado.</i>
Cervejas	—	6	6	100,0%	<i>Saccharomyces</i> , 3. <i>Torulopsis</i> , 1. <i>Penicillium</i> , 3.
Xaropes	de Capilé, Limão, Moringo, Cereja, Abacaxi, Laranja, Groselha, Guaraná, Amoras Silvestres.	17	16	94,1%	<i>Saccharomyces</i> , 11. <i>Torulopsis</i> , 1. <i>Leveduras não identificadas</i> , 3. <i>Cogumelos não identificados</i> , 1.
Guaranás	—	17	10	58,8%	<i>Saccharomyces</i> , 4. <i>Torulopsis</i> , 2. <i>Zygosaccharomyces</i> , 1. <i>Leveduras não identificadas</i> , 1. <i>Penicillium</i> , 1.
Refrescos e outras bebidas refrescantes	Groselha, chimarrão, Refresco espumante, egipciiano, laranja, água tônica, club-soda, soda limonada, suco jaboticaba, Refr. maçãs, gasosa, Jantubaina, amora, coca-cola, gengibrina.	80	45	56,2%	<i>Saccharomyces</i> , 23. <i>Torulopsis</i> , 7. <i>Picchia</i> , 1. <i>Zygosaccharomyces</i> , 4. <i>Geotrichum</i> , 1. <i>Candida</i> , 1. <i>Penicillium</i> , 1. <i>Rhizopus</i> , 1. <i>Bolores não identificados</i> , 1. <i>Leveduras não identificadas</i> , 1.
Total de bebidas		134	81	60,4%	

RESUMO:

Os autôres estudaram a ocorrência do flora micótica em diferentes produtos alimentares. As amostras isoladas foram identificadas constatando-se ser a grande maioria, constituída por leveduras.

A importancia dêste achado, quer sob o ponto de vista patogênico ou como índice de má preparação dos referidos produtos, é discutido. Normas, para que a incidencia dêstes cogumelos seja reduzida, são preconizadas, pois, dos exames levados a efeito, 60,4% das bebidas e 26,8% dos alimentos sólidos examinados apresentavam-se contaminados.

SUMMARY:

The authors studied the occurrence of mycotic flora in several food stuffs. The isolated strains were identified and the authors verified that most of them were yeasts.

The relative value of the results found is here discussed from the pathogenic aspect or as an index of inefficient preparation. Rules in order to reduce this incidence are suggested, for 60,4% of liquid and 26,8% of solid foods examined were contaminated.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ALMEIDA, F., LACAZ, C. S. e BARROS, O. — 1941 — *Rev. do Inst. Adolfo Lutz*, 1: 395.
- 2 — BÜLLER SOUTO, A. e GODOY, O. — 1942 — *Rev. do Instituto Adolfo Lutz*, 2: 100.
- 3 — GUILLIERMOND, A. — 1912 — *Les Levures*. O. Doin et Fils, editores, Paris.
- 4 — HAMMER, B. W. — 1938 — *Dairy Bacteriology*. 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 5 — HENRICI, A. T. — 1941 — *Bacteriological Reviews*, 5:
- 6 — TANNER, F. W. — 1933 — *Food-borne infections and intoxications*. 1st ed. Published in Champaign, Illinois, by the Twin City Printing Co.
- 7 — TANNER, F. W. — 1932 — *The Microbiology of foods*. 1st ed. Published in Champaign, Illinois, by the Twin City Printing Co.
- 8 — PRESCOTT, S. C. e DUNN, C. G. — 1940 — *Industrial Microbiology*. 1st ed. 2nd impression. McGraw-Hill Book Co., Incorpo., New York and London.
- 9 — SMITH, G. — 1938 — *An Introduction to Industrial Mycology*. London, Edward Arnold & Co. Ltd.

CONTROLE DOS CORANTES DA HULHA EM ALIMENTOS

MÁRIO SAMPAIO MELO
Químico do Instituto Adolfo Lutz

Constituindo o emprêgo dos corantes orgânicos artificiais em gêneros alimentícios um artifício geralmente perigoso e prejudicial para a saúde pública, como já tivemos ocasião de assinalar em outros trabalhos sobre o assunto, nunca será porém, demasiado, dedicarmos mais uma parcela de nossa atenção para êste emprêgo, repisando cada vez mais a necessidade de sua moralização e principalmente a necessidade de investigações mais sérias e mais profundas sobre a qualidade, pureza e inocuidade dessa matéria prima.

Infelizmente o hábito de colorir-se artificialmente gêneros destinados à alimentação humana, muito longe de declinar, aumenta diariamente de modo bem impressionante, como que a constituir um desafio a todos os rigores de fiscalização. Quem quiser uma prova cabal do que afirmamos, que se dê ao trabalho de observar alguns gêneros de bebidas, como xaropes, aperitivos e licores atualmente existentes no comércio, alguns doces, como goiabadas, peçegadas e bananadas, para os quais as leis em vigor intransigentemente proibem o emprêgo de corantes estranhos artificiais ou mesmo naturais; até os doces tipo caseiros, como doces de coco, doces de abóbora e de batata roxa, têm como predominância principal a abundância e intensidade de côres artificiais; as balas de frutas, as balas de ovos, os produtos de confeitaria, onde os pigmentos naturais de coloração são berrantemente substituídos pelos corantes artificiais derivados da hulha; os gelados e sorvetes de tão intenso consumo por partes das populações infantís, onde a laranja, a uva, o limão, o maracujá, o leite, os ovos, enfim, todos os nossos abundantes produtos naturais são implacavelmente substituídos pelas côres artificiais e suas inseparáveis essências também artificiais e perigosas. Êsse abusivo emprêgo, complica-se extraordinariamente, tornando-se geralmente muito mais sério o delicado pela falta de cuidado e escrúpulo com que é empregada essa maté-

ria prima. Geralmente os fabricantes de gêneros alimentícios assim coloridos não se preocupam muito em dar uma perfeita dissolução a seus corantes, antes de sua mistura à massa dos produtos alimentícios que querem colorir. São dêsse modo juntadas grosseiramente porções tais dêsses corantes que, muitas vêzes, depois dos produtos prontos para serem consumidos, ainda conservam no interior da massa, como tivemos ocasião de constatar, cristais inteiros e fragmentos sólidos de corantes não dissolvidos e que uma vez ingeridos, só poderão causar graves danos aos seus ingênuos e incautos consumidores.

Como afirmativa cabal do que acabo de expor, ao me dirigir para o Instituto a que pertença e, ao passar pela Praça da Sé, tive a idéia de adquirir indiferentemente alguns doces vendidos como doces de abóbora, de batata roxa, de coco com ovos e de banana, afim de, com os mesmos, sem temor de me enganar, fazer uma demonstração objetiva do quanto se abusa nesse perigoso mister de colorir-se artificialmente gêneros alimentícios, empregando-se sem contrôle de espécie alguma, corantes derivados da hulha, os mais extravagantes possíveis e geralmente destinados para coloração de substâncias muito diversas de alimentos.

Ao fazer essa aquisição com tôda a naturalidade possível, não me enganei em minha finalidade e nem em meu ponto de vista. Adivinhei ou mesmo, acertei 100%, pois nenhum dos 15 doces adquiridos, correspondia aos seus característicos próprios e naturais e também, nenhum dêles respeitava as determinações do Regulamento Alimentar em vigor. Todos êsses doces se achavam coloridos com um ou mais de um corante da hulha não tolerado para gêneros alimentícios. Os doces ditos de abóbora, em absoluto correspondiam às características de aspecto, gôsto e cheiro típico dêsses doces. Eram constituídos de massa de doce de batata, colorida com corante alaranjado derivado da hulha e não permitido não só para êste tipo de doce como também, para qualquer outro. Êsses produtos tinham portanto, da abóbora, apenas o nome e a côr. Os doces de bata roxa eram de batata, mas batata branca comum, colorida carregadamente com mistura de corantes da hulha não tolerados. O doce de coco com ovos, parecia ter qualquer coisa de coco, mas os ovos foram berrantemente substituídos por corante amarelo derivado da hulha e não tolerado, não só para essa espécie de doce, como também, para todo e qualquer gênero alimentício. A bananada, da qual ainda duvidei ao fazer a aquisição, tendo o seu vendedor me assegurado e garantido ser de fato bananada, e

da boa, ao que se nos afigura, tratava-se de mistura de resíduos de frutas, misturadas, amassadas e fortemente coloridas com corante também derivado da hulha e não permitido para colorir alimentos.

Alguns desses doces, bem como suas lans coloridas, (pranchas ns. 1 e 2), irão ser passadas pela presada e distinta assistência, afim de que se constate e verifique, com toda sua clareza e realidade o quanto se abusa neste artificialismo e, ao mesmo tempo, a quanto se expõe a saúde pública. As lans coradas desses tipos de doce contêm apenas o corante contido em 10 gramas de doce. Pode-se avaliar por aí o teor de matéria corante perigosa e tóxica ingerida pela incalculável freguesia apreciadora dessas tão atrativas guloseimas.

Mas, voltando ao assunto principal de nosso trabalho, acrescentamos que, quanto ao número de corantes orgânicos artificiais tolerados em gêneros alimentícios, a Legislação Paulista sobre o assunto, já saneou em grande parte esse mal, reduzindo o número desses compostos destinados à indústria alimentar, eliminando corantes de ação tóxica ou mesmo suspeita e adotando ao mesmo tempo enérgicas medidas, tendentes a moralizar o seu comércio e o seu emprêgo. Após sérias e demoradas considerações foi conseguida a redução do número desses corantes de 21 para apenas 12; além disso, dita regulamentação, no seu capítulo referente a esses produtos, quando tolera apenas a título precário o emprêgo desses doze corantes, exige taxativamente, além de outros indispensáveis e importantes esclarecimentos sobre a origem de fabricação do produto e sobre seu acondicionamento, que os corantes, quando destinados à indústria alimentar, se apresentem no seu estado de maior pureza, sem estarem de modo algum misturados e que sejam expostos à venda com as denominações comerciais mais comuns e expressamente prefixadas em dito Regulamento e que, até ao momento são as seguintes, dadas na escala cronológica com que se apresentam:

- a) Corantes róseos:
 - 1) Eritrosina;
 - 2) Róseo bengala;
- b) Corantes vermelhos:
 - 3) Bordeaux S;
 - 4) Ponceau RR;
 - 5) Nova coccina;
 - 6) Vermelho sólido;

- c) Corante alaranjado:
 - 7) Alaranjado I;
- d) Corantes amarelos:
 - 8) Amarelo Naftol S;
 - 9) Auramina O;
- e) Corante verde:
 - 10) Verde ácido J;
- f) Corante azul:
 - 11) Azul patente;
- g) Corante violeta:
 - 12) Violeta ácido 6B.

Além desses dispositivos capitais citados, ainda há em dito Regulamento a exigência de caráter vago e elástico que determina, que o emprêgo desses corantes em alimentos só pode ser na *dose estritamente necessária para a obtenção do colorido*. Lógico e preciso seria, para ter essa exigência mais valor e eficiência que se estipulasse um teor máximo dessa matéria prima, afim de controlar-se o abuso mais ou menos comum de grande número de produtos de gêneros alimentícios que costumam empregar desmedidas quantidades de corantes em seus produtos, sem se preocuparem com o perigo que muitas vezes possam causar ao organismo de seus consumidores, com êsses produtos tão berrantemente coloridos e onde geralmente, como já dissemos, o corante se apresenta grosseira e irregularmente dissolvido ou misturado.

Além dessa indispensável e saneadora medida, seria necessário também que todos os corantes, agora não só os de origem orgânica artificial, mas todos os corantes empregados em gêneros alimentícios, mesmo os de origem natural, dados os perigos que possam oferecer, deveriam sofrer sempre um prévio e rigoroso controle, não só de natureza química e toxicológica, como ainda em casos especiais, deveriam sofrer tôdas as provas de caráter fisiológico, biológico e mesmo bacteriológico. Esses exames seriam indispensáveis e de primordial importância, pois corantes há que, rotuladôs e garantidos como puros e inócuos, muitas vezes por má fé, por falhas de fabricação, por defeitos da matéria prima empregada na sua confecção, ou mesmo pelas impurezas quer de origem orgânica ou mineral que contenham, podem constituir compostos de natureza tóxica, prejudicial e perigosa. Não falemos dos corantes que, apesar de criminosamente rotulados como puros e inofensivos, são na maioria das vezes, constituídos de substâncias suspei-

tas, de ação tóxica e de efeito elevadamente nocivo para a saúde pública. Infelizmente êsses produtos se encontram por aí num comércio livre e criminoso, burlando tôdas as exigências e rigores de fiscalização e tôda a eficiência de contrôle sanitário.

Vemos pois que, a par do contrôle quantitativo, a inocuidade dos corantes deve ser investigada e constatada com todo o rigor afim de que só sejam aprovados e licenciados para a indústria alimentar, os que comprovadamente sejam perfeitamente puros e inócuos. Procedendo rigorosamente a êsses exames prévios, teremos eliminado grande número de corantes que mesmo aparentando inocuidade constituem às vêzes, produtos impróprios e de efeito altamente nocivo, tais as suas impurezas, tais as quantidades desmedidas de seu emprêgo.

Nós devíamos acompanhar os Regulamentos e Legislações modernizadas que tratam do assunto com muito mais rigor, pois já controlam melhor e já restringem obrigatoriamente a quantidade máxima dos corantes quando empregados na indústria alimentar.

Êsses Regulamentos controlam os corantes da hulha não só na sua qualidade, como também na sua quantidade, exigindo rigorosas características de pureza, quantitativamente determinadas. A legislação do Domínio do Canadá, por exemplo, exige categòricamente que tais produtos, quando destinados a serem empregados em gêneros alimentícios, devam ser manipulados de um modo mais cuidadoso e especial, de maneira a constituir produtos puríssimos, sob todos os aspectos, não contendo metais pesados (com isenção do ferro) e não contendo arsênico senão num teor máximo de 10 partes por milhão, referidos ao pêso real da matéria corante. Além dessas exigências de caráter qualitativo, obriga ainda a mesma Legislação, que a quantidade máxima usada não exceda em caso algum, a 2 grais por lb., correspondentes a 0,12 gramas por cada 450 grs. ou sejam 0,260 grs. de corante para cada quilo de alimento.

A Legislação Suíça, uma das mais completas sôbre o assunto, na parte referente a corantes é também bastante severa, pois controla rigorosamente tôda a matéria corante que possa afetar a saúde pública. Dêsse modo contém exigências legais dispondo não sòmente sôbre os corantes destinados a colorir gêneros alimentícios, mas também sôbre todo o material corado utilizado nas confecções dos objetos de uso escolar, como aquarelas, lapis de côr, giz colorido, etc., sôbre todos os objetos de adôrno, como velas de natal, flores de papel, brinquedos coloridos, objetos de toucador, etc.. Além disso controla ainda tôdas as preparações tintoriais empregadas para

tingir tecidos destinados à confecção de vestimentas, preparações essas que devem ser completamente isentas de chumbo, arsênico, ácido pícrico, coralina, bem como tôda e qualquer substância nociva que possa ser facilmente absorvida pela epiderme.

A Legislação Norte Americana em vigor é também bastante rigorosa neste ponto de vista, pois exige que cada corante, quando destinado a colorir alimentos, ou artigos de toucador (cosméticos, rouges, batons, etc.), apresente características eliminatórias de pureza. Para os 18 corantes da hulha destinados a colorir alimentos são exigidos teores limitados ao máximo de substâncias insolúveis nágua, de côres subsidiárias e outros elementos e impurezas que possam fazer parte da composição do corante e prejudicar a sua utilização. A par dessas exigências determina ainda, que ditos corantes apresentem um teor mínimo de côr pura, que é sempre dosado quantitativamente.

A recente Regulamentação Sanitária da Venezuela, onde um corpo de abalizados técnicos também teve sua atenção voltada para a importância do assunto, transformou seu Regulamento sôbre Importação, Elaboração e Venda de Alimentos, no qual absurdamente se permitia o total de 49 corantes da hulha, modernizando-o e reduzindo êsse elevado número de corantes para a cifra de 9 apenas, cancelando a permissão para o emprêgo em alimentos de dêrca de 40 corantes derivados da hulha, procurando dêsse modo, dificultar e restringir do maior modo possível o emprêgo de corantes orgânicos artificiais, incentivando ao mesmo tempo, para os casos necessários de coloração, o emprêgo de preferência dos corantes naturais e inofensivos para a saúde pública.

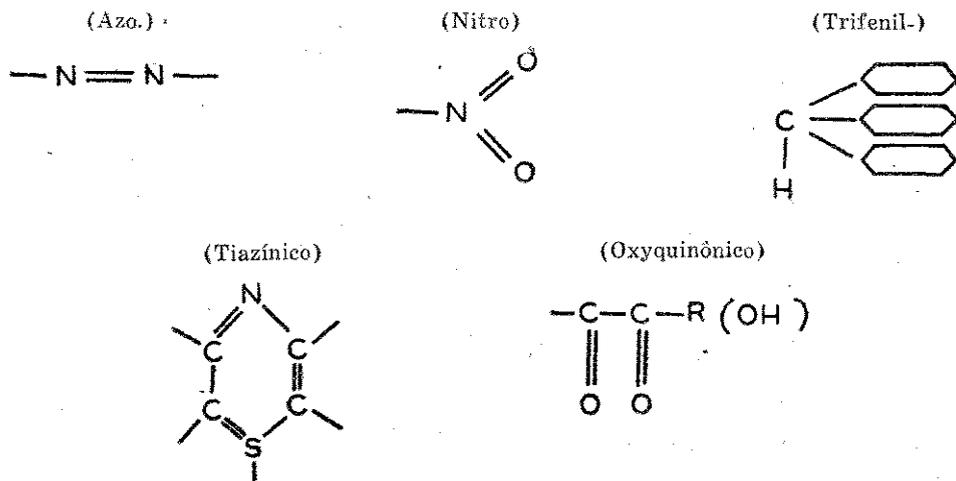
Essas Regulamentações citadas, mais perfeitas e mais modernas foram muitas vêzes rigorosamente elaboradas, tendo-se em vista os graves perigos que possam oferecer os corantes orgânicos artificiais quando ingeridos ou mesmo quando em simples contacto com a epiderme. A questão do poder toxicológico dos corantes apesar de constituir um assunto muito delicado e relativamente pouco experimentado e haverem mesmo, algumas divergências entre os seus êstudiosos, no entretanto alguma cousa já se tem resolvido sôbre o assunto, concluindo-se positivamente tratar-se de matéria prima de natureza muito delicada e requerendo ainda, cuidados e experimentações.

Está de antemão verificado que, com a ingestão dos corantes da hulha, há geralmente pigmentação colorida nos tecidos orgânicos. Experiências procedidas administrando-se Amarelo Naftol S

(corante tolerado por quase tôdas as Legislações do mundo) a animais, coelhos e cobaias, êsses animais depois de sacrificados apresentaram pigmentados de amarelo quasi todos os órgãos vitais, principalmente estômago, duodeno e rins.

Há observações também provando que, dentre os corantes orgânicos artificiais, nos de tonalidades amarelas e alaranjadas é que se encontram maiores teores de material tóxico. Teores bem menores são encontrados dentre os de coloração verde ou violeta e, em casos mais raros, nos vermelhos. Foi constatado também que a maior parte dos corantes de natureza tóxica pertence aos agrupamentos característicos abaixo, ao passo que com a introdução nas moléculas corantes, de agrupamentos sulfônicos, oxidrilas e carboxilas, sua toxidez é amenizada tornando-os muitas vêzes inofensivos.

Os corantes nitrados, por exemplo, constituem material de natureza altamente tóxica, porém, têm diminuída ou perdem totalmente essa toxidez, quando prèviamente sulfonados.



Temos como exemplo típico dêsse caso o Amarelo Naftol ou Amarelo de Martius, de natureza muito tóxica, mas que por uma simples sulfonação transforma-se no Amarelo Naftol S, de efeito inócua e de uso difundido por quase todos os países do mundo. Restará apenas verificar-se se esta sulfonação foi perfeita e total, devendo-se para isso, dosar sempre quantitativamente o teor de

corante amarelo são sulfonado, isto é, o amarelo de Martius contido acidentalmente no corante destinado para fins alimentares. O teor máximo tolerado dessa impureza no Amarelo Naftol S deverá ser de 0,03 gr. %. Do mesmo modo o Alaranjado I costuma ter como impureza o Alaranjado II, considerado tóxico e com teor máximo tolerado limitado a 5,0%.

Estudos recentemente procedidos por experimentados pesquisadores esclarecem que a toxidez dos corantes geralmente acarreta a degeneração e conseqüente morte das células que êles conseguem impregnar. Experiências feitas com protozoários e outros seres inferiores provaram que tôda a coloração do protoplasma sôbre a totalidade do núcleo deve ser um indício seguro da destruição da célula, pois o protoplasma e o núcleo só adquirem coloração depois de desvitalizados. Os derivados do alcatrão da hulha que se fixam sôbre o protoplasma conseqüentemente acarretam sua morte por impregnação do tecido.

Experiências posteriores procedidas por Cazeneuve, Damianovich e outros pesquisadores demonstraram que a ação dos agrupamentos auxo cromos $-\text{SO}_3\text{H}$ nos corantes como também nos alcaloides, tornam êsses produtos menos tóxicos. A fucsina ácida, por exemplo, contendo na sua composição molecular três agrupamentos $-\text{SO}_3\text{H}$, produz dêbeis soluções vitais e porisso é quase inofensiva para os infusórios quando comparada com a ação da Fucsina básica que desprovida dêsses agrupamentos típicos, tem efeito muito diverso, tingindo intensamente o corpo celular dos microorganismos e afetando-os em sua vitalidade. Dita fucsina básica demonstra pois, ser de efeito francamente tóxico para com estes seres inferiores, sendo mesmo mortal em soluções de concentração de 0,001 por cento, devendo-se notar que tóxicos violentos como o nitrato de estriquinina, nesta mesma concentração, não apresentam efeito tão tóxico e desastroso.

O verde malaquita, até ainda bem pouco tempo tolerado entre nós e cancelado pela atual Legislação Alimentar Paulista, mas ainda tolerado pela Legislação Federal do país, bem como o Azul de Metileno, que apesar de não ser tolerado em alimentos é grandemente utilizado em medicina, apresentam muitas vêzes características tóxicas por conterem em sua composição teores de zinco sob a forma de cloretos.

Outros corantes, pela sua ação fisiológica propícia têm seu emprego como agentes medicamentosos. A violeta de metila, bem

como a auramina são denominados em medicina com a designação de Pioctaninum (eliminador do pus). Esses corantes com sua pigmentação típica roxa e amarela, foram muito empregados como agentes antibactericidas, na oftalmologia, na cirurgia, contra infecções malignas, sendo no entretanto abandonado seu uso por causa da ação secundária provocada pela sua intensa e persistente pigmentação, principalmente a Pioctaninum aureum que nada mais é que a Auramina O, ainda tolerada para colorir alimentos.

A. Iodlbauer, Busch e Salvendri observaram que alguns corantes, possuindo propriedades de fluorescência, como a fluoresceína e seus derivados, bem como alguns corantes derivados da acridina, podem exercer no organismo animal uma ação fotodinâmica. Dêsse modo animais injetados com êsses corantes apresentam interessantíssimos fenômenos de fluorescência. Do mesmo modo notável ação dêsses corantes foi presenciada em bactérias.

Icard assegura constituir a fluoresceína um meio muito propício e seguro para, em casos de dúvida, decidir e constatação da morte. Sofrendo injeções subcutâneas de uma solução alcalina de fluoresceína, um corpo ainda animado, dentro de alguns minutos toma uma coloração típica verde-amarelada. Se porém, a circulação dos humores já foi totalmente paralisada não é constatado tal fenômeno. Conforme a opinião de inúmeros experimentadores, essa reação é preferível a tôdas as outras então empregadas para o diagnóstico da morte.

A sulfonação dos corantes, como já tivemos ocasião de observar no caso do Amarelo Naftol S, constitue um bom meio de defesa natural do organismo, permitindo a neutralização da ação tóxica dos produtos do metabolismo. Esta asserção no entretanto, não quer dizer que seja apenas suficiente introduzir-se agrupamentos sulfônicos a um produto qualquer, tóxico, para que êle se torne inócua para o organismo vital.

O dedicado e paciente pesquisador Chlopin, estudando cerca de 50 corantes diferentes, pertencentes a 10 agrupamentos quimicamente diversos, constatou que 15 dêsses corantes eram francamente tóxicos e 20 suspeitos por provocarem distúrbios funcionais, digestivos, renais e circulatórios com grande repercussão no estado geral do organismo. Dentre êsses corantes considerados tóxicos, acha-se incluída a Auramina O que ainda é tolerada pelos nossos regulamentos, mas que já está sendo estudada e será posta à margem afim de ser eliminada do número dos corantes artificiais tolerados em gêneros alimentícios. A ação cáustica da Auramina O sobre a

pele, foi verificada aplicando-se simplesmente sôbre a epiderme, por algum tempo, um algodão embebido em solução de dito corante. Foi observada, após alguns dias, uma inflamação no local da aplicação. Entre os corantes suspeitos, na opinião de Chlopin, acha-se incluído o Ponceau RR, por nós tolerado, mas não tolerado pela lei Norte Americana e nem tampouco pela lei do Domínio do Canadá. O afastamento pois, dêsse corante do número dos tolerados a título precário, está sendo estudado afim de ser procedida a sua substituição. Coincidindo com a observação de Chlopin, já existem estudos e observações entre nós, que indicam serem os corantes orgânicos artificiais, os grandes responsáveis pelo intenso número de distúrbios funcionais, males digestivos, ulcerações e moléstias consequentes que tão frequentemente são encontradas dentre as populações.

Para concluir esta dissertação sôbre a possível toxidez dos corantes, diremos ainda que, a maior ou menor toxidez dos corantes é sempre atribuída a maiores ou menores combinações insolúveis com as proteínas do plasma. Dêsse modo os corantes que mesmo se achando em grandes dissoluções possam ainda assim produzir tinturas vitais afetando as células, devem ser considerados como tóxicos. Para comprovar praticamente essa asserção, foi constatado que o azul de alizarina, não tendo ação enérgica por não se combinar facilmente com o protoplasma animal, não apresenta porisso ação tóxica para os tecidos.

Damianovich chegou à conclusão que os efeitos tóxicos dos corantes correspondem em geral proporcionalmente a tinturas mais intensas. Verificou também que os corantes básicos são muito mais tóxicos que os corantes ácidos da mesma procedência e nas mesmas condições, aliás como já vimos com o caso da fucsina. Os corantes básicos impregnam mais fácil e intensamente todo o corpo celular dos microorganismos, ao passo que as corantes ácidos são mais inofensivos por não produzirem senão débeis e fracas colorações vitais.

A questão pois, da intensidade de pigmentação dos corantes em função do organismo vivo, é de grande importância. Trabalhos de Cazeneuve, Arloing e Lepine, mostram que o Alaranjado I, bem como o Bordeaux S e o Amarelo Naftol S são tolerados em sensíveis proporções comparados relativamente com os outros corantes tolerados para colorir alimentos.

A toxidez dos corantes é pois ainda uma questão muito delicada, dependendo de mais experimentação e estudos, havendo mesmo, como já dissemos, divergências entre as opiniões de abalizados especialistas e estudiosos do assunto.

Merece pois, um pouco mais de atenção e esclarecimentos por parte dos encarregados de zelar pela Saúde Pública, pois a introdução no organismo humano de qualquer corante da hulha constitue sempre um grande perigo, pois pode facilmente acarretar princípios danosos e mortais para as células, trazendo com isso, um início de desequilíbrio vital de consequências imprevisíveis e isto tudo devido às impropriedades desses corantes, devido às impurezas nelles contidas, devido às quantidades intensas de seu emprêgo, devido afinal, em muitos casos, à falta de segurança na identificação de sua inocuidade.

Procurando, pois, acompanhar mais de perto essas Legislações que se modernizam, que se aperfeiçoam e evoluem, somos de parecer que deveríamos também controlar quantitativamente o emprêgo dos corantes orgânicos artificiais em gêneros alimentícios, introduzindo em nossas leis e regulamentos, exigências tais que moralizassem o emprêgo dessa matéria prima de efeitos ainda tão obscuros, discutidos e perigosos para a saúde pública.

Com êsse intuito, procedemos a uma série de padrões coloridos contendo quantidades certas e determinadas de cada um dos 12 corantes orgânicos artificiais até então tolerados a título precário pelo nosso Regulamento em vigor.

Com êsses padrões quantitativos e, ao mesmo tempo qualitativos em intensidade de côr, poderíamos já ter uma base inicial, para tentarmos esta tão necessária e inadiável medida.

O quadro abaixo, contém a escala cronológica desses 12 corantes da hulha, com a respectiva quantidade do corante em natureza que, uma vez dissolvidos em 1.000 ml. de água destilada, serviram para, dêsse modo, darem as soluções iniciais que padronizaram as outras tonalidades de diluição para cada corante e constante de um quadro cromático, junto em anexo.

Estes tipos iniciais de coloração contêm a nosso ver, as quantidades máximas necessárias de cada corante para cada quilo de alimento, por apresentarem colorações bastante intensas, típicas e específicas.

Segue-se o quadro com os dados numéricos correspondentes às respectivas quantidades de cada corante "in natura" dissolvidos em 1.000 ml. de água destilada, como acima dissemos e que poderão servir de base padrão para a limitação dos teores máximos a serem tolerados para cada um desses 12 corantes.

Eritrosina	0,200	grs. por mil
Róseo bengala	0,250	" " "
Bordeaux S	0,125	" " "
Ponceau 2 R	0,125	" " "
Nova coccina	0,200	" " "
Vermelho sólido	0,250	" " "
Alaranjado I	0,125	" " "
Amarelo Naftol S	0,250	" " "
Auramina O	0,250	" " "
Verde ácido J	0,250	" " "
Azul Patente	0,250	" " "
Violeta ácido 6B	0,125	" " "

Segue-se também junta em anexo uma prancha cromática contendo intensidades de côr correspondentes a cada uma dessas concentrações (prancha n.º 3). Obtidas essas soluções para as quais foram utilizados corantes com suas características de qualidade e pureza por nós bem identificadas, fomos com sucessivas diluições dessas soluções padrões, obtendo tonalidades gradativas proporcionais e uniformes para cada corante.

De cada solução padrão inicial foram tomados 100 ml., dos quais 50 depois de diluídos com mais 50 ml. de água destilada e levemente acidulados, serviram para constituir a primeira tonalidade, a mais acentuada de tôdas, após a completa montagem sobre uma grama de lã branca, pura, e perfeitamente desengordurada e seca, de tôda a matéria corante contida nos 50 ml. inicialmente tomados. Foram assim obtidos os padrões cromáticos iniciais para cada corante e constantes do quadro cromático em anexo. Os 50 ml. restantes da tomada de ensaio inicial foram elevados ao volume de 100 ml. com água destilada e após prévia uniformização do líquido corado foram medidos 50 ml. dessa amostra assim preparada, procedendo-se em seguida à montagem de todo o corante dissolvido noutra grama de lã nas mesmas condições já anotadas, obtendo-se a segunda tonalidade da série.

Dêsse modo foram obtidas sucessivamente para cada corante, seis tonalidades diversas mas perfeitamente controladas, medidas e proporcionadas. Essas 72 tonalidades constarão de quadros cromáticos (Pranchas n.º 4 e 5) onde poderão ser observadas ao par das quantidades de corantes nelas contidos, as distintas tonalidades obtidas, uma vez fixadas completamente sobre uma grama de lã branca nas condições acima estipuladas. Para alguns desses corantes, como por exemplo, para os de natureza básica, não foi procedida a ligeira acidulação citada, assim como para alguns co-

rantes de fortes tonalidades iniciais, como o Róseo bengala, o Alaranjado I e o Violeta ácido 6B, afim de permitir a fixação de toda a matéria corante na lã, foram procedidas diluições proporcionais de acôrdo com os dados numéricos constantes do quadro cromático.

Uma vez obtidas essas tonalidades padronizadas, já poderíamos observar as possibilidades de controlar-se colorimêtricamente comparando apenas essas colorações ou medindo-as em intensidade de côr e em paralelo com seu teor de dissolução.

Dêsse modo, admitidas e limitadas obrigatòriamente as quantidades máximas de corantes a serem juntados em alimentos, serão de acôrdo com o caso, admitidas técnicas de verificação e contròle dêsses teores, técnicas essas, já em experimentação.

Teremos assim preenchido uma lacuna mais ou menos comum e geral em todos os Regulamentos, sôbre êsse possível e tão necessário contròle quantitativo de corantes em gêneros alimentícios.

Ao apresentarmos essa iniciativa, durante o desenrolar dêste 2.º Congresso Brasileiro de Química, estamos apenas procurando justificar a inclusão nas leis de nosso país, sôbre generos alimentícios, de exigências tais que eliminem o emprêgo de corantes sôbre os quais paire a mínima desconfiança de toxidez, que permitam e exijam o contròle de suas qualidades e seus teores de impurezas e que finalmente, estipulem obrigatòriamente as quantidades máximas que possam ser empregadas sem perigo ou prejuizo para a Saúde Pública.

Por isso, estamos batalhando para conseguirmos, num só ponto de vista, uma Legislação Federal sôbre todos os gêneros alimentícios, que abranja e favoreça a todos os recantos de nossa terra, em defesa sincera, devotada e unísona de todos os brasileiros e semelhantes que conosco convivem.

Como contribuição a êste Código Brasileiro de Alimentação, tão aspirado e tão necessário, daremos a seguir alguns detalhes do capítulo sôbre corantes, que deverá figurar no Novo Regulamento Sanitário sôbre gêneros Alimentícios, que está sendo presentemente elaborado em São Paulo.

“São tolerados a título precário e a juizo das autoridades competentes, os corantes orgânicos artificiais derivados do alcatrão da hulha, abaixo discriminados, desde que se apresentem em estado de maior pureza, satisfazendo os índices de pureza exigidos por êste Regulamento e desde que não sejam empregados em quantidades superiores a 0,250 g para cada 1.000 g de alimento.”

São os seguintes os corantes orgânicos artificiais que deverão ser tolerados nas condições acima estipuladas:

a) Corantes róseos:

- 1) *Eritrosina* (Tetraiodo fluoresceína sodada).
- 2) *Rose-bengala* (Tetraiodo di cloro fluoresceína sodada).

b) Corantes vermelhos:

- 3) *Bordeaux S* (α naftaleno — 4 — sulfonato de sódio — azo — B naftol dissulfonato de sódio — Sal R).
- 4) *Ponceau RRR* (pseudo cumylazo — 2 — naftol — 3-6 — dissulfonato de sódio).
- 5) *Nova coccina* (α cumeno — azo — B — naftol di sulfonato de sódio).

c) Corante alaranjado:

- 6) *Alaranjado I* (α naftol azo benzeno di sulfonato de sódio).

d) Corantes amarelos:

- 7) *Amarelo Naftol S* (2-4 dinitro α naftol 7 mono sulfonato de sódio).
- 8) *Amarelo Naftol S* (*Sal K*) (2-4 — dinitro α naftol mono sulfonato de potássio).

e) Corantes verdes:

- 9) *Verde ácido J* (Di etil di benzil di paramino tri fenil carbinol sulfonato de sódio).
- 10) *Verde guinea* (Di para dietil di benzil diamino tri fenil carbinol dissulfonato de sódio).

f) Corantes azues:

- 11) *Azul patente* (Tetra metil-di para amido-meta oxitri-fenil carbinol-di sulfonato de cálcio).
- 12) *Indigotina* (Sulfo indigotato de sódio).

Para a aprovação de qualquer um desses corantes, quando destinados a colorir alimentos, deverão os mesmos apresentar índices eliminatórios de pureza, dando-se para cada corante, um limite máximo para suas substâncias voláteis a determinadas temperaturas, teores máximos para seus extratos etéreos, para seus insolúveis n'água, para suas impurezas, como sulfatos, cloretos, carbonatos,

óxidos, côres inferiores e subsidiárias, assim como deverão apresentar também um *índice mínimo* de côr pura que será sempre quantitativamente dosada. Em ditos corantes não serão permitidos teores de arsênico senão no máximo de 0,00014 por cento, assim como 0,001 por cento de chumbo. Para outros metais, como cromo, mercúrio, cobre, zinco e outros, só será admitida a presença de traços, quando tratados pelo H_2S .

Além dêsses novos dispositivos e das severas exigências já existentes, pretendemos também incluir mais o seguinte:

“Todos os fabricantes, importadores ou vendedores de corantes de qualquer espécie, destinados a colorir gêneros alimentícios, serão obrigados a registro no Serviço de Policiamento da Alimentação Pública, e tôdas as substâncias corantes destinadas para a coloração de gêneros alimentícios, só poderão ser usadas ou expostas à venda, depois de analisadas e devidamente registradas.”

“O exame dessas matérias corantes será procedido por partidas do produto manufaturado ou importado, colhendo-se de cada partida uma amostra para a devida análise, sendo seu vasilhame interdito e lacrado até que seja fornecido o certificado de contrôle e o selo de garantia com o respectivo número de contrôle de cada partida examinada e aprovada.”

“O fabricante, importador ou vendedor de corantes destinados a colorir gêneros alimentícios, receberá um certificado de contrôle, declarando que o produto satisfaz as exigências para os padrões de identidade e de qualidade.”

“O fabricante, importador ou vendedor de corantes destinados a colorir gêneros alimentícios, será obrigado a informar ao Laboratório Central de Saude Pública (Instituto Adolfo Lutz) por meio de um boletim mensal, quais as pessoas a quem forneceu corantes para ditos fins, declarando o nome e o enderêço dos compradores, a quantidade e a qualidade do corante vendido e seu respectivo número de contrôle.”

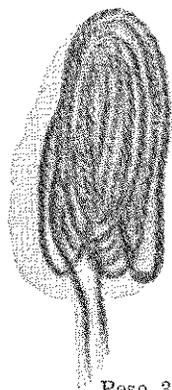
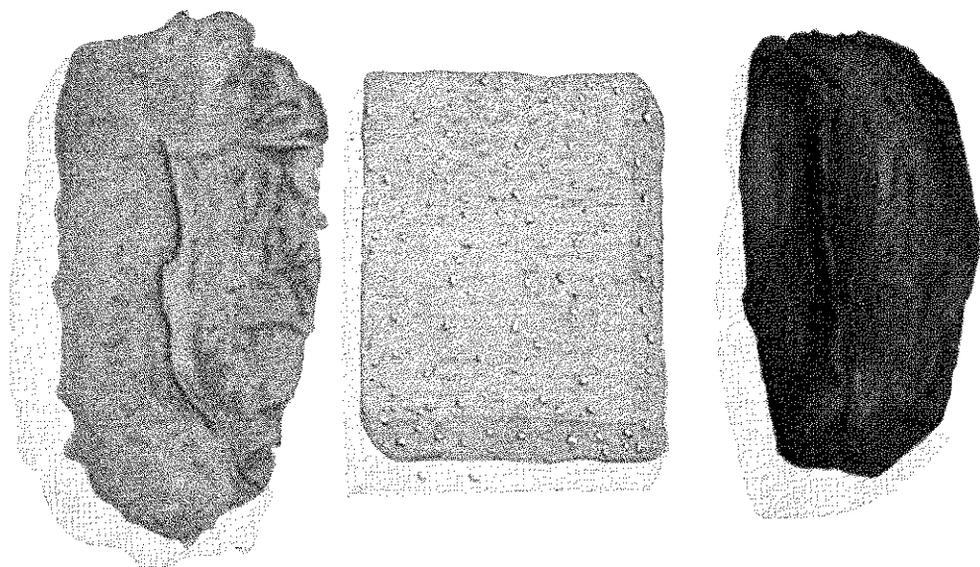
Relatando antecipadamente aos presados colegas dêste Congresso, pormenores do que, sôbre corantes, pretendemos incluir no futuro Código Sanitário sôbre gêneros alimentícios, vamos finalizar essa série de considerações, reafirmando que confiamos seguramente em nossas autoridades sanitárias e científicas, afim de que as mesmas concorram também, com suas sábias e eficientes observações sôbre êste tão importante e delicado assunto, intensificando a fiscalização dêsses produtos, fazendo suas próprias pesquisas fisiológicas, suas provas de laboratório, enfim, todos os contrôles tão necessários e úteis, afim de que, num perfeito acôrdo de idéias e

conclusões, possamos, cada vez mais, ampliar o aperfeiçoamento das Leis Sanitárias Brasileiras, procurando sanear e restringir tudo que possa concorrer, no mínimo que seja, para prejudicar ou ocasionar males à saúde de nossos semelhantes.

Fazendo-se um estudo mais rigoroso e uma campanha fiscalizadora mais séria e eficiente sôbre o assunto, controlando-se com mais energia êsse abusivo emprêgo de corantes orgânicos artificiais, derivados da hulha em alimentos, estaremos, como é de nosso dever, zelando e defendendo a Saúde Pública, realizando uma verdadeira obra de Saneamento e, ao mesmo tempo, defendendo a pujança da raça e o valor inegualável da nacionalidade Brasileira.

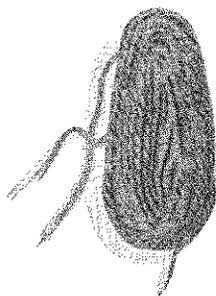
NOTA: O presente trabalho foi apresentado ao 2.^o Congresso Brasileiro de Química, realizado em janeiro último na cidade de Curitiba, onde seu autor esteve representando oficialmente o Estado de São Paulo, conquistando em plenário, um unânime voto de louvor pela clareza de exposição e alta significação do assunto.

PRANCHA CROMATICA N. 1



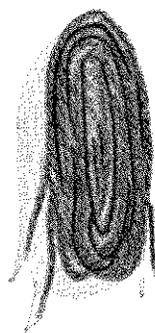
Peso 38 grs.

Adquirido como doce de abobora na Praça da Sé N.º (Presença de corante da hulha não permitido).



Peso 40 grs.

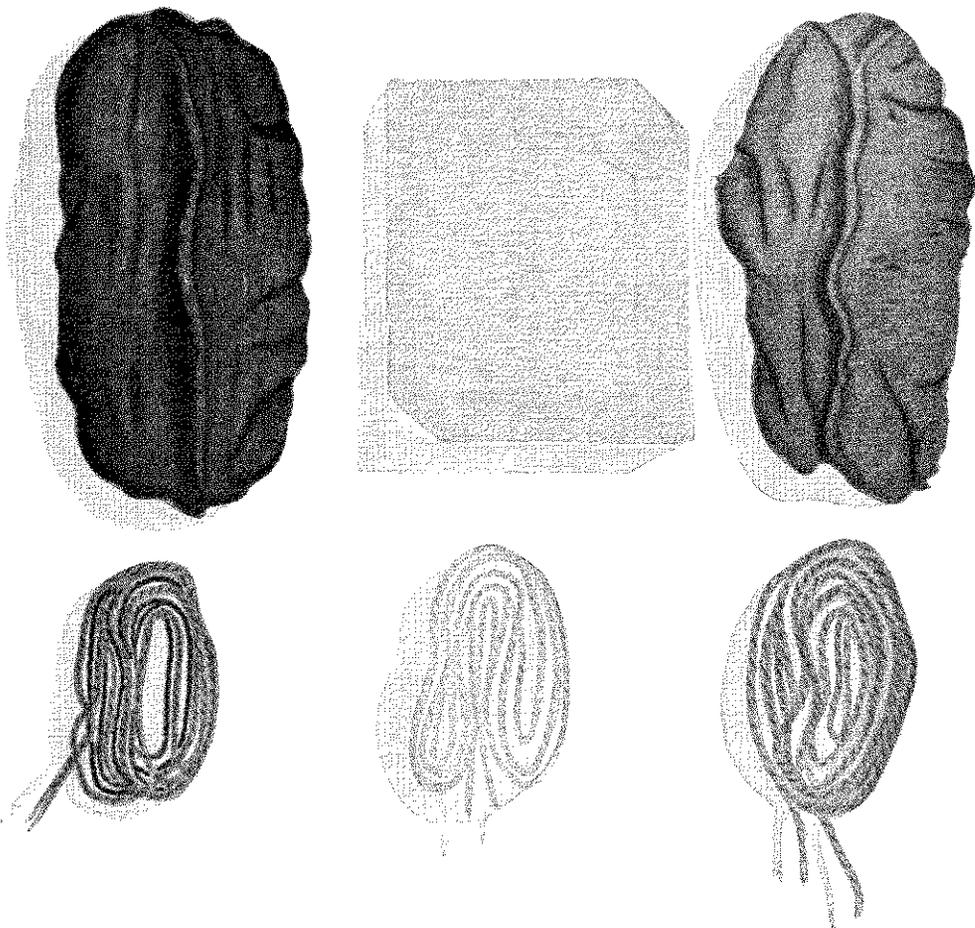
Adquirido como bananada na Praça da Sé N.º (Presença de corante da hulha não permitido).



Peso 32 grs.

Adquirido como doce de batata-roxa na Praça da Sé N.º (Presença de corantes da hulha não permitidos).

PRANCHA CROMATICA N. 2



Peso 30 grs.

Adquirido como doce de batata-roxa na Praça da Sé N.º (Presença de corantes da hulha não permitidos).

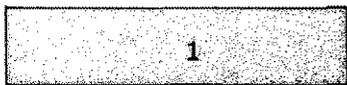
Peso 35 grs.

Adquirido como doce de côco na Praça da Sé N.º (Presença de corante da hulha não permitido).

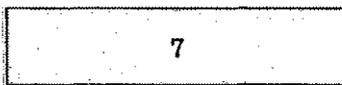
Peso 40 grs.

Adquirido como doce de abobora na Praça da Sé N.º (Presença de corante da hulha não permitido).

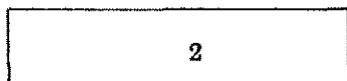
PRANCHA CROMATICA N. 3



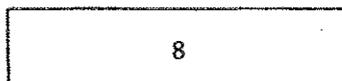
1
Eritrosina
0,200 0/00



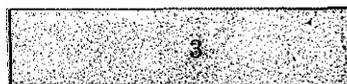
7
Alaranjado I
0,125 0/00



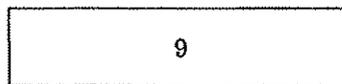
2
Roseo bengala
0,250 0/00



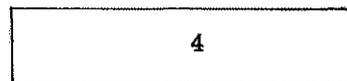
8
Amarelo naftol S
0,250 0/00



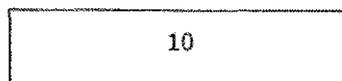
3
Bordeaux S
0,125 0/00



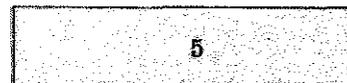
9
Auramina O
0,250 0/00



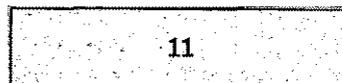
4
Ponceau 2R
0,125 0/00



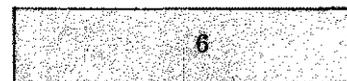
10
Verde acido J
0,250 0/00



5
Nova coccina
0,200 0/00



11
Azul patente
0,250 0/00



6
Vermelho solido
0,200 0/00



12
Violeta acido 6 B
0,125 0/00

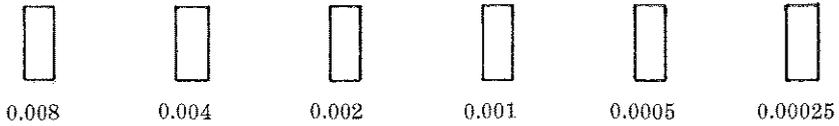
PRANCHA CROMATICA N. 4

CORANTES ROSEOS

Eritrosina

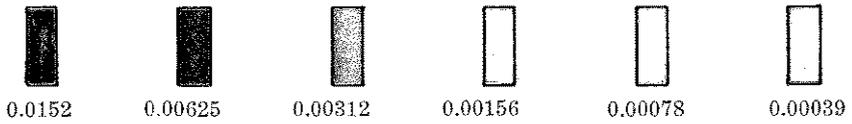


Roseo bengala

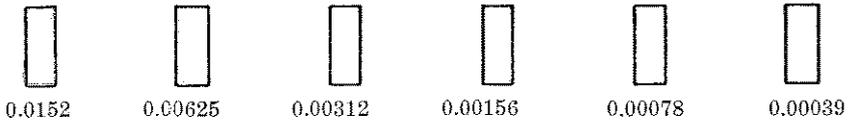


CORANTES VERMELHOS

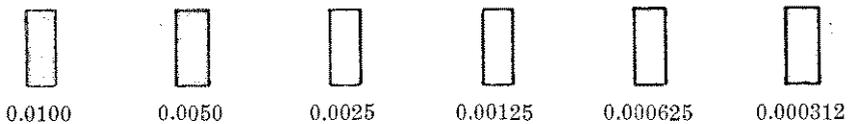
Bordeaux S.



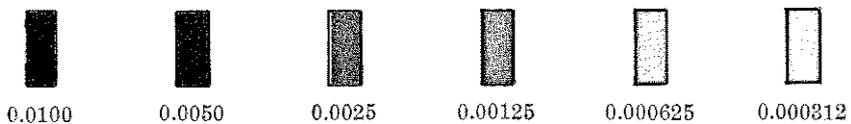
Ponceau 2 R.



Nova coccina



Vermelho solido

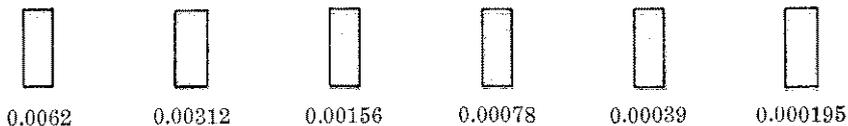


Lima

FRANCHA CROMATICA N. 5

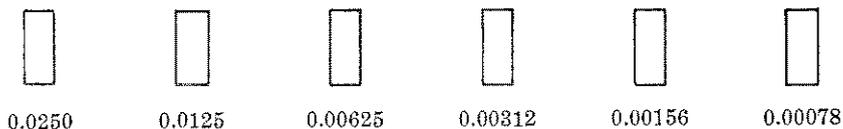
CORANTE ALARANJADO

Alaranjado I.

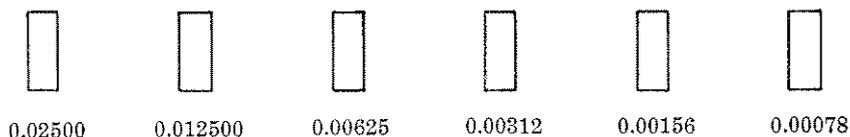


CORANTES AMARELOS

Amarelo naftol S.

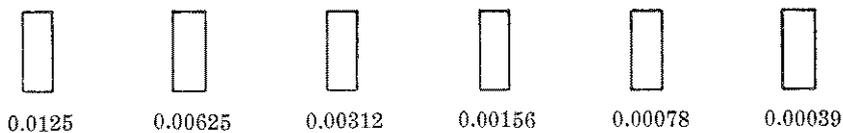


Auramina O.



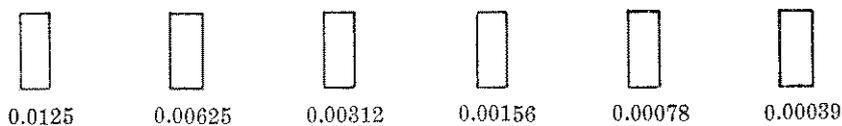
CORANTE VERDE

Verde acido J.



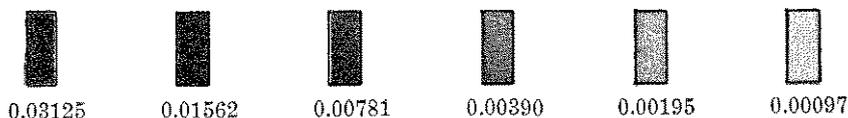
CORANTE AZUL

Azul patente



CORANTE VIOLETA

Violeta acido 6 B.



Lima

CORANTES ORGÂNICOS ARTIFICIAIS EM GÊNEROS ALIMENTÍCIOS

Suas fórmulas, constituição, sinonímia e características.

MÁRIO SAMPAIO MELO

Químico do Instituto Adolfo Lutz

O emprêgo de corantes orgânicos artificiais em gêneros alimentícios, apesar de consistir, n'uma simples operação diluitória e variar apenas na escolha e na intensidade do material corado a ser utilizado, acarreta não poucas vêzes, múltiplas e sérias dificuldades aos que tenham de lançar mão desse artifício, obrigados muitas vêzes, pelo vício, pela força do hábito ou ainda, pela natureza de seus produtos.

Apesar de opinarmos intransigentemente pela premente necessidade da diminuição e severo contrôle dos corantes orgânicos artificiais em alimentos, por reconhecermos constituir êsse emprêgo, na maioria dos casos, uma desnecessidade e por consistir mais num ótimo recurso para os fabricantes encobrirem a má qualidade e os defeitos de seus produtos ou para falsamente valorizá-los, dando-lhes melhor aparência e melhor apresentação, com o colorido atrativo de tons vivos e variados, reconhecemos, no entretanto, não ser possível em casos excepcionais, deixar categoricamente de lado essa concessão tão antiga, deitando por terra êsse tão enraizado emprêgo.

Temos o exemplo de diversos tipos de bebidas como também de diversos produtos decorativos de confeitaria que excepcionalmente necessitam de uma fantasia colorida que lhes empreste maiores atrativos e maior acolhida por parte do público consumidor. Diz a arguta observação dos comerciantes interessados que, tudo mais enfeitado e colorido desperta mais atenção e aguça melhor a cubiça de sua freguesia, aumentando, dêsse modo, seu comércio e vendas.

Na impossibilidade pois, como seria de nosso ardente e sincero desejo, de vedar terminantemente o emprêgo de todo e qualquer corante orgânico artificial em gêneros alimentícios vamos, pri-

meiramente, coordenar algumas observações sôbre essa matéria prima tão vasta e complicada, com o fito principal de esclarecer melhor o assunto de modo a facilitar aos que dela tenham necessidade, assim como aos que sejam incumbidos das pesquisas e caracterizações necessárias para seu devido contrôle.

Existindo atualmente no comércio uma farta multiplicidade de milhares de corantes artificiais de origem e constituição diferentes, é geralmente muito difícil o contrôle exato na procura da matéria corante própria e adequada para êste ou aquele gênero alimentício. Surgem, dêsse modo, sérios impecilhos na escolha da matéria corante que, ao mesmo tempo, satisfazendo as especificações legais, satisfaça as exigências do produto. Surgem ainda, as dificuldades de obtenção de tons e coloridos certos e constantes para determinados produtos cuja coloração permanente e própria, já muitas vêzes contribue grandemente para sua especificação. E mais, as sérias dificuldades de segura aquisição por certa e determinada denominação da matéria corante que, com garantia, satisfaça simultaneamente as exigências do produto e as determinações regulamentares, no que diz respeito à sua origem, composição e estado de pureza, pois, existindo no comércio, como já assinalámos, um tão avultado número de corantes das mais variadas espécies e origens e, dando cada fabricante aos seus produtos, denominações próprias e extravagantes, concorre tudo isso para trazer aos consumidores dessa matéria prima grandes dificuldades e confusão.

Afim de procurar facilitar a escolha, seleção, reconhecimento da pureza e identificação desses corantes orgânicos artificiais derivados do alcatrão da hulha, tolerados na indústria alimentar, coordenámos diversos apanhados esparsos a par de algumas observações pessoais sôbre tão vasto assunto. Vamos dêsse modo, ampliar o nosso trabalho sôbre essa matéria prima, dando algumas de suas características principais, seu pêso molecular, sua composição química, suas fórmulas de constituição, seu modo de obtenção, sua sinonímia, suas características de pureza, em alguns casos com sua origem de fabricação representada abreviadamente por iniciais colocadas após a denominação dada ao respectivo corante.

Além disso, completamos o nosso trabalho dando o comportamento dêsses corantes com diversos reagentes, quer estejam os corantes sob a forma de dissoluções, quer montados sôbre fibras ou quer ainda, sob sua forma natural de apresentação. Nós adotamos

sempre, de preferência, a caracterização da matéria corante combinada a fibras animais, geralmente lã, em vista das facilidades que apresenta essa fixação e dos resultados analíticos sempre muito claros e concordantes. Passemos pois, a tratar de ditos corantes, na ordem com que se apresentam na lei paulista, até o presente momento em vigor:

- a) Corantes róseos:
 - 1) Eritrosina;
 - 2) Róseo bengala;
- b) Corantes vermelhos:
 - 3) Bordeaux S;
 - 4) Ponceau 2 R;
 - 5) Nova coccina;
 - 6) Vermelho sólido;
- c) Corante alaranjado:
 - 7) Alaranjado I;
- d) Corantes amarelos:
 - 8) Amarelo naftol S;
 - 9) Auramina O;
- e) Corante verde:
 - 10) Verde ácido J;
- f) Corante azul:
 - 11) Azul patente;
- g) Corante violeta:
 - 12) Violeta ácido 6 B.

Dentre êsses corantes, cumpre-nos de antemão acrescentar, estarem alguns dêles em estudos detalhados afim de serem possivelmente eliminados ou substituídos por outros de mais segurança e inocuidade. Dêsses corantes em observação destacaremos por enquanto o Ponceau RR — o Vermelho sólido — a Auramina O — e o Violeta ácido 6 B. Sôbre os resultados dessas observações, diremos alguma coisa em tempo oportuno.

Passemos, portanto, ao estudo da série de corantes tolerados pelo Regulamento Sanitário sôbre gêneros alimentícios em vigor no Estado de São Paulo, na ordem acima apresentada.

a) *Corantes Róseos:*

1) ERITROSINA

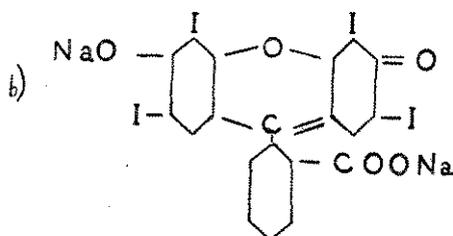
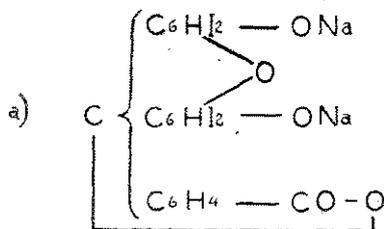
Denominação principal: Eritrosina.

Composição química: Tetraiodo fluoresceína sodada.

Tipo de corante: Xantênico-Phtaleína — não sulfonado.

Fórmulas: Empírica — $C_{20}H_6O_5I_4Na_2$.

Estruturais:



Peso molecular: 879,770.

Histórico: Descoberto por E. Nolting em 1875. Kussmaul em 1896, iodando fluoresceína, (condensação de produtos do anidrido ftálico e resorcinol), também obteve dito corante.

Características: Pó vermelho tijolo, facilmente solúvel em água, dando soluções vermelho cereja, com leve fluorescência amarela pardacenta; facilmente solúvel no álcool com fluorescência amarelo esverdeada; quase insolúvel no éter e no benzol; aquecido em lâmina de platina produz desprendimento de iodo, facilmente reconhecível pelos vapores violáceos então emitidos. Em seguida a esse aquecimento carboniza-se deixando um resíduo branco fusível. Suas soluções sulfúricas são de coloração amarelo carregado e uma vez diluídas precipitam quantitativamente, dando um precipitado de cor vermelha alaranjada, solúvel no éter. Suas soluções sulfúricas, quanto aquecidas, ficam pardo-avermelhadas intenso, produzindo

desprendimento de iodo. As soluções tratadas pelos álcalis não se modificam, mas tratadas pelo alumínio a frio, precipitam quantitativamente, dando precipitado vermelho brilhante; aquecendo-se e filtrando-se essa solução o precipitado será de cor escarlata e o filtrado de cor amarela. As soluções deste corante quando tratadas pelo amoníaco e pó de zinco facilmente se reduzem dando filtrado de cor rósea pálido, com forte fluorescência verde. As bordas do papel de filtração se colorem em amarelo. Quando tratados por ácido acético e pó de zinco, reduzem-se com dificuldade; o filtrado é amarelado com fluorescência verde amarelada. Tratadas pelo cloro estanhoso clorídrico a quente reduzem-se facilmente passando para a coloração amarela. Tingem a lã em solução fracamente ácida com tonalidade vermelho escarlata.

Erythrosin B (C)
 Erythrosin B, 3B, T. B., ALP, extra (A) (M)
 Pyrosin B (MO)
 Erythrosin B extra rein (M)
 Iodeosin B
 Erythrosin bluish D, J, extra, J. N. V., W extra, A, B extra
 pura (BDC), (LBH), (DuP) (SCI), (A), (C), (WSS)
 Erythrosin extra bläulich
 Iodiosina
 Eosina bl.
 Rose B a l'eau
 Eosina bluish (DH) (CJ), (B) (MO), (MLB).
 Róseo J B
 Primerose soluble (DH)
 Eosina bleuâtre
 Methyl erythrina
 Dianthine B
 Mandarinine ao alcool
 Eosin J (B)
 Methyleosine
 Erythrin
 Primerose ao alcool
 Rose extra 2 B ao alcool
 Eosina ao alcool
 Iodeosina B
 Pyrosina (Mo)

Sinonímia

Índices de pureza:

Substânc. volateis (a 135°C)	no máximo	12,0%
Substânc. insol. nágua	no máximo	0,2%

Extrato etéreo	no máximo	0,1%
Cloretos + sulfatos (de Na)	no máximo	2,0%
Carbonato de Na	no máximo	0,5%
Iodeto de Na	no máximo	0,4%
Óxidos	no máximo	1,0%

E' permitida mudança de compostos orgânicos do Iodo em corante puro livre de água de cristalização de 56,8 a 58,5%.

Corante puro (determinado gravimêtricamente), no mínimo 85,0%.

2) RÓSEO BENGALA

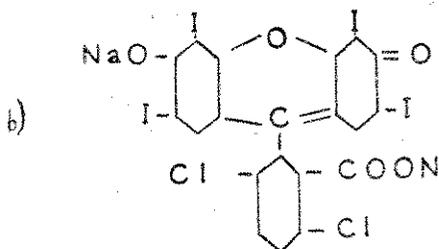
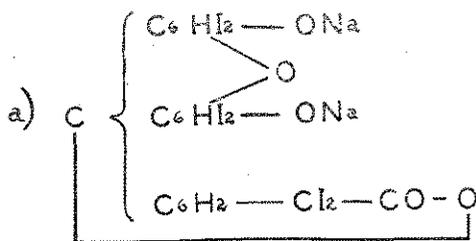
Denominação principal: Rose bengala.

Composição química: Tetraiodo di cloro fluoresceína sodada.

Tipo de corante: Xantênico — Phtaleína não sulfonada.

Fórmulas: Empírica — $C_{20}H_4Cl_2I_4O_5Na_2$.

Estruturais:



Peso molecular: 948,668.

Histórico: Descoberto e preparado por E. Noëlting em 1875, conjugando iodo com dicloro fluoresceína.

Características: Pó vermelho, facilmente solúvel em água com coloração vermelho carmesin, sem fluorescência; facilmente solúvel no álcool com coloração vermelha carmesin com fluorescência parda esverdeada: Insolúvel no éter e muito pouco solúvel no benzol. Suas soluções aquosas tratadas pelos ácidos sulfúrico e clorídrico diluídos, precipitam dando precipitado côr vermelha tijolo, solúvel no éter, com solução carmesin. O ácido sulfúrico concentrado produz nas suas soluções a mudança de côr para o amarelo. Aquecendo-se essas soluções sulfúricas haverá desprendimento de vapores violáceos de Iodo. Os álcalis não modificam suas soluções. Tingem a lã com tonalidade vermelho carmesin, pouco estável.

Sinonímia

Rose Bengale B (S), (StD), (C), (A), (tM) (DH) (R)
 Rose Bengale N (C), (CJ), (MLy)
 Rose Bengale AT (LBH), (L), (B)
 Rose Bengale G (B), (LBH), (DH), (M), (L)
 Rose Bengale NT (AT) (NTO)
 Rose Bengale (DH), (tM), (MLy)
 Bengal rose, (DH)
 Bengal rose B (CJ)

Índices de pureza:

Substânc. volat. a 135°C.	no máximo	5,0%
Substânc. insol. nágua (sol. alcalina) ...	no máximo	1,0%
Extrato etéreo de sol. alcalina	no máximo	0,5%
Cloreto de Na	no máximo	3,0%
Óxidos	no máximo	1,0%
Outros halogêneos	no máximo	0,2%

E' permitido a mudança combinada orgânica de iodo em côr pura de 54,0 a 58,0%.

Permitida a mudança combinada orgânica de cloro em corante puro de 7,0 a 8,5%.

b) *Corantes vermelhos:*

3) BORDEAUX S

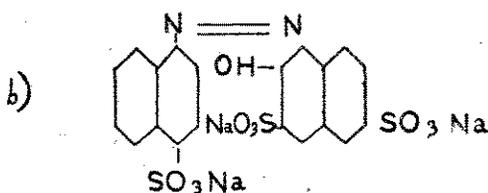
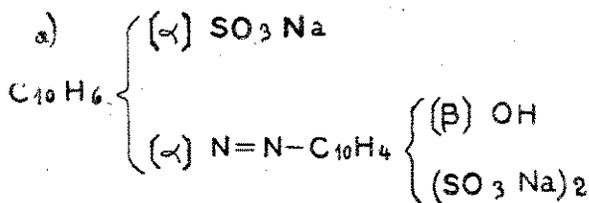
Denominação principal: Bordeaux S.

Composição química: a naftaleno — 4 — sulfonato de sódio — azo — B — Naftol 3.6 — dissulfonato de sódio. Sal R.

Tipo de corante: (monazo) oxiazóico sulfonado.

Formulas: Empírica — $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$.

Estruturais:



Pêso molecular: 604,287.

Histórico: Fabricado pela primeira vez por Baun em 1878 e obtido do ácido naftiônico e do ácido B naftol dissulfônico R.

Características: Pó vermelho pardo, facilmente solúvel em água com coloração vermelho vinho. Moderadamente solúvel no álcool com coloração vermelho fucsina; insolúvel no éter e no ben-zol. Quando aquecido sobre uma lâmina de platina, cessa muito rapidamente de queimar e funde dando massa brilhante vermelho amarelada que, após a combustão, deixa finalmente uma cinza branca, facilmente fusível; com ácido sulfúrico concentrado, se dissolve dando soluções violeta azuladas. Por dissolução com água mudam a coloração para vermelho azulada. Aquecendo-se as suas soluções sulfúricas concentradas, a coloração vira para o pardo violáceo. Com soluções alcalinas (soda ou amoníaco) a coloração vermelha de suas soluções é carregada. O ácido clorídrico mesmo concentrado não tem ação sobre as soluções de dito corante. Com o tani-no, alumínio ou bicromato de potássio não são apresentadas reações típicas. Quando tratado com cloreto estanhoso ou pó de zinco e amoníaco, reduz rapidamente — o filtrado é amarelo esverdeado claro. Quando tratado com pó de zinco e ácido acético a redução é muito mais difícil, sendo o filtrado de coloração róseo pálido. Tingê a lã e a seda em banho Maria, com moderada solidez e igualdade.

Muito solúvel em água, mas é imediatamente precipitado, juntan-
do-se à solução, cloreto de sódio em excesso ou cloreto de bário.

Sinonímia

Amarant (C) (BK) (M) (F) (P) (MYy) (RD) (J) (DH)
(Lev.) (tM) (MLB) (StD)
Naphtol rot O (M)
Naphtol rot S (B) (BK)
Naphtol rot C (C)
Naphtol rot E B (C)
Naphtylamin rot G (By)
Naphtylamine red S, 3 BM (By) (B)
Echtrot (CJ)
Echtrot D (D) (GrE)
Echtrot NS (By)
Bordeaux (FA)
Bordeaux S (A) (RF) (Lev)
Bordeaux S F (A)
Bordeaux DH (DH)
Victoria Rubin O (M) (BK) (Bm)
Azorubin S (S)
Azorubin 2 B (BK)
Azo säurerubin 2 B (BK) (WDC) (CJ) (D)
Tachrot (tM)
Acid Crimson (H)
Wollrot extra (K)
Wool red (Sch)
Rouge Azo R (V st)
Oenanthinine (DH)
Pourpre (LP)
Rouge solide D
Echtrot EB (B)
Roseo per lana extra
Brilliant Bordeaux (LBH)

Índices de pureza:

Substâncias volateis (a 135°C)	no máximo	10,0%
Substâncias insolúveis nágua	no máximo	0,5%
Extrato etéreo	no máximo	0,2%
Cloretos e sulfatos de Na	no máximo	5,0%
Óxidos (mistura)	no máximo	1,0%
Côres estranhas (subsidiárias)	no máximo	4,0%
Côr pura, titulada com tricloreto de ti- tânio	no mínimo	85,0%

4) PONCEAU 2 R

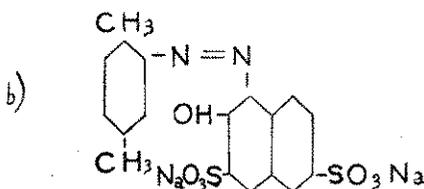
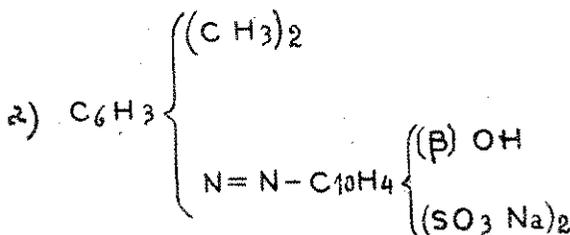
Denominação principal: Ponceau 2 R.

Composição química: Para xileno azo naftol 3-6 di sulfonato de sódio. Sal R.

Tipo de corante: oxyazoico sulfonado.

Fórmulas: Empírica — $C_{18}H_{14}N_2O_7S_2Na_2$.

Estruturais:



Pêso molecular: 480,250.

Histórico: Descoberto por Baum em 1878 e introduzido no comércio por Meister, Lucius & Brüning. Foi preparado partindo-se do m-xilidina bruta e do ácido B naftol dissulfônico R bruto, que também contém B naftol mono sulfônico S.

Características: Pó vermelho pardo solúvel em água dando soluções vermelhas amareladas. Muito pouco solúvel no álcool dando soluções róseas. Os álcalis produzem ligeiro precipitado amarelo acastanhado. O ácido sulfúrico concentrado dá soluções vermelhas cereja, que não se modificam pela junção de água. Pouco solúvel no éter; com ácido clorídrico dá soluções vermelhas violáceas. Com cloreto estanhoso clorídrico a quente, reduz facilmente. Com HNO_3 dá soluções vermelho bordeaux.

Sinonímia

Ponceau R
 Ponceau 2 R, 2 RE (A) (B) (M)
 Ponceau RR (A), (B), (M), (BK) (Bm) (CJ) (CrE)
 (Lev) (P) (RF) (L) (S) (AW) (t.M) (BDC)
 Ponceau B (M) (A) (B) (G) (BK) (Lev) (Bm) (t.M) (Gy)
 Ponceau Fr, FRR (C)
 Brillant ponceau R RR (t.M)
 Brillant ponceau G (C)
 Scarlet 2 R (H) (BDC)
 Scarlet R (BDC)
 Ponceau (J) (MLy)
 Ponceau G R (M)
 Scarlet G
 Ponceau de Hoechst
 Xylidin roth
 Xylidin ponceau
 Rouge de cumidine
 Cumidine Scharlach

Características de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C	no máximo	12,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	1,0%
Extrato etéreo	no máximo	0,5%
Xilidina	no máximo	0,2%
Cloreto e sulfato de Na	no máximo	0,2%
Óxidos	no máximo	1,0%
Côr pura titulada c/tricloreto de titânio .	no mínimo	82,0%

5) NOVA COCCINA

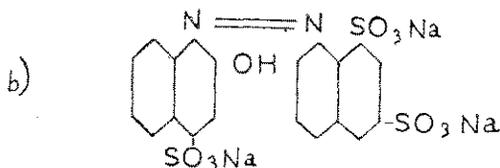
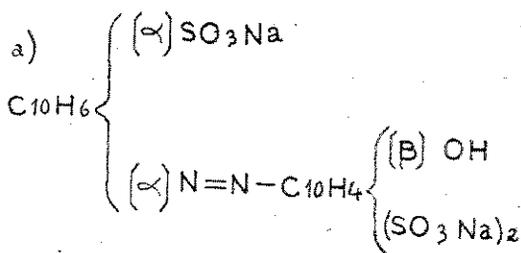
Denominação principal: Nova coccina.

Composição química: a cumeno azo B naftol 6-8 disulfonato de sódio — Sal G.

Tipo de corante: oxyazoico-sulfonado.

Fórmulas: Empírica — $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$.

Estruturais:



Peso molecular: 604, 287.

Histórico: Descoberto por Baum em 1878 conjugando o ácido naftiônico com o ácido B naftol dissulfônico G.

Características: Pó vermelho vivo facilmente solúvel em água e no álcool com soluções vermelho cereja. Com o ácido sulfúrico produz coloração violeta que por diluição passa ao vermelho cereja. Inalterável com o ácido clorídrico. Com álcalis produz soluções pardas. Tratadas pelo cloreto estanhoso clorídrico a quente reduz, ficando incolor. Tinge a lã com tonalidades róseas avermelhadas em banho de KHSO_4 .

Sinonímia

Cumidin ponceau
 Cumidin rot
 Cumidin red
 Ponceau 4 R (BK) (VSt)
 Cocchenillerot A (B)
 Ponceau de cumidine
 Crocein Scharlach 4 BX (K)
 Brillant scarlet (Lev) (C)
 Brillant ponceau 4 R (By) (C) (StD)
 Brillant ponceau 5 R (By) (VDC) (Dahe)
 Brillant scarlet S (Sch)
 Ponceau brillane R (MLy)
 Coccinine G
 Neu coccin (A) (RF)

<i>Sinonímia</i>	{	Neu coccin O (M)
		Scarlet 5 O (N) (BDC)
		Scarlet OOOOO (BDC) (H)
		Scharlach N (FA)
		Victoria Scharlach 4 R extra (tM)
		Ponceau Special (P)
		Rouge cochenille A (Bad)
		Victoria Scharlach
		Scarlat brill. (Lev., Cass.)
Coccina nuova (Bent.)		

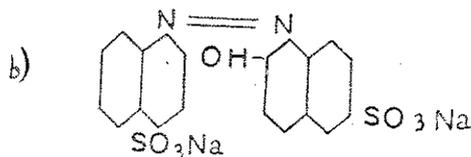
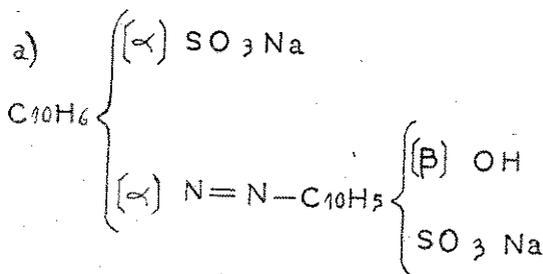
Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	10,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	0,3%
Extrato etéreo	no máximo	0,2%
Pseudo cumidina	no máximo	0,2%
Cloretos e sulfatos de Na	no máximo	6,0%
Óxidos	no máximo	1,0%
Côres inferiores sulfonadas	no máximo	5,0%
Côr pura por titulação com tricloreto de titânio	no mínimo	85,0%

6) VERMELHO SÓLIDO

Denominação principal: Vermelho sólido.*Composição química:* α naftiônico azo B naftol monosulfonato de sódio (Sal S).*Tipo de corante:* Oxyazoico sulfonado.*Fórmulas:* Empírica — $C_{20}H_{12}N_2O_4S_2Na_3$

Estruturais:



Peso molecular: 454.234.

Histórico: Descoberto por Caro em 1877-1878, conjugando o ácido B naftol monosulfonado, Sal S (ácido B naftol B sulfônico — obtido por Shaeffer do B naftol 2-6), com sal naftiônico. Constitue o 1.º corante azóico então obtido e o melhor dos corantes ácidos de dita tonalidade.

Características: Pó vermelho pardo, solúvel em água, dando soluções vermelho fucsina. Pouco solúvel em álcool. Com ácido sulfúrico dá soluções azues violáceas que pela diluição tomarão a coloração vermelha; com ácido clorídrico, não apresenta modificação. Com os álcalis dá soluções pardas. Não é fixado pela lã em presença de KHSO_4 , não sendo reduzido quando aquecido pelo cloreto estanhoso clorídrico. Tinge a lã e a seda com igualdade, sendo medianamente sólido à luz e à lavagem.

Sinonímia

Rouge Vrai
 Echtrot (Lev)
 Echtrot E (B) (By) (BK) (FA) (tM) (WDC) (K) (GrE)
 Echtrot S (M) (DH)
 Naphtol ro G R (B)
 Säure carmoisin B (BKO)
 Naphtol rot G R (B)
 Rouge solide (P)
 Echtrot extra (A)
 Rouge veritable
 Naphtol rot E B (C)
 Echtrot extra E

Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	5,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	0,5%
Extrato etéreo (éter isoprop.)	no máximo	0,5%
Tobias ácido	no máximo	0,2%
Beta Naftol	no máximo	0,2%
Cloretos e sulfatos de Na	no máximo	5,0%
Óxidos	no máximo	1,0%
Côr pura (determinada por titulação com triclureto de titânio	no mínimo	90,0%

c) *Corante Alaranjado*

7) ALARANJADO I

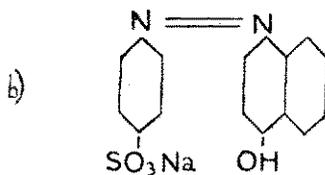
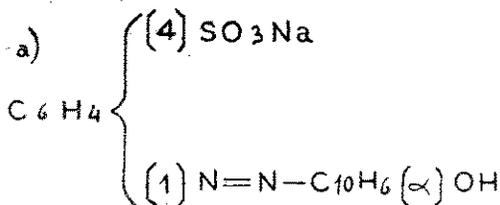
Denominado principal: Alaranjado I.

Composição química: α naphtol azo benzeno 4 sulfonato de sódio.

Tipo de corante: monazo.

Fórmulas: Empírica — $C_{16}H_{11}N_2O_4SNa$

Estruturais:



Peso molecular: 350,165.

Histórico: Descoberto por Griess em 1876 e depois estudado por Roussin e O. N. Witt e Liebermann. Obtido conjugando-se o diazótico do ácido sulfanílico com B naftol.

Características: Pó pardo avermelhado solúvel água, dando soluções alaranjadas, virando facilmente para a coloração avermelhada, com leve alcalinidade. Solúvel no álcool com soluções alaranjadas. Suas soluções sulfúricas concentradas são violetas, por diluição viram ao pardo alaranjado. Aquecidas com HCl precipitam em pardo. As soluções alcalinas são tipicamente de coloração vermelha ponceau, devido à grande sensibilidade deste corante para com os álcalis. Com HNO_3 fica vermelho. Dito corante tingem em banho ácido com nuances alaranjadas, não só a lã como a seda.

<i>Sinonímia</i>	Orange 1, Poirier
	Orange n.º 1 R extra (DH) (K)
	Orange 3 (B)
	B Naphtol orange (BK)
	Tropaeolin OOO n.º 1, G (S)
	Orange R extra (Mo)
	Orange de naphtol n.º 1
	Orange B (L)
	Orange 1 (PH) (tM) (RD) (K) (RF) (W) (Sch)
	Tropaeolin G (S)
Naphtol orange (A)	

Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	10,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	0,3%
Extrato etéreo	no máximo	0,2%
Naftol alfa	no máximo	0,1%
NaCl e Na ₂ SO ₄	no máximo	4,0%
Óxidos (mist.)	no máximo	5,0%
Alaranjado II (tóxico)	no máximo	5,0%
Corante puro, (tit. com cloreto de titânio)	no mínimo	85,0%

d) *Corantes Amarelos*

8) AMARELO NAFTOL S

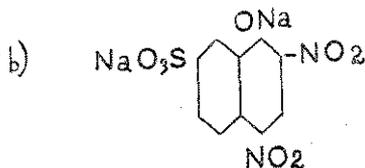
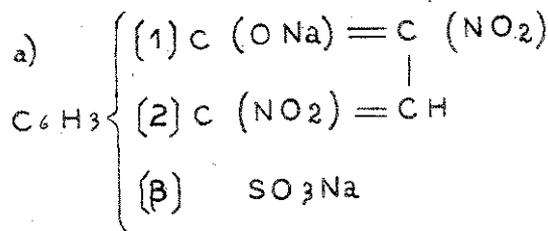
Denominação principal: Amarelo Naftol S.

Composição química: 2-4 dinitro naftol 7-monossulfonato de sódio.

Tipo de corante: Nitro fenol sulfonado.

Fórmulas: Empírica — C₁₀H₄N₂O₈SNa₂.

Estruturais:



Pêso molecular: 358,106.

Histórico: Foi obtido pela primeira vez por H. Caro, em 1879, pela ação do ácido nítrico sobre o alfa naftol trissulfonado, constituindo portanto, um derivado sulfônico do amarelo de Martius. O corante se mostra no comércio sob a forma de sal sodado. O sal de potássio do mesmo corante é muito dificilmente solúvel. Constitue ainda hoje um dos nitro corantes mais importantes. É derivado sulfonado em 7 do amarelo de Martius.

Características: Pó amarelo brilhante, facilmente solúvel n'água, dando soluções de côr amarelo vivo. Pouco solúvel no álcool, insolúvel no éter e no benzol. Aquecido sôbre lâmina de platina queima deflagrando, deixando um residuo de carbonato de sódio. Dissolve-se no ácido sulfúrico concentrado, dando solução amarelo esverdeada clara, modificando para o amarelo pardo pela diluição. Aquecendo-se a solução sulfúrica a coloração passará a pardo oliva. Tratado pelo ácido sulfúrico a 10% ficará amarelo pálido. A solução aquosa tratada com a potassa cáustica a 50% dá um precipitado amarelo floconoso. Não é reduzido pelo cloreto estanhoso, sendo, no entretanto, pelo pó de zinco e amoníaco. No filtrado dêsse tratamento a côr amarela reaparece. Tratado pelo ácido acético e pó de zinco é difficilmente reduzido. O filtrado e o papel de filtro dessa operação, pelo contacto com o ar se reoxidam e se colorem em vermelho alaranjado. Ao ser vaporizado dito corante não se sublima. Suas soluções aquosas descoram com a junção do ácido clorídrico sem formação de precipitado, retornando ao amarelo com a neutralização com os álcalis. Se as soluções aquosas de dito corante, ao serem tratadas com ácido clorídrico, em vez de descorarem, precipitarem sob a forma leitosa, pode-se concluir pela presença de amarelo de Martius, corante de natureza muito tóxica. Outra prova recomendada por Loemis para êste reconhecimento consiste no seguinte: da solução aquosa, ligeiramente acidulada com ácido clorídrico, se extrai com igual volume de éter; separa-se a camada etérea que se lava duas vêzes com 5 cm³ de água. A camada etérea é então agitada com igual volume de amoníaco bem diluido (50%) deixando-se em repouso. Se a camada aquosa não for corada, não haverá presença de amarelo de Martius; se porém, a dita camada for amarela, haverá presença do amarelo de Martius no corante examinado. As nuances de dito corante são muito resistentes à luz e à lavagem, tingindo muito bem o algodão, a lã e a seda, constituindo o mais sólido de todos os corantes nitrados.

Sinonímia.

Naphtol Yellow Fy A S (Lev)
 Naphtol gelb S, extra Konz (B) (tM)
 Naphtol Yellow S, HS, OS (H) (DM) (S) (SCI) (B) (By)
 (BF) (AAC) (M) (C) (GrE) (MIB) (A) (BK) (CR)
 (J) (L) (S)
 Citronin A (L)
 Schwefelgelb S (K) (AW)
 Jaune acide C (MLy)

<i>Sinonímia</i>	Jaune acide (DH) (LP)
	Jaune OS (P)
	Jaune Naphtol S (B)
	Jaune de Naphtol S (RF)
	Jaune N S
	Säure gelb S
	Acide Yellow (DM) (SCI)
	Naphtol gelb (WDC)

Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	10,0 %
Substâncias insolúveis n'água	no máximo	10,0 %
Extrato etéreo	no máximo	0,1 %
Cloretos + Sulfatos	no máximo	5,0 %
Óxidos	no máximo	1,0 %
Amarelo de Martius	no máximo	0,03%
Corante puro determinado por titulação		
c/ tricloreto de titânio	no mínimo	85,0 %

9) AURAMINA O

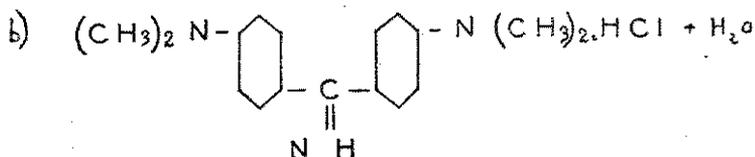
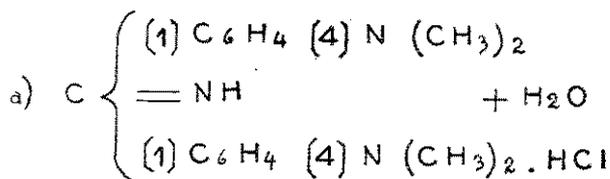
Denominação principal: Auramina O.

Composição química: Cloridrato de amido tetra metil para di amido di fenil metana.

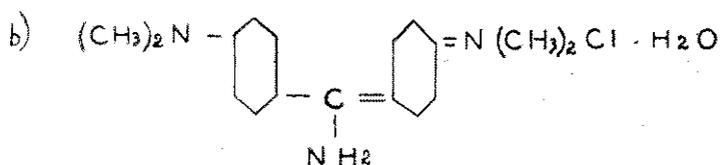
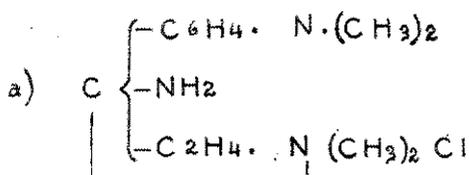
Tipo de corante: amido diphenyl methana (básico).

Fórmulas: Empírica — $C_{17}H_{24}N_3ClO$.

Estruturais:



Por muito tempo, no entretanto, a auramina foi representada pelas fórmulas determinadas por Stock e que eram as seguintes:



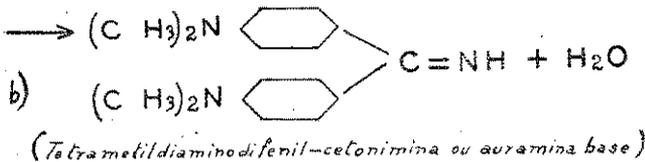
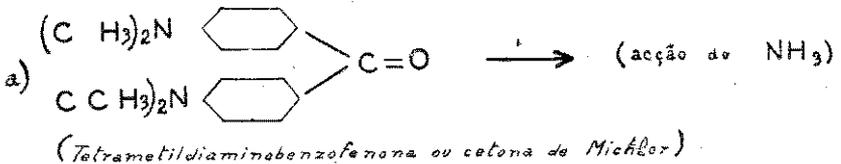
Recentemente, Jemper (Ann. Chem., 381, 234) confirmou, após profundo reconhecimento, a fórmula indicada por Graebe.

Pêso molecular: 321.673.

Histórico: A auramina O foi descoberta em 1883 por Caro e Kern ao fazerem a fusão a 150,160° de tetrametil diamino fenil metana com cloreto de amônio, enxofre e cloreto de sódio em corrente amoníacal. A Auramina é um corante básico, sendo vendido comercialmente como Sal clorídrico. Não possui muita solidez, sendo facilmente decomposto pela água fervente.

Características: A Auramina O é constituída por um pó cristalino de cor amarelo enxofre, dificilmente solúvel na água fria. Solúvel na água quente ou acidulada, decompondo-se com a fervura. Solúvel no álcool dando soluções amarelas. Insolúvel no éter e no benzol. Aquecida sobre uma lâmina de platina torna-se de coloração vermelho alaranjada, despreendendo vapores amarelos e quando queimada carboniza-se sem deixar resíduo. É solúvel no ácido sulfúrico concentrado com despreendimento de HCl, ficando depois suas soluções descoradas. Por diluição voltam à coloração amarela; aquecendo-se uma solução sulfúrica essa se colore em pardo amarelado. Com a junção de H₂SO₄ diluído não há modificação a frio; por ebulição o líquido descora; as soluções alcalinas de Auramina O produzem um precipitado branco característico de auramina base e solúvel no éter, tornando-se a cor amarela com a junção de ácido acético. Quando tratada com solução de tanino precipita quase completamente em amarelo, tornando-se parda e resinosa pela ebulição. Com junção de ácido clorídrico em dito corante obser-

va-se a intensificação de sua tonalidade, descorando após ebulição. Com o bicromato de potássio opera-se a mesma reação observada com o tanino — precipita quantitativamente em amarelo, tornando-se resinosa por ebulição. Com a ação do amoníaco e pó de zinco o filtrado é incolor, não se regenerando a côr. Com o repouso o precipitado e o papel de filtro usado, ficarão amarelos e a solução aquosa aquecida se decompõe. Com o zinco em pó e amoníaco e acidulado com ácido acético, dá uma coloração típica azul vivo. A auramina G que é a Cloridrina de amido di metil para diamido orto dicresil metana, dá com o pó de zinco e amoníaco uma coloração violeta típica nas mesmas condições descritas para a Auramina O. Esta é a única reação divergente entre estes dois tipos de Auraminas. A auramina G produz soluções amarelas mais esverdeadas que a Auramina O. A auramina O tingem em amarelo vivo de regular solidez a seda e a lã em banho neutro e o algodão mordentado, com tanino. Em medicina a Auramina O foi empregada como anti supurante na oftalmologia e na cirurgia, com a denominação de "Pioktaninum aureum" da casa Merck. A Auramina é facilmente hidrolisada por ebulição; aquecida acima de 70° se decompõe, voltando a formar-se o tetra metil di amino benzo fenona e amoníaco.



Sinonímia

Auramine O, O conc, OO extra conc., NO, 2, OE, (DuP) (Gy)
(SCI)
Auramine I (B) (J) (G) (M) (S) (By) (tM) (A) (L) (H)
(SCI) (StD) (C)
Pyoktaninum aureum (E. Merck)
Auramine II, III (Gy) (SCI)
Jaune saricine
Canary Yellow (GrE)

Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	10,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	1,0%
Extrato etéreo	no máximo	0,5%
Clortos e sulfatos	no máximo	8,0%
Óxidos totais	no máximo	1,0%
Côr pura titulada c/ tricloreto de titânio	no mínimo	82,0%

e) *Corante Verde*

10) VERDE ÁCIDO J

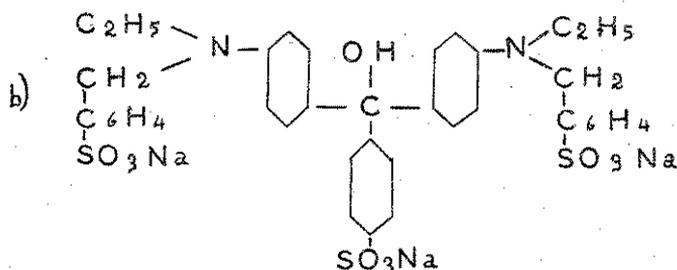
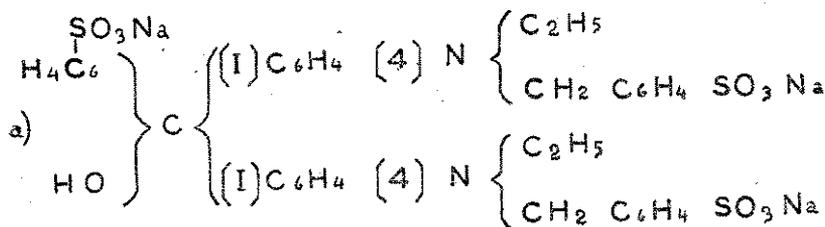
Denominação principal: Verde ácido J ou verde brilhante S F amarelado.

Composição química: Dietil di benzil di paramino tri-fenil carbinol trissulfonato de sódio.

Tipo de corante: Trifenil metana.

Fórmulas: Empírica — $C_{37}H_{35}N_2O_{10}S_3Na_3$.

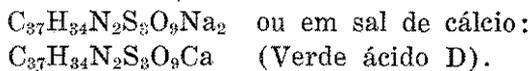
Estruturais:



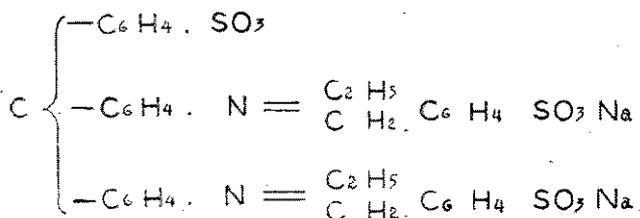
Pêso molecular: 832,479.

Histórico: Dito corante foi descoberto por Köhler em 1879, pela condensação do benzaldeído com etilbenzilamina e sulfonação.

do dietilbenzildiamido trifenil metana, com formação do ácido trissulfônico; pela oxidação desse último ácido foi obtido o ácido dietil benzil diamido trifenil carbinólico e a consequente transformação deste ácido em sal sódico:



A sua constituição corresponde à formação como base carbinólica.



Características: Pó verde escuro com reflexos avermelhados, facilmente solúvel n'água e pouco solúvel no álcool, dando soluções verdes. E' insolúvel no éter e no benzol. Quando aquecido em lâmina de platina queima, deixando como resíduo uma cinza branca fusível. Tratado com ácido sulfúrico concentrado dissolve-se, dando soluções alaranjadas escuras que, por diluição tomam primitivamente a coloração verde oliva e depois verde típico. Aquecendo-se a solução sulfúrica concentrada, a mesma tomará a coloração pardo oliva. Com ácido sulfúrico diluído a 10% as soluções não se modificam; com o repouso, porém, a coloração diminui de intensidade. Suas soluções quando tratadas por soda ou amoníaco, descoram completamente e com o aquecimento precipitam em violáceo. Com pó de zinco e amoníaco, dito corante reduz-se com grande facilidade, o filtrado desse tratamento é incolor; já com a adição de ácido acético é difficilmente redutível e o filtrado se apresenta com coloração verde pálido. Dita matéria corante tingem a lã e a seda em banho ácido, dando nuances verdes menos azues que seu homólogo Verde luz S F azulado. E' um dos corantes mais sulfonados dos derivados da trifenil metana. Com ácido pícrico não precipita (distinção entre as côres verdes básicas) com o BaCl₂ precipita sob a forma de sulfato de bário.

Sinonímia

Verde luz S F amarelado
 Verde sulfo J extra (P)
 Licht grün S. F, gelblinch, S. (B)
 Lichtgrün 2 G extra Konz
 2 G N extra, konz, (tM)
 Vert acide SOF
 Säure grün D konz, (M)
 Säure grün G (K)
 Säure grün (By) (C)
 Säure grün extra konz 5 G H (C)
 Verte acide liquide
 Verte sulfo J extra (P)
 Vert sulfo
 Säure grün F extra, G B extra, 2 G extra (By)
 Säure-grün extra W (DG)
 Säure grün O gelblich, G, extra (J)
 Fast Acid Green N (CCC)
 Säure grün G, 2 G, 3 G, 4 G (tM)
 Säure grün OOO (L)
 Säure grün O G (GrE)
 Säure grün G W (WDC)
 Vert acide J
 Vert acide J J extra conc. (MLy)
 Vert lumière S F jaunâtre
 Vert lumière S
 Verde brilhante S F amarelado

Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	10,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	0,5%
Extrato eteréo	no máximo	0,4%
Cloretos e sulfatos	no máximo	6,0%
Óxidos	no máximo	1,0%
Côres subsidiárias ao corante	no máximo	5,0%
Corante puro determinado por titulação		
c/ tricloreto de titânio	no mínimo	82,0%

f) Corante Azul:

11) AZUL PATENTE

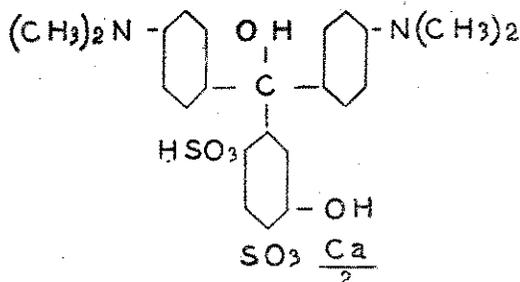
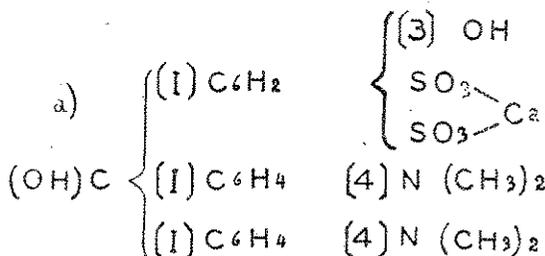
Denominação principal: Azul patente.

Composição química: Tetra metil di paramido meta oxi trifenil carbinol di sulfonato de cálcio.

Tipo de corante: Trifenilmetana (Der. resanilina).

Fórmulas: Empírica — $C_{23}H_{24}N_2O_8S_2Ca$.

Estruturais:



Pêso molecular: 560,406.

Histórico: Foi descoberto por Hermann e estudado posteriormente por Meister, Lucius e Brüning. Foi obtido partindo do aldeído benzóico meta nitrado condensado com duas moléculas de dimetil anilina. O corante industrialmente se apresenta sob a fórmula de sal de cálcio sulfonado.

Características: E' um pó azul esverdeado, muito solúvel em água e em álcool, tingindo a lã e a seda com tonalidades azues muito puras. Suas soluções aquosas cristalizam-se facilmente ao serem evaporadas dando extrato azul esverdeado com reflexo carmim típico. Suas soluções sulfúricas são amarelas. Aquecido com cloreto estanhoso clorídrico, reduz-se facilmente em amarelo; é solúvel em álcool a 95%.

Sinonímia { Bleu carmin Surfin
Bleu patente
Patentblau superfein, extra, B N (M)

Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	10,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	1,0%
Extrato etéreo	no máximo	0,5%
m/Nitro benzaldeído	no máximo	0,2%

o verde, azul e finalmente violeta. Suas soluções tratadas com ácido clorídrico, ficam azul esverdeadas e depois amarelo pardas. Com soda a frio, suas soluções não apresentam modificação. A quente, porém, descoram completamente, ficando a solução incolor.

<i>Sinonímia</i>	{	Acid violet 6 B N, 6 B N O (H) (SCI) (B) (K)
		Violeta acide 6 B (B)
		Saure Violett 6 B (A) (By)
		Violeta ácido 6 B V (SCI)

Índices de pureza:

Substâncias voláteis a 135°C.	no máximo	8,0%
Substâncias insolúveis em água	no máximo	1,0%
Extrato etéreo	no máximo	0,5%
Dimetilaniolina	no máximo	0,2%
Cloretos e sulfatos	no máximo	9,0%
Óxidos	no máximo	1,0%
Corante puro (titulado c/ tricloreto de titânio)	no mínimo	80,0%

Ao finalizar êsse trabalho, devemos frisar que a nossa finalidade principal ao compô-lo foi procurar esclarecer tão confuso e complicado assunto, facilitando de certo modo aos que tenham necessidade de lançar mão dessa matéria prima em produtos alimentícios e ao mesmo tempo, concorrendo para dar alguns detalhes de caráter analítico qualitativo aos que, incumbidos de zelar pela Saúde Pública, sejam obrigados a proceder à caracterização e devida seleção desses 12 corantes artificiais tolerados em alimentos. Pensamos, com os detalhes apresentados, concorrer para um melhor esclarecimento de tão vasto e delicado assunto.

FIRMAS FABRICANTES DE CORANTES CITADAS

- (A) — Aktien — Gesellschaft für Anilin Fabrikation, Berlin.
 (AAC) — The Albany Aniline Coors Works — Albany, New Jersey.
 (AW) — A. Wiescher & Co., Sucrs. — Haren — Bélgica.
 (B) — Badische Aniline & Soda Fabrik — Ludwigshafen am Rhein.
 (BACo.) — The British Alizarine Company, Limited, Silvertown Victoria Docks — London.
 (BDC) — British Dyestuff Corporation, Huddersfield — England.
 (BF) — Bulls Ferry Chemical Company — Shady Side-New J.

- (BE) — C. von Bauer — Elberfeld.
- (BK) — Leipziger Anilin fabrik Beyer & Kegel (Lindman — Leipzig)
- (Bm) — Gebr. Broemme — St. Petersburg.
- (By) — Fanbenfabriken vorms. Friedr. Bayer & Co. (Levenkusen) Elberfeld.
- (C) — Leopold Casella & Co. — Frankfurt o/M. — Germany.
- (ClCo) — The Clayton Aniline Company — Manchester.
- (CJ) — Carl Jäger G. m. b. H. Anilin — Fanben fabrik — Düsseldorf — Derendorf — Germany.
- (CR) — Clauss & Rée — Aniline colors manufacturers, Clayton Manchester.
- (CV) — Colne Vale Chemical Co., Milnsbridge bei Huddersfield.
- (Cz) — John Cashelz, Bruère & Co., Belbenf bei Rouem.
- (Daw) — John Dawson & Co., Limited, in Kirkheaton Colors Works — Huddersfield.
- (DH) — Farbwerke, vormalis L. Durand, Huguenin & Co., Bale.
- (Du Pont) — Dyestuff Manufacturer Wilmington, Delaware, U. S. A.
- (EH) — E. de Haen List vor Hannover.
- (FA) — Farbwerke Ammersfoort — Ammersfoort — Holland.
- (FTM) — Fabrique de Produits Chimiques de Thann et de Mulhouse (Mulhousen) Alsace — France.
- (G) — Anilinfarben — und Extract Fabriken vormalis Joh. Rud. Geigy — Basel.
- (Ge) — A George — Campdeoville.
- (Gr) — Robert Grässer — Chemical Works bei Ruabon (North Wales).
- (Gr-E) — Chemische Fabrik Grieshein — Electron Frankfurt.
- (H) — Read Holliday — Which was amalgamated with the British Dyestuff Corporation and which has started a new busines in Huddersfield.
- (HM) — Heller and Merz — N. J. U. S. A.
- (J. or Ciba) — Gesellschaft fur chemische Industrie, Bale.
- (K) — Kalle & Co., Aktiengesellschaft, Biebrich a Rh., Germany.
- (Ki) — Kinzlberger & Co., Pragne, C. S. R.
- (L) — Farbwerk Mühlheim vorm. A. Leonhardt & Co., Frankfurt.
- (LD) — Lepetit Dollfuss & Gansser — Italie.
- (Lev) — Levinstein Limited Blackley Manchester.
- (LM) — Leeds Manufacturing Company (Brooklyn).
- (Lo) — Charles Lowe & Co., — Manchester.
- (LP) — Lucien Picard & Co., St. Fons (Rhône).
- (M) — Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning — Höchst a. Main.
- (MLy) — Manufacture Lyonnaise de Matières Colorantes Société Anonyme — Lyon.
- (Mo) — Société Chimique des Usines du Rhône — Lyon.
- (Mo) — Gulliard, P. Monnet und Cartiers — Lyon.
- (N) — Compagnie Nationale des matières Colorantes — Has Several Works and was intimately connected with the Germany Dyestuff Vorks.
- (NF) — Niederländische Kleurstoffen Fabrick Nardeen, Holland.
- (P. ou Pont St. D) — Société Anonyme des matières colorantes et produits chimiques de St. Denis (Sena) Paris.

- (RD) — Roberts, Dale & Co., (Manchester).
- (RF) — J. Ruch & Fils, Pantin (Sena).
- (RWCo) — R. Wedekind & Co., Verdingen on the Rhine.
- (S) — Chemische Fabrik vorm. Sandoz & Co., Bale (Suissa).
- (Sch) — The Schöllkopf aniline & Chemical Co., Bufalo, U. S. A.
- (t.M) — Chemische Fabriker vorm. Heyden — ter-Meer — Germany.
- (VSt) — Victor Steiner (Vernon).
- (W) — Williams Brothers & Co., Hounslow Middlesex.
- (WDC) — Wülfing, Dahl & Co. A. — G. Barmen, Germany.

		Acido sulfúrico				
		concentrado 66° B	juntando água	HCl concentrado	NaOH a 10%	HNO ₃ concentrado
ERITROSINA	Corante in natureza	amarelo; a quente desprendimento de iodo	precipitado vermelho tijolo	amarelo precipitando vermelho-pardo líquido amarelo	não se modifica	amarelo
	Corante fixado em lâ	vermelho alaranjado depois marrom	alaranjado precipitando vermelho tijolo	alaranjado com linhas amarelas	escurece mais	amarelo
	Corante em solução aquosa	precipitado cor de tijolo — o líquido fica incolor	precipitado vermelho tijolo	precipitado vermelho tijolo — líquido incolor	não se modifica	precipitado vermelho tijolo
RÓSEO BENGALA	Corante in natureza	precipitado amarelo alaranjado; a quente desprende iodo	passa a rósea	precipitado vermelho tijolo	não se modifica	não se modifica
	Corante fixado em lâ	marron avermelhado	descora lentamente	descora a lâ fica levemente rósea	escurece mais	amarelo
	Corante em solução aquosa	descora, a solução fica somente rósea	precipitado cor de tijolo — a solução fica rósea	descora solução levemente rósea e precipitado vermelho pardo	não se modifica	descora a solução fica rósea
BORDEAUX S	Corante in natureza	azul violáceo	vermelho violáceo	intensifica a coloração	não muda	vermelho amarelado
	Corante fixado em lâ	violeta azulada	vermelho cereja — lâ rósea	vermelho castanho escuro	vermelho castanho	vermelho amarelado
	Corante em solução aquosa	violeta azulada	vermelho	vermelho	vermelho carmesim	vermelho amarelado

		Acido sulfúrico				
		concentrado 66° B	juntando água	HCl concentrado	NaOH a 10%	HNO ₃ concentrado
PONCEAU R R	Corante in natura	violeta	róseo	violeta	amarelo castanho	amarelo
	Corante fixado em lâ	azul violáceo	quase não se modifica	vermelho púrpura	marron	amarelo
	Corante em solução aquosa	violeta púrpura	vermelho cereja	vermelho púrpura	marron	amarelo
NOVA - COCCINA	Corante in natura	violeta púrpura	vermelho cereja	vermelho púrpura	castanho sujo	alaranjado
	Corante fixado em lâ	vermelho	róseo	vermelho vinho	alaranjado	amarelo
	Corante em solução aquosa	vermelho	vermelho	vermelho	vermelho	parda amarelada
VERMELHO SÓLIDO	Corante in natura	não se modifica, violeta azulado	não se modifica	não se modifica	vermelho pardo	vermelho amarelado
	Corante fixado em lâ	violeta azulado escuro	vermelho — lâ rósea	vermelho púrpura	marron avermelhado	amarelo com bordas avermelhadas
	Corante em solução aquosa	violeta	não se modifica	não se modifica	marron	não se modifica

		Ácido sulfúrico				
		concentrado 66° B	juntando água	HCl concentrado	NaOH a 10%	NOH ₃ concentrado
ALARANJADO I	Corante in natureza	violáceo aver- melhado	amarelo alaran- jado e precipita- do parcial ver- melho pardo sol. exc.	não se modifica	vermelho pon- ceau	amarelo
	Corante fixado em lâ	violáceo	alaranjado	vermelho violá- ceo	vermelho pon- ceau	amarelo
	Corante em so- lução aquosa	não se modifi- ca	não se modifica	vermelho ala- ranjado — pre- cipitado parcial vermelho pardo	vermelho pon- ceau	amarelo
AMARELO NAFTOL S	Corante in natureza	amarelo sujo	descora	a coloração di- minue de inten- sidade	amarelo	amarelo
	Corante fixado em lâ	marron amare- lado	mais claro	descora	a coloração se intensifica mais	marron amare- lado
	Corante em so- lução aquosa	amarelo claro quase incolor	descora	amarelo claro quase incolor	amarelo acen- tuado	amarelo
AURAMINA O	Corante in natureza	incolor com efervescência despr. HCl	volta a colora- ção amarelada pálida	intensifica a co- loração desco- rando pela ebu- lição	precipitado branco solúvel no eter	amarelo sujo
	Corante fixado em lâ	amarelo azei- tona	fica mais claro	intensifica a co- loração	fica mais claro	castanho claro
	Corante em so- lução aquosa	descora	fica amarela	amarela	descora e pre- cipita em bran- co	amarelo

		Acido sulfúrico				
		concentrado 66° B	juntando água	HCl concentrado	NaOH a 10%	HNO ³ concentrado
VERDE ACIDO	Corante in natureza	precipitado amarelo pardo com efervescên- cia	verde amare- lada	precipitado amarelo pardo. O liquido cla- reia lentamente	descora	amarelo
	Corante fixado em lâ	descora	verde amare- ado	amarelo parda- cento	azul	amarelo
	Corante em so- lução aquosa	amarelo esver- deado	verde amare- lado	passa gradual- mente ao ama- relo pardo	descora lenta- mente	amarelo
AZUL PATENTE	Corante in natureza	verde amare- lado — preci- pita vermelho tijolo	amarelo, ver- de, depois azu- lado	amarelo esver- deado	a frio não se modifica; a quente violeta	amarelo
	Corante fixado em lâ	esverdeado de- pois amarelo escuro	verde esmeral- da	verde; amare- lado vivo de- pois	esverdeado	amarelo diluido fica verde. So- lução azulada
	Corante em so- lução aquosa	verde amare- lado	amarelo esver- deado	passa ao ama- relo	não modifica a frio. Aquecen- do torna-se vio- leta	amarelo
VIOLETA, ACIDO 6 B	Corante in natureza	precipitado amarelo casta- nho	com excesso d'água verde azulado e de- pois violeta	precipita em amarelo alaran- jado	a frio não se modifica; aque- cendo-se desco- ra	amarelo
	Corante fixado em lâ	amarelo	descora a frio, fica amarelo esverdeado	amarelo	descora	verde e depois amarelo
	Corante em so- lução aquosa	verde esmeral- da — com ex- cesso de áci- do, amarela	verde amare- lado	torna-se azul, verde, e depois amarelo	passa ao azul e depois descora lentamente	azul, verde e depois amarelo

BIBLIOGRAFIA

- Les Matères colorantes — CAIN et THORPE — 1922.
Farbstoff — Tabellen — GUSTAV SCHULTZ — 1923.
Tabelariche Ubersicht — G. SCHULTZ und P. JULIUS — 1891.
L'industrie des matières colorantes — JUSTIN DUPONT — 1902.
Chimie organique — CHARLES MOREU — 1919.
Enciclopedia de química industrial — ULLMANN — Tomos III e XIII.
The Chemists — Jean Book — 1937 — F. W. ATACK.
Tratado de Química Orgânica — De PABLO KARRER — 1941 — Barcelona.
Food inspection and Analysis — A. E. LEACH — 1920.
Trattato de Chimica delle Sostanze coloranti — G. PANIZZON — Milano — 1921 (3 vols.).
Office International d'Hygiène Publique, Premier semestre, omo XXIX — n.º 1 — 1937 — Bulletin mensuel Janvier 1937.
Les matières colorantes et la chimie de la teinture (189).
Dizionario de Merceologia e de Chimica applicata — 1925 — V. VILLAVECCHIA.
Las materias colorantes en los Productos Alimenticios — ULAUS HORDH, 1941.
Manual del Chimico Industrial — Gabba Molinari — 5.ª ed. — 1923.
Falsifications et des Fraudes (Anaes) — 1920 — n.º 141.
Atlas Food colors Guide — 1943.
Revista de Sanidad y Assistència Social — Abril, 1942, vol. VII.
Coal-Tar color Regulations (Food and Drug Administration), 1940.
Allen's Commercial Organic — Analysis — 5.ª ed., vol. VI.

CONTRÔLE QUANTITATIVO DE COBRE EM AGUARDENTES

FRANCISCO PEDUTI

Químico do Instituto Adolfo Lutz

O contrôlo quantitativo dos teores de cobre em aguardentes, produto de grande consumo em nosso país, tornou-se ultimamente uma determinação analítica obrigatória e indispensável.

Até há pouco tempo a constatação dêste metal nas aguardentes não era verificada especificamente. Pesquisava-se a presença do cobre, juntamente com outros metais tóxicos, como o zinco, o chumbo, o níquel, etc., porventura existentes no produto. Mais tarde, exigiram os nossos regulamentos que fôsem sendo eliminadas pouco a pouco, as aguardentes cortadas ou manipuladas e obtidas pelo desdobramento de álcool etílico. Foram surgindo então obrigatoriamente, aguardentes mais puras e mais genuínas, providas de distilação direta, como deveriam ser, e que apresentavam consequentemente, componentes secundários e teores de acidez mais ou menos sensíveis e naturais do produto. Entretanto, foi sendo notada a presença mais ou menos acentuada do cobre em quase tôdas as aguardentes, principalmente naquelas em que os caracteres organoléuticos indicavam prèviamente, a boa origem do produto. (A presença dêste metal nas aguardentes, é geralmente atribuída aos aparelhos de distilação, feitos quase sempre de cobre, os quais, com o uso constante, são atacados internamente, e requerem de vez em quando, nova e protetora estanhagem).

A pesquisa e dosagem dêste metal considerado tóxico, principalmente na forma assimilável em que se apresentava, passou pois a ser feita sistemáticamente em tôdas as amostras de aguardentes enviadas para análise, considerando-se como impróprios para o consumo todos os produtos cujas reações positivassem a presença do cobre.

Como, porém, o número de condenações avultasse dia a dia e as reclamações dos interessados fôsem numerosas e constantes, foi resolvido que se determinassem, de acôrdo com outras Legislações e após apurada observação, teores quantitativos máximos deste metal tóxico, nas aguardentes, uma vez que os nossos regulamentos sanitários, então em vigor, silenciavam completamente a êsse respeito.

Assim, ficou estabelecido no Regulamento Sanitário sôbre Gêneros Alimentícios um teor máximo de tolerância correspondente a 0,010 (dez miligramas) de cobre para cada litro de aguardente, levando-se em conta o fato de serem geralmente de cobre as serpentinas dos alambiques distilatórios, serpentinas estas que, por mais bem estanhadas e por mais rigorosamente asseadas que fôsem, ainda assim poderiam ser atacadas pela natural e mais ou menos acentuada acidez das aguardentes, durante o seu curso de resfriamento.

Ao recebermos a incumbência de analisar neste Instituto, bebidas fortemente alcoólicas, principalmente aguardentes, não encontramos uma técnica analítica, determinada ou oficializada para a determinação do cobre. Procurámos obter, então, um método que além de simples fôsse exato e perfeito. Para êste fim procedemos a uma grande série de determinações quantitativas dêsse elemento, seguindo em traços gerais, a seguinte técnica:

“Colocávamos o resíduo da destilação de 250 cm³ de aguardente numa cápsula de porcelana e a deixávamos em banho-maria, até que o conteúdo se evaporasse. Em seguida procedíamos à calcinação do resíduo no forno mufla e nas cinzas obtidas adicionávamos 3 cm³ de solução de ácido nítrico a 1:10. Após nova evaporação em banho-maria, juntávamos ao resíduo 2 cm³ de solução de ácido sulfúrico a 1:10, e finalmente, após terceira evaporação adicionávamos às cinzas, água amoniacal, até que o líquido tomasse uma coloração azul. Uma vez filtrado o líquido e elevado o volume a 20 cm³, procedíamos à comparação no colorímetro de Hellige, paralelamente com uma solução padrão”.

Os resultados analíticos obtidos com êste método, eram mais ou menos satisfatórios, dentro dos limites da diluição com que operávamos. Mas em diluições maiores, verificámos que o método até então empregado não fornecia os resultados desejados, pois que os colorímetros de que dispúnhamos não nos ofereciam então, possibilidades de concordância.

Além disto, devemos lembrar também que, nas determinações colorimétricas, para obter resultados ideais, o operador deve primeiramente acomodar-se a uma perfeita obscuridade, para depois proceder a uma série de 10 ou 12 determinações consecutivas do mesmo produto, afim de tirar destas determinações a média para os seus cálculos. E para que uma determinação colorimétrica seja rigorosamente exata, é necessário que se estabeleça um limite máximo e correlato entre a concentração das soluções a serem determinadas e a da solução padrão, não devendo essas concentrações, para serem perfeitas, ultrapassarem uma intensidade maior do que de 1 para 2. Além destes, outro fator de deficiência do método exposto, é a intensidade visual própria de cada pesquisador.

Procurámos pois, melhorar os resultados obtidos, operando com diluições mínimas. Mas, mesmo assim, trabalhando com todo o rigor da técnica, obtínhamos para um mesmo produto, variações finais de cerca de 0,0006 a 0,0008 décimos de miligrama para cada 1.000 cm³ de produto.

Com o fim de verificar qual a anormalidade do método citado, recebemos do nosso prezado Chefe da Sub-divisão, Dr. Bruno Rangel Pestana, uma série de 6 amostras de aguardentes cuja procedência ignorávamos. Nas primeiras determinações analíticas, percebemos que as amostras haviam sofrido prévia manipulação, mas, pondo de lado esta suposição, procedemos à análise completa de toda a série. Obtivemos resultados mais ou menos análogos, que variavam apenas em certas determinações dentro dos limites normais de variação, logicamente obtidos em determinações repetidas num mesmo produto. No caso do cobre, que é a questão que nos interessa no momento, procedemos à verificação, submetendo, por medida de precaução, o material padrão, a todas as manipulações e tratamentos dados às aguardentes até à comparação final. Os resultados obtidos variavam de 0,006 a 0,009 miligramas por litro de aguardente. Duas determinações deram 0,007, duas outras deram 0,009, outra acusou 0,008 e finalmente a última 0,006. Portanto nenhum dos dados obtidos, apesar de diversos, ultrapassava ou mesmo atingia o limite máximo legal de 0,010 que decretaria a condensação do produto. A variação em média, destas determinações, levando-se em conta as diluições procedidas, segue-se a um limite de 0,0003 miligramas por cento de aguardente.

Apesar desta variação mínima, reconhecemos a necessidade de serem obtidos dados ainda mais seguros, afim de evitar possíveis

chicanas e desculpas de comerciantes interessados nos produtos. Procurámos pois obter novos métodos que não apresentassem falhas e não suscitassem dúvidas. E assim surgiu uma série múltipla de processos gravimétricos, titrimétricos, colorimétricos e mesmo gasmétricos, uns melhores, outros piores, apresentando falhas e defeitos mais ou menos acentuados, outros mais trabalhosos e demorados, e como tais, desaconselháveis ao nosso caso.

Diante desta multiplicidade de métodos, preocupava-nos a escolha de um processo que aliasse uma perfeita exatidão a uma simples, rápida e prática execução, em vista do grande número de amostras a examinar. Nos processos titrimétricos, geralmente mais simples e mais rápidos não encontramos, infelizmente, para a dosagem dos sais de cobre, resultados satisfatórios. Os processos gravimétricos são geralmente bons, mas apresentam uma série de requisitos demorados: requerem taras de cápsulas, eliminação prévia e rigorosa de outros elementos, lavagens de precipitados, temperatura certa para aquecimento, oxidações, reduções, enfim, inúmeros requisitos trabalhosos, demorados e com margem para diferenças sensíveis quando se trabalha com quantidades mínimas.

Ao analisarmos de relance estes métodos, surge-nos à experimentação, uma série de micro-reações para pesquisa de quantidades mínimas de cobre. Dentre estas micro-reações pareceu-nos muito prática e sensível a que indicava como reagente indicador, o ácido oleico. Esta micro-reação foi por nós experimentada e seus resultados práticos, atentamente observados. A técnica operatória consiste em juntar-se uma ou duas gotas de ácido oleico à aguardente a ser examinada. Havendo presença de cobre, produzir-se-á uma coloração típica azul esverdeada, que se desenvolverá lentamente (um ou dois dias), mas cuja formação poderá ser ativada por ebulição ou mesmo, agitação. Este método, porém, exige dois cuidados.

- 1.º) evitar-se a formação de uma emulsão permanente;
- 2.º) manter-se o pH da solução entre 5 e 8.

Diante da perfeição desta reação em tôdas as nossas dosagens qualitativas, procurámos verificar se ela poderia ser empregada para dosagens quantitativas. Colocámos 100 cm³ de aguardente e adicionámos-lhe 2 cm³ de ácido oleico. Agitámos o conteúdo, e depois elevámos o volume a 200 cm³, com água destilada. Do ácido oleico que sobrenada no líquido, foi pipetado 1 cm³, o qual foi elevado a 10 cm³, com álcool absoluto. Entretanto, procedendo do

mesmo modo com soluções padrões, verificámos que o ácido oleico não apresentava intensidade proporcional de coloração. Portanto, tal processo de dosagem foi posto de lado. Todavia, este método, pela sua grande e segura sensibilidade de reação como índice prévio, foi adotado nos casos em que devemos dosar o cobre e selecionar as aguardentes isentas deste tóxico.

Para esta prova preliminar, adotamos a seguinte marcha analítica: colocamos 10 cm⁵ de aguardente num tubo de ensaio e adicionamos-lhe 0,5 cm³ de ácido oleico. Agitamos bem o conteúdo e juntamos-lhe 10 cm³ de água destilada. Em seguida levamos o tubo ao banho-maria e observamos a coloração da camada de ácido oleico que sobrenada no líquido. Colorações levemente amareladas indicam ausência de cobre; colorações levemente azul-esverdeadas indicam traços deste metal; colorações azul-esverdeadas mais acentuadas e mais típicas indicam a presença de maior quantidade desse elemento. Quando são obtidas colorações perceptíveis, há necessidade de ser dosado, quantitativamente, o cobre existente.

Continuando nossas pesquisas à procura de um método prático e seguro, procedemos a uma série de experiências numa célula foto elétrica, de fabricação da General Electric, e os resultados foram os mais satisfatórios possíveis. Procurámos primeiramente obter uma solução padrão, dissolvendo em 1.000 cm³ de água destilada, 3 grs. 928 de sulfato de cobre (SO₄Cu 5H₂O), diversas vezes cristalizado. Obtida esta solução padrão inicial, em que cada cm³ corresponde a 0,001 gr. de cobre metálico, procedemos ao preparo de uma série de diluições testemunhas, de 0,001 gr. a 0,020 gr. por cento de cobre, para a devida leitura na célula foto elétrica.

Para obtê-las, dissolvemos um número X de cm³ em água, e adicionámos-lhe em seguida 2 cm⁵ de amônia a 25%, completando com água destilada o volume de 100 cm³, em balão aferido.

Finalmente, procedemos às leituras no comparador e verificámos que as mesmas não eram proporcionais nas diluições de 0,001 a 0,007, isto é, apresentavam um pequeno desvio não proporcional. Entretanto, constatámos que as leituras entre 0,007 a 0,020 eram perfeitamente proporcionais e abrangiam justamente os limites extremos e ideais do nosso caso.

Organizámos então uma tabela compreendendo as diluições de 0,007 a 0,020 gr.% de cobre.

CONTROLE QUANTITATIVO DE COBRE EM AGUARDENTES 221

TABELA DE LEITURA PARA DOSAGEM DO COBRE EM AGUARDENTES,
EMPREGANDO-SE A CÉLULA FOTO ELÉTRICA GENERAL ELECTRIC

Indicação da célula	Quantidade de cobre em mgrs. por 100 cm.
77,0	0,020
78,0	0,019
79,0	0,018
80,0	0,017
81,0	0,016
82,0	0,015
83,0	0,014
84,0	0,013
85,0	0,012
86,0	0,011
87,0	0,010
88,0	0,009
89,0	0,008
90,0	0,007

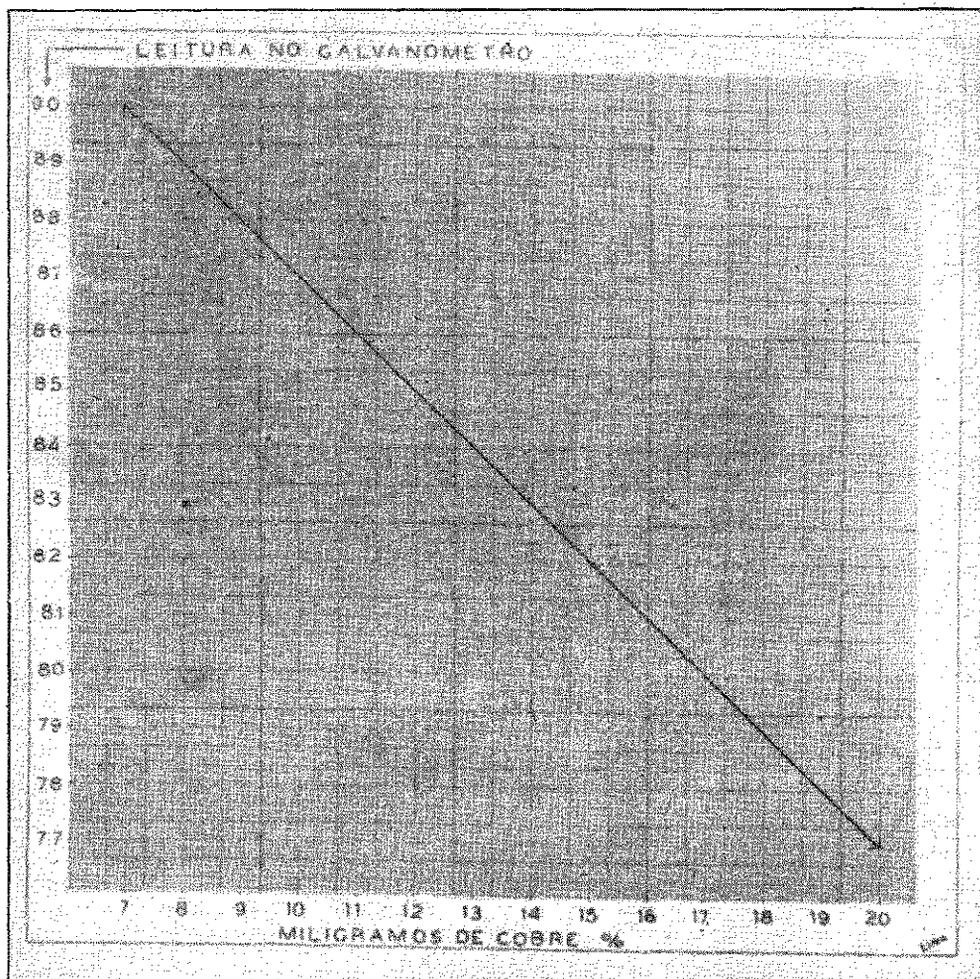
Obtida esta tabela, iniciámos a experimentação de seus resultados em aguardentes, empregando a seguinte técnica analítica:

Colocámos 500 cm³ de aguardente numa cápsula de porcelana e deixamos em banho-maria, até que o conteúdo se evaporasse. Em seguida procedemos à calcinação do resíduo, primeiramente com chama fraca, depois em forno mufla, a uma temperatura de 500° C., mais ou menos.

Após prévio resfriamento, umedecemos as cinzas com 2 cm³ de solução de H₂SO₄ a 10%, e colocamos a cápsula no banho-maria, onde permaneceu durante 30 minutos. Depois aquecemos o resíduo com chama fraca, até não haver mais despreendimento de fumaças brancas, e em seguida tratámo-lo com 2 cm³ de solução de H₂SO₄ a 10%. Aquecemos então o líquido lentamente, e depois o filtramos em papel de filtro tendo o cuidado de lavar o resíduo e o filtro com pequenas porções de água destilada, num total de 15 cm³ mais ou menos. Ao líquido adicionámos 2 cm³ de solução de amônia e o filtramos novamente, lavando depois o filtro com pequenas porções de água destilada, até completar o volume de 25 cm³, em balão aferido. Procedemos em seguida à comparação na célula foto elétrica, e dividimos o resultado correspondente da tabela, por 2, para obtermos a quantidade exata do cobre em 1.000 cm³ de aguardente.

O fenômeno então observado na célula merece ser lembrado. É o fenômeno da absorção da luz pelos meios fluidos que consiste

essencialmente na diminuição da intensidade do feixe luminoso transmitido, sem variação de direção. Quando um feixe de luz monocromático coincide sobre a superfície de um sistema absorvente, a intensidade da luz que penetra no sistema, diminui à medida que penetra no meio, formando uma curva, como a seguinte configuração.



Tôdas as medidas obtidas por êste processo, estão de acôrdo com a lei de Lambert, que especifica efetuar-se esta lei segundo uma outra lei exponencial. Assim teremos em função da absorção de X:

$$10 = a X \text{ sendo } a \text{ o coeficiente de absorção.}$$

Obtidos resultados tão satisfatórios com êste método, quisemos verificar os teores de cobre contido nas mesmas amostras padrões a que já nos referimos e com as quais havíamos obtido resultados um tanto discordantes. Tomámos três destas amostras, com as quais havíamos obtido no colorímetro de Hellige, 0,006, 0,007 e 0,008 gr. de cobre por 1.000 e procedemos rigorosamente de acôrdo com a técnica indicada. Verificámos então, com satisfação, que a célula acusava 0,007 gr. para tôdas as amostras, provando que as mesmas eram iguais, e ao mesmo tempo confirmando a rigorosa exatidão do método empregado.

Para finalizar esta exposição, queremos relatar a percentagem limitada de condenações de aguardentes contendo cobre, nestes dois últimos anos de quotidianos e ininterruptos trabalhos analíticos.

Num total de mais de 600 amostras de aguardentes analisadas, condenámos 26 por conterem teores de cobre acima de teor máximo fixado pelo Regulamento Sanitário, em vigor; 179 amostras apresentavam teores abaixo de 0,010 e acima de 0,003, e 244 apresentavam-se isentas dêste metal.

Ao apresentarmos êste modesto e despretencioso trabalho, temos apenas em mira concorrer com pequena parcela para a melhora de nossa técnica analítica, pois, estudando métodos mais práticos e mais exatos, é que poderemos aperfeiçoar os nossos trabalhos e dotá-los de mais eficiência e rendimentos. E' êste o nosso dever: zelar pela saúde pública e engrandecer o nome e a tradição do nosso Instituto.