

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

VOL. VI • AGOSTO DE 1946 • NUM. 1



AV. DR. ARNALDO, 3
SÃO PAULO • BRASIL

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

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

Tôda 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

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA

VOL. VI

AGOSTO DE 1946

N.º 1



SÃO PAULO — BRASIL
AV. DR. ARNALDO, 3

SUMÁRIO

ARIOSTO BÜLLER SOUTO e HÉLIO MARTINS — Investigações microbiológicas sobre manteigas	5
ARIOSTO BÜLLER SOUTO e HÉLIO MARTINS — Investigações microbiológicas sobre queijos	13
ARIOSTO BÜLLER SOUTO, MARIA APARECIDA MORENO, MARIA E. C. MACEDO, OLGA PUPO e ZÉLIA GAMBIER — Investigações sobre métodos rápidos para diferenciação dos microorganismos do grupo coliforme	21
ARIOSTO BÜLLER SOUTO, O. DE DODÓY e J. B. FERRAZ MENEZES JÚNIOR — Investigações microscópicas sobre manteigas ..	28
GUILHERME V. CURBAN — Estudo morfológico e quantitativo do método de Halberg na coloração do bacilo da lepra	50
JORDANO MANIERO — Uma nova madeira fóssil do Brasil meridional	65
MÁRIO SAMPAIO MELO — Caracteres organoléticos de alimentos e bebidas	77
SÍLVIO SOARES DE ALMEIDA e AMÉLIA PACHECO TRIGO — Eficiência dos meios de enriquecimento de Kauffmann e de Glicerina-Creoto de sódio no isolamento da <i>Eberthella typhosa</i>	97

INVESTIGAÇÕES MICROBIOLÓGICAS SOBRE MANTEIGAS (*)

ARIOSTO BÜLLER SOUTO E HÉLIO MARTINS

Biologistas do Instituto Adolfo Lutz.

INTRODUÇÃO

São de três diferentes categorias os microorganismos eventualmente encontrados no decurso dos exames bacteriológicos da manteiga, a saber: 1.º) aqueles que desempenham papel no preparo da mesma como agentes de fermentação, 2.º) aqueles que são ativos produtores da deterioração do produto e indicadores das falhas técnicas de manipulação e 3.º) aqueles que podem exercer ação patogênica.

Entre os diferentes microorganismos empregados na indústria da manteiga, alguns são dotados da propriedade de conferir aroma especial ao produto sendo particularmente importantes neste grupo o *Micrococcus-butyri-aroma-faciens* o *Bacterium aromaticus-butyri*, o *Streptococcus citrovorus* e o *Streptococcus lactis-cremoris*. Sabido hoje, que o aroma peculiar à manteiga está na dependência estrita do seu conteúdo em acetilmetilcarbinol e de seu derivado, o diacetil, numerosas pesquisas têm sido conduzidas com o fim de determinar a participação das bactérias na produção dessas substâncias aromatizantes. Enquanto que a produção do acetilmetilcarbinol e do seu derivado diacetil é característico de grande número de germes (Reação de Voges-Proskauer positiva para o acetilmetilcarbinol), a oxidação do acetilmetilcarbinol é peculiar somente à alguns microorganismos fermentadores do ácido cítrico, tais como o *Streptococcus citrovorus*, o *Streptococcus paracitrovorus* e outros.

Inúmeros são os microorganismos causadores de diferentes formas de deterioração e decomposição da manteiga. No que diz respeito às alterações dos caracteres organoléticos da manteiga, muito importante é a presença das bactérias do genero *Pseudomonas*.

(*) Trabalho apresentado e aprovado pela 1.ª Jornada Brasileira de Bromatologia.

Jamieson¹ adicionou às manteigas, culturas puras e mistas de diferentes microorganismos do genero *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. achromobacter*, *P. mucidolens*, *P. putrefaciens*) tendo obtido como resultado diferentes alterações nos caracteres organoléticos. O “gôsto de peixe” têm como causa principal a presença de leveduras *Oidium lactis* enquanto que o “gôsto de levedura” e o cheiro adocicado de algumas manteigas é devido, principalmente, às leveduras do gênero *Torula*. As bactérias esporuladas aeróbias (*Bacillus*), sobretudo as do grupo do *Bacillus subtilis* são as responsáveis pelo “gôsto metálico” em virtude da decomposição da caseína por elas operada. Outros microorganismos do gênero *Bacillus* são causadores do gôsto ácido de algumas manteigas. Germens banais e muito comuns na manteiga podem clivar a molécula gordurosa por meio de uma enzima (esteatopsina) produzindo como consequencia a “rancidão” da manteiga.

A presença das bactérias do grupo coliforme em elevado teor é considerada como de grande importância higiênica, sabido que o número excessivo de coliformes pode eventualmente indicar a coexistência de espécies patogênicas, tais como os agentes causais da febre tifóide, das disenterias, etc. Entretanto, é necessário acentuar que mesmo as manteigas com teores grandes de coliformes podem deixar de conter germens do grupo tifo-disentérico, assim como quaisquer outros patogênicos.

A contaminação pelos coliformes, conforme o demonstram diversos trabalhos, entre outros o de Vasileff², pode se originar por meio da poluição pelas poeiras do solo e forragens, pela má limpeza do vasilhame, pelos excrementos tanto humanos como animais e pelo emprêgo de águas de lavagens contaminadas. Compreende-se pois, a importância sanitária da caracterização dos coliformes como índice de preparo inadequado das manteigas. Do ponto de vista sanitário, as elevadas contagens de coliformes nas manteigas indicam sujidades diretas ou indiretamente acarretadas durante o manuseio.

Do ponto de vista tão discutido da ação patogênica dos coliformes, importa acentuar, consoante as observações de Sherman e Wing³, a produção de vários sub-produtos desses germes e, principalmente, a elaboração de toxinas enterotrópicas e neurotrópicas, muito bem estudadas por Vincent⁴. Tais toxinas, de acôrdo com verificações conduzidas por Pacheco e Xavier¹⁵, atuam fortemente sobre o intestino isolado e sobre a curva de pêso e consoante as observações de Mello e Rogick¹⁴ podem determinar a morte de

animais de experiência, em doses mínimas. Nessas condições, a inocuidade dos coliformes é perfeitamente discutível e a sua presença em alimentos deve ser considerada, sob o ponto de vista higiênico, imprópria, mercê de suas propriedades comprovadamente toxigênicas.

MÉTODO

No presente trabalho são analisados os resultados de exames microbiológicos procedidos em 366 manteigas e realizados na secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz.

O método empregado foi o seguinte: Tomam-se 11 cm³ de manteiga previamente fundida à temperatura conveniente e adicionam-se 90 cm³ de água filtrada estéril. Preparam-se a seguir as diluições sucessivas de 1/100, 1/1.000, 1/10.000 e 1/100.000, em água filtrada estéril semeando 1 cm³ de cada diluição em tubos contendo meio de verde brilhante; 1 cm da amostra de manteiga pura fundida e diluída em água estéril filtrada, é semeado em um tubo com meio de Sabouraud e outro de ágar comum, observando-se nos dias sucessivos o desenvolvimento de coliformes e cogumelos os quais serão isolados e identificados. A contagem é realizada da seguinte forma: preparam-se 6 placas de Petri estéreis; colocando-se nas três primeiras, 1 cm³ da diluição 1/10.000 e nas três últimas, 1 cm³ da diluição 1/100.000 tendo fundido previamente 2 tubos de meio de Garrod, 2 de ácido rosólico e 2 de ágar standard, coloca-se o conteúdo dos tubos sobre as duas diferentes diluições contidas nas placas de Petri.

Deixa-se solidificar e incuba-se a 37°C por 3 dias. No caso de serem as placas contáveis, realiza-se a primeira contagem após os 3 dias permanecendo depois as placas por mais dois dias em estufa a 37°C, realizando-se após 5 dias da sementeira, a segunda contagem. Registram-se os dois resultados obtidos.

As placas não sendo contáveis após os 3 primeiros dias de incubação são abandonadas.

RESULTADOS

O quadro abaixo transcrito exprime o total dos resultados. Na coluna 3 o número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento exclusivo de bactérias; na coluna 4 estão registrados o

número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento concomitante de bactérias e leveduras; na coluna 5, o número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento de bactérias e bolores; na coluna 6, o número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento de bactérias, leveduras e bolores; na coluna 7, o número e percentagem das amostras em que houve desenvolvimento de germes do grupo coliforme; na coluna 8, o número e natureza dos diferentes cogumelos.

Natureza do produto	Número de amostras		Bactérias		Bactérias + leveduras		Bactérias + bolores		Bactérias + cogumelos (leveduras e bolores)		Grupo coliforme		Cogumelos	
			N.	%	N.	%	N.	%	N.	%			N.	%
Manteiga	366	19	5,3%	327	89,3%	20	5,4%	347	94,7%	167	45,6%	327	20	

Para a contagem global de microorganismos, foram os seguintes os dados obtidos:

de 0 a 500 mil	germes por grama	— 35 amostras
de 500 mil a 1 milhão	germes por grama	— 25 amostras
de 1 milhão a 10 milhões	germes por grama	— 90 amostras
de 10 milhões a 20 milhões	germes por grama	— 55 amostras
de 20 milhões a 30 milhões	germes por grama	— 45 amostras
Acima de 30 milhões	germes por grama	— 116 amostras

366

DISCUSSÃO

Os microorganismos contaminantes estavam assim distribuídos: 347 amostras (94,7%) apresentaram desenvolvimento concomitante de bactérias (habitualmente bacilos *Gram*-positivos, esporulados, aeróbios ou bastonetes *Gram*-negativos), leveduras e bolores diversos; enquanto que nas restantes 19 amostras (5,3%) houve desenvolvimento exclusivo de bactérias e em 327 (89,3%) houve desenvolvimento de bactérias e leveduras.

No que diz respeito aos germes do grupo coliforme, as análises por nós efetuadas, atestam a sua presença em 45,6% das manteigas examinadas. A percentagem de coliformes indica seguramente as condições insatisfatórias e precárias em tôdas as fases do preparo

das manteigas, a saber: contaminação do leite na ordenha por parte do ordenhador ou de recipientes sem as necessárias condições de limpeza; ulteriormente, contaminação do creme, e finalmente contaminação da manteiga.

Além da contaminação pelos coliformes durante tôdas as fases de manuseio do produto, contaminações pelos germes mais diversos são super-ajuntadas de maneira a condicionarem os elevados teores de microorganismos encontrados. Todavia, de tôdas as formas de contaminação, a mais lastimável é a presença da *E. coli*, desde que se admite que o bacilo coli é um indício positivo de contaminação fecal por fezes de origem humana ou animal. No total das amostras examinadas a *E. coli* esteve presente 92 vêzes ou seja em 25,1%.

A *E. freundii* foi encontrada em 17 amostras (3,2%) e de acôrdo com o critério estabelecido por Parr⁵, em 1938, os intermediários do grupo coliforme constituem também um índice de contaminação fecal.

Dentre os outros germes do grupo coliforme encontramos o *Aerobacter aerogenes* em 57 das amostras, ou seja em 15,5%. Pôsto que os microorganismos do gênero *Aerobacter* não constituam um indício na apreciação dos índices sanitários e de controle bacteriológico, podem contudo produzir alterações nos caracteres organoléuticos das manteigas salgadas ou não, conforme verificaram Hammer e Yale⁶.

O *Aerobacter cloacae* foi encontrado em 15 amostras ou seja em 4% do total das examinadas. Conquanto tidos habitualmente como inócuas as bactérias do grupo *cloacae-aerogenes* foram responsabilizadas por casos de intoxicação alimentar por Gilbert, Coleman e Laviano⁷. Em publicação anterior Rogick¹⁰ havia verificado a flora colibacilar das manteigas expostas ao consumo no mercado de São Paulo e os resultados obtidos foram superiores aos nossos no que respeita à presença de *E. coli* para o qual obteve 69,35% de positividade. Em relação ao grupo *Aerobacter* os seus resultados foram concordantes com os nossos (20,97% para Rogick e 19,5% para nós); sendo superior a percentagem obtida para os intermediários do grupo coliforme encontrados em 9,68% das amostras examinadas por aquele autor.

Ainda Rogick¹⁰ acentúa a ausência dos germes do grupo *Escherichia-Aerobacter* nas manteigas salgadas, atribuindo ao cloreto de sódio (2,5% a 3%) essa ação inibitória. Com relação a outros

germes patogênicos, particularmente o *Mycobacterium tuberculosis* julgamos dispensável a sua pesquisa sistemática pois, embora Mello e Mastrofrancisco⁸ houvessem, em 1938, demonstrado a presença do *M. tuberculosis* em 33% dos leites da Capital de São Paulo. Mello⁹ não conseguiu evidenciar um só caso positivo para o bacilo de Koch nas manteigas por êle examinadas e consumidas em São Paulo. Tal diferença se explica de acôrdo com o mesmo autor em virtude da baixa incidência do bacilo da tuberculose no rebanho leiteiro do interior do Estado (cêrca de 2%), além da baixa vitalidade do bacilo, que morre habitualmente em 3 semanas, em consequência da inadaptabilidade ao meio acidificado.

A presença de leveduras e de bolores nas manteigas por nós examinadas foi muito elevada, ocorrendo tais cogumelos em 90,5% do total das amostras. Dentre as mais frequentes leveduras identificadas, encontramos as do gênero *Saccharomyces* em 129 amostras, as do gênero *Candida* em 44 amostras, as do gênero *Geotrichum* em 46 amostras; 19 amostras demonstraram leveduras do gênero *Torulopsis* e em 3 ocorreu a presença de *Rhodotorula*, leveduras produtoras de pigmento vermelho. Bolores pertencentes ao gênero *Penicillium* ocorreram em 9 das manteigas examinadas.

Conforme já foi assinalado em publicação anterior por Souto, Godoy e Menezes Jr¹¹, a presença de tais cogumelos em quantidade excessiva indica necessariamente deficiência na manufatura do produto ou emprêgo de métodos inadequados de refrigeração para conservação dos mesmos. Os cogumelos produzem, ademais, alteração nos caracteres organoléticos e diminuição do poder nutritivo pela degradação das gorduras e das proteínas. Consoante as afirmações de Macy e Richie¹² as leveduras e outros cogumelos servem de valioso critério para a avaliação do estado de conservação da manteiga, da eficiência da pasteurização e do estado sanitário das cremeiras.

CONCLUSÕES E RESUMO

1.º) Foram examinadas 366 amostras de manteigas de proveniência diversa.

2.º) A percentagem total de germes do grupo coliforme foi de 45,6% no total das manteigas examinadas.

3.º) A *Escherichia coli* foi encontrada em 92 amostras examinadas ou seja em 25,1%; a *Escherichia freundii* foi encontrada em 12 amostras ou seja em 3,2%; o *A. aerogenes* foi verificado em 57

amostras ou em 15,5%; o *A. cloacae* foi identificado em 15 amostras ou seja em 4%.

4.º) Em 250 amostras a contagem da flora global foi inferior a 30 milhões de germes por grama e em 116 amostras superior a 30 milhões de germes por grama.

CONCLUSIONS AND SUMMARY

1st. — 366 samples of butters from different places were examined.

2ed. — The total percentage of germe in the coliform group was 45.6% in all the butters examined.

3rd. — *Escherichia coli* was found in 92 samples, 25,1%; *Escherichia freundii* in 12 samples, 3,2%; *A. aerogenes* in 57 samples, 15,5%, and *A. cloacae* was identified in 15 samples, 4%.

4th. — In 250 samples the total flora count was less than 30 million germs per gramme, and in 116 samples it was more than 30 million germs per gramme.

AGRADECIMENTO

Os autôres agradecem às sras, Olga Pupo, Aparecida Moreno Pássaro, srts. Ema de Lima, Zélia Pujol Gambier, Aparecida Marcondes, Aparecida Carvalhaes, Ymê Amato e Sr. Clovis Napoleão, pelo eficiente auxílio prestado no desempenho da parte técnica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — JAMIESON, M. C. — 1943 — A new method for studying the effect of bacteria on butter flavor — *Food Research*, Jan. Feb., 8: 62.
- 2 — VASILEFF, I. — 1932 — Recherche et numeration du coli-bacille dans le lait par la methode du rouge neutre — *Le lait*, 12: 318.
- 3 — SHERMAN, J. M. e WING, V. H. — 1933 — The significance of colon bacteria in milk with special reference to standard — *Journ. Dairy Sc.*, 16: 165.
- 4 — VINCENT, H. — 1925 — Sur l'elimination urinaire du Bacille coli-comunis et sur son origine hématogene. *C. Rend. Soc. Biol.*, 180: 239.
- VINCENT, H. — 1925 — Sur la pluralité des toxines du Bacillus coli et les bases experimentalles de la serumtherapie anticoli bacillaire. *Camp. Rend. Acad. Sc.*, 180: 1624.

- VINCENT, H. — 1928 — Indice toxiques des races du *Bacillus coli*. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 187: 787.
- 5 — FARR, L. W. — 1939 — Coliform bacteria. *Bacteriological Reviews*, 3: 1.
- 6 — HAMMER e YALE — 1932 — *Journ. Dairy Sc.*, 15: 199.
- 7 — GILBERT, R., COLEMAN, M. B. e LAVIANO, A. B. — 1932 — Food poisoning due to toxic substances formed by strains of the cloacae aerogenes group. *Amer. Journ. Publ. Health*, 22: 721.
- 8 — MELLO, A. e MASTROFRANCISCO, N. — 1938 — Verificação sôbre a presença do bacilo tuberculoso no leite da Capital. *Bol. Ind. Animal*, 1: 25.
- 9 — MELLO, A. — 1939 — Sôbre a presença do bacilo tuberculoso nas manteigas de consumo na Capital. *Bol. Ind. Animal*, 2: 29.
- 10 — ROGICK, F. A. — 1942 — A manteiga e a sua flora colibacilar. *Rev. Ind. Animal*, 5: 35.
- 11 — SOUTO, A. Büller, GODÓI, O. e MENEZES JR., J. B. — 1946 — Investigações microscópicas sôbre a manteiga (Trabalho apresentado à 1.^a Jornada Brasileira de Bromatologia).
- 12 — MACY, H. e RICHIE, H. B. — 1929 — The mold and yeast count as an index of keeping quality of butter. *Jour. Dairy Sc.*, 12: 351.
- 13 — PACHECO, Genésio e XAVIER, Antônio Augusto — 1938 — Pesquisas sôbre os efeitos dos filtrados de culturas antigas de bacilo coli administrados por via digestiva a coelhos. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, 35:
- 14 — MELLO, A. e ROGICK, F. A. — 1940 — A flora colibacilar do queijo tipo Minas e toxi-infecção alimentar. *Rev. Ind. Animal*, 3: 35.
- 15 — PACHECO, Genésio e XAVIER, Antônio Augusto — 1938 — Influência do leite puro ou fermentado sôbre a curva de pêso. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, 33.

INVESTIGAÇÕES MICROBIOLÓGICAS SÔBRE QUEIJOS (*)

ARIOSTO BULLER SOUTO E HELIO MARTINS,

Biologistas do Instituto Adolfo Lutz.

Em trabalho anterior¹ os autôres já tiveram a oportunidade de passar em revista a importância dos microorganismos do grupo coliforme no contrôle sanitário dos produtos de laticínio em geral e da manteiga em particular.

Na presente investigação microbiológica sôbre queijos são analisados particularmente os resultados e os problemas concernentes à flora colibacilar dos mesmos em relação à Saúde Pública. Outros dados microbiológicos obtidos no curso dos exames, relativos à flora estafilocócica e micótica são analisados e discutidos em outras publicações, por um de nós (Martins¹⁵). A presente contribuição ocupa-se particularmente do perigo potencial que representa a presença de germes do grupo coliforme nos queijos entregues ao consumo e da necessidade de se estabelecerem medidas restritivas em relação à matéria. Tal afirmativa é justificada em parte, pelo fato de que em inúmeras amostras de queijos suspeitos de responsáveis por casos de intoxicação alimentar recebidos para exame na Secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz, não conseguimos isolar senão microorganismos do grupo coliforme. A êste respeito afirma Shrader⁸, comentando um surto de intoxicação causado por queijo, em que as pesquisas bacteriológicas não conseguiram evidenciar a presença de Salmonelas. "These cases are particularly interesting because they are representative of many such outbreaks that are never reported in the literature but are frequently encountered in public-health practice". Observa ainda, que os sintomas são súbitos, aparecem em poucas horas e são caracterizados por náuseas, dor abdominal, pulso rápido, diarréia e prostração, desaparecendo habitualmente após 24 horas.

A correlação existente entre a flora colibacilar de queijos e certas formas de intoxicação alimentar têm sido examinada por diver-

(*) Trabalho apresentado e aprovado pela 1.^a Jornada Brasileira de Bromatologia

soz pesquisadores. Particularmente interessantes são as pesquisas realizadas por Mello e Rogick² sôbre os germes do grupo coliforme entrados no queijo tipo Minas, — o mais consumido no Brasil — em relação à toxi-infecção alimentar. Observaram que “em alguns casos, a inoculação do material (queijo em suspensão homogênea) mesmo por via sub-cutânea, provocou 48 horas após, a morte das cobaias, que apresentavam extenso enfisema dissecante que, do ponto de inoculação, na face interna da coxa, ou terço inferior do abdomen, se irradiava até a região esternal” e que “a sementeira do material colhido na lesão e de sangue do coração revelou cultura pura de germes do grupo *Escherichia-aerobacter*”. Observaram ainda que os queijos examinados (tipo Minas) continham, em média, 114.100 germes do grupo *Escherichia aerobacter* por grama.

Florentin³ analisou cuidadosamente diversos surtos de intoxicação alimentar consequentes à ingestão de queijos. Após observar que a sintomatologia exibida pelos pacientes assemelhava-se àquela da intoxicação por toxinas microbianas, concluiu serem os queijos com elevado teor de colifórmes os responsáveis pela intoxicação. E termina afirmando: “Quoi qu’il en soit, il est quelque peu alarmant de constater que, tandis qu’on prohibe le colibacille dans l’eau, les huitres etc., la consommation de certains fromages conduit a en absorber des quantités considérables, et il apparait que la consommation des fromages colibacillaires n’est pas sans présenter des inconvénients pour l’organisme, ainsi qu’en témoignent les quelques intoxications assez graves que nous avons relatés plus haut”.

Igualmente, Tanner⁴ refere oito surtos de intoxicação por queijos ocorridos em uma povoação do Estado de Michigan, caracterizados por um conjunto dramático de sintomas: vomitos, cólica, diarréia. Pôsto que tais casos não tenham sido completamente elucidados sob o ponto de vista etiológico, os microorganismos do grupo coliforme presentes nos queijos ingeridos, aparecem como prováveis responsáveis por aqueles surtos, em virtude de terem determinado o aparecimento de fenômenos tóxicos em camondongos por meio de substâncias que, com bastante probabilidade, seriam verdadeiras toxinas (Tanner).

Igualmente, Savage e White⁷ analisando cem casos de intoxicação alimentar, referem-se a oito deles como tendo sido desencadeados pela ingestão de queijos.

É interessante observar-se que os sintomas próprios da intoxicação produzida por queijos (diarréia, cólica e náuseas) são idênti-

cos àqueles observados nos distúrbios gastro-intestinais que ocorrem habitualmente após a ingestão de águas poluídas pelo conteúdo dos esgotos, pois conforme afirma Dack⁹: “When water is suddenly contaminated with sewage, cases of diarrhea, abdominal cramping and nausea frequently occur within 12-48 hours”. Dack⁹ exemplifica citando um grave surto epidêmico de enterite referido por Jordan e Irons¹⁰ que acometeu 10.000 habitantes de Rockford cuja água de abastecimento fôra temporariamente poluída pelo conteúdo de esgotos.

Igualmente importantes são os casos de intoxicação alimentar causados pela *E. coli* presentes em outros alimentos. Lodenkämper¹¹, que realizou uma revisão na literatura sôbre o assunto, refere alguns casos de intoxicação devidos à *E. coli* tendo feito a comprovação da toxidez do germe por meio da administração oral e inoculação endoperitoneal, em camundongos, de filtrados de cultura. Igualmente, coliformes do grupo *aerogenes-cloacae* têm sido responsabilizados por surtos de intoxicação alimentar. Particularmente interessante é o caso referido por Gilbert, Coleman e Laviano⁶, de um surto de gastro-enterite afetando 125 pessoas após a ingestão de “bombas” e “eclairs” de chocolate dos quais foi isolado um microorganismo pertencente ao grupo *cloacae-aerogenes* que demonstrou ser tóxico para animais de experiência. Buchanan e Megrail¹ referem igualmente dois surtos de intoxicação alimentar “provavelmente devidos ao *B. cloacae*”. Ao lado das diferentes formas clínicas características da colibacilose, é particularmente interessante, como exemplo do poder patogênico dos coliformes, a diarréia infecciosa do recém-nascido, afecção altamente letal, caracterizada por grave intoxicação e desidratação, clinicamente comparável ao cólera asiático — e que, consoante a autorizada opinião de Parr¹², tem a sua etiologia ligada ao grupo coliforme. Dulaney e Michelson¹³ descrevem um surto de diarréia em recém-nascidos produzidos pelo *B. coli-mutabile*.

A capacidade toxigênica da *E. coli* tem sido analisada por diversos pesquisadores. Vincent demonstrou que a *E. coli* produz duas classes de toxinas: uma de ação sôbre o sistema nervoso (neurotrópica); outra de ação sôbre o intestino (enterotrópica). A inoculação experimental de tais toxinas determina o aparecimento de: 1.º) sintomas nervosos e neuromusculares: paralisias que se iniciam nos membros posteriores atingindo, em seguida, os membros anteriores e acometendo os musculos inervados pelos centros bulbares; 2.º)

sintomas intestinais — enterite aguda, lesões do intestino, congestão intensa, etc.

Pacheco e Xavier demonstraram que a administração repetida, por via digestiva, de filtrados de culturas de *E. coli* a coelhos, determina uma diminuição progressiva de pêso que termina com caquexia e morte do animal.

Mello e Rogick² observaram que, enquanto a maioria das raças de *E. coli* enquadra-se entre as variedades inócuas, outras existem, extremamente virulentas, capazes de, em doses mínimas (1/5, 1/10, 1/15 de alça de cultura), matar cobaias por via peritoneal. Parr¹² aventou a hipótese de que todos os coliformes seriam idôneos para produzir toxinas, ocorrendo contudo, poucas raças capazes de produzi-las em quantidade suficiente para o desencadeamento dos sintomas de intoxicação, ponderando ainda que o adulto normal é relativamente resistente a tais toxinas.

A aparente disparidade estatística entre a grande proporção de queijos (e também de outros alimentos) contendo elevado teor de *E. coli* e os surtos de intoxicações devidos a êsses mesmos queijos, teria sua explicação no grande número de variedades do *B. coli* (*communis*, *communior*, *vulgaris*, *inversus*, *anomalus*, *mutabilis*, *hoemoliticus*) e na ocorrência de raças fortemente toxigênicas ao lado de raças atóxicas, o que explica igualmente os sintomas anômalos e díspares da infecção colibacilar.

MÉTODO EMPREGADO

Na presente publicação são analisados os resultados de exames microbiológicos de 147 queijos de diferentes naturezas, realizados na Secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz.

Os principais tipos de queijos analisados foram: tipo Minas, tipo Prato, tipo Parmezon e tipo Provolone.

O método empregado foi o seguinte: Pesam-se 10 gramas do queijo e tritura-se em gral estéril com um pouco de areia, ajuntando em seguida 90 cm³ de água filtrada esterilizada. Fazem-se as diluições subsequentes até 1/100.000. Semeam-se as respectivas diluições em meio de verde brilhante e incuba-se a 37°C por 24-48 horas. Observa-se a produção de gás pelos germes do grupo coliforme. Semeia-se também a diluição 1/10 em meios de Kauffmann e Sabouraud incubando-os respectivamente a 37°C e 28°C. O tempo de incubação para o Sabouraud deve ser prolongado até vários dias.

A contagem bacteriana é feita em placas de agar standard de acôrdo com a técnica seguinte: coloca-se 1 cm³ das diluições (a partir de 1/100) em cada uma das 4 placas de Petri e junta-se o agar, prèviamente fundido e resfriado a 45°C, imprimindo às placas um movimento rotatório afim de misturar completamente o agar com a água de diluição. Incuba-se a 37°C e realizam-se as contagens após 24 horas.

RESULTADOS

No quadro abaixo transcrito estão registrados os resultados obtidos:

Natureza do produto	Total das amostras examinadas			Bactérias		Bactérias + cogumelos (leveduras e bolores)		Grupo coliforme								Estafilococos		Cogumelos		
								E. coli		A. aerogenes		A. cloacae		E. freundii				Total do grupo coliforme		leveduras
	N.	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	N.	N.		
Queijo	147	24	16,3%	123	83,6%	66	75,2%	13	14,6%	6	6,8%	3	3,4%	88	59,8%	23	112	11		

No coluna III o número e percentagem de amostras que apresentavam desenvolvimento exclusivo de bactérias; na coluna IV, o número e percentagem de amostras nas quais houve desenvolvimento concomitante de bactérias e cogumelos (levedos e bolores); na coluna V, o número e percentagem de amostras em que estiveram presentes os diferentes germes do grupo coliforme; na coluna VI o número de amostras dos quais foram isolados estafilococos; na coluna VII o número e natureza dos cogumelos identificados.

Os microorganismos contaminantes estavam assim distribuídos: em 24 amostras houve desenvolvimento exclusivo de bacilos *Gram*-positivos esporulados e bacilos *Gram*-negativos enquanto que nas restantes 123 observou-se o crescimento concomitante de bacilos e fungos diversos (leveduras e bolores).

Em relação aos microorganismos do grupo coliforme, os exames por nós efetuados atestam a sua presença em 88 amostras ou seja em 59,8% do total de queijos examinados. Dêstes microorganismos, a *E. coli* foi encontrada em 66 amostras; a *E. freundii* em 3 amostras, o *Aerobacter aerogenes* em 13 amostras e o *Aerobacter cloacae* em 6 queijos.

Foram as seguintes as percentagens dos coliformes em relação ao total do grupo: *E. coli* 75,2%, *A. aerogenes* 14,6%, *A. cloace* 6,8% e *E. freundii* 3,4%. Esses resultados obtidos em queijos de diferentes espécies são bastante semelhantes aos encontrados por Mello e Rogick² no exame de queijo tipo Minas: *Escherichia* 75,56%, *Aerobacter* 11,10%, tipos intermediários 13,34%.

Em relação à flora global, obtivemos os seguintes resultados em 71 amostras analisadas:

Abaixo de 1 milhão de germes por grama	2 amostras
De 1 milhão a 10 milhões de germes por grama	8 amostras
De 10 milhões a 20 milhões de germes por grama	7 amostras
De 20 milhões a 30 milhões de germes por grama	3 amostras
Acima de 30 milhões	51 amostras
	—
	71 amostras

Conforme se verifica 71,8% das amostras analisadas apresentam teor microbiológico superior a 30 milhões de germes por grama e 28,2% abaixo de 30 milhões de germes por grama.

Outros microorganismos encontrados foram: estafilococos em 32 amostras, leveduras diversas em 112 amostras e bolores em 11 amostras.

Os elevados teores microbiológicos encontrados e, sobretudo, a elevada percentagem da *E. coli* indicam seguramente a existência de condições insatisfatórias no preparo dos queijos e o uso de leites com elevado teor de coliformes. Conforme demonstraram perfeitamente Mello e Rogick² a maneira mais segura de evitar o desenvolvimento de coliformes no queijo (tipo Minas) é a pasteurização do leite. Assim estariam os consumidores protegidos contra a ingestão de queijos que, de acôrdo com os mesmos autôres, introduzem no organismo humano a média de 114.110 germes do grupo coliforme por grama do produto e seriam evitados os riscos da toxi-infecção alimentar pela *E. coli*.

RESUMO E CONCLUSÕES

1) Empregando métodos adequados de contróle microbiológico foram examinadas 147 amostras de queijos de diferentes espécies (tipo Minas, tipo Prato, tipo Provolone, tipo Parmezão).

2) Em 88 das amostras examinadas (59,8%) foram encontrados microorganismos do grupo coliforme nas seguintes percentagens em relação ao total do grupo: *E. coli* 75,2%, *A. aerogenes*, 14,6%, *A. cloacae*, 6,8% e *E. freundii*, 3,4%.

3) Em 71 amostras em que foi realizada a contagem da flora global, 20 apresentaram contagens de 0 até 30 milhões de germes por grama (28,2%) enquanto que nas 51 restantes (71,8%) a contagem obtida era superior a 30 milhões de germes por grama.

4) Foram isolados cogumelos em 120 amostras e estafilococos em 32 queijos examinados.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1st. — Adequate methods of microbiological control were employed for the testing of 147 samples of different types of cheses Minas type, Prata type, Provolone type, Parmezan type).

2nd. — 88 of the specimens examined (59,8%) were found to contain microorganisms of the coliform group in the following percentages, given in relation to total amount of the group: *E. coli*, 75,2%, *A. aerogenes*, 14,6% *A. cloacae*, 6,8% and *E. freundii*, 3,4%.

3rd. — A total count was made for 71 samples, 20 of which had a count ranging from 0 to 30 million germs per gramme (28,2%), while in the 51 remaining samples (71,8%) the was over 30 million germs per gramme.

4th. — Fungi were obtained from 120 samples and staphylococci from 32 of the cheeses examined.

AGRADECIMENTO

Os Autôres agradecem às Sras. Olga Pupo, Aparecida Moreno Pássaro, às Senhoritas Ema de Lima, Zélia Pujol Gambier, Aparecida Marcondes, Aparecida Carvalhaes, Ymê Amato e ao Sr. Clovis Napoleão pelo eficiente auxílio prestado no desempenho da parte técnica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BUCHANAN, E. B. e MEGRAIL, E. — 1929 — Two outbreaks of food poisoning probably due to *B. cloacae*. *Journ. Inf. Dis.*, 44: 235.
- 2 — MELLO, A. e ROGICK, F. A. — 1940 — A flora colibacilar do queijo tipo Minas e toxi-infecção alimentar. *Rev. Ind. Animal*, 3: 35.

- 3 — FLORENTIN, D. — 1938 — La flore colibacillaire des fromages et les intoxications alimentaires. *Compt. Rend. Acad. Sc.*, 206: 1060.
- 4 — TANNER, F. W. — 1933 — Food-borne infections and intoxications — Twin — City Printing Co., 111.
- 5 — VINCENT, H. — 1925 — Sur l'élimination urinaire du Bacille coli-comunis et sur son origine hématogène. *C. Rend. Soc. Biol.*, 180: 239.
— VINCENT, H. — 1925 — Sur la pluralité des toxines du Bacillus coli et les bases expérimentales de la serumthérapie anticoli bacillaire. *Comp. Rend. Acad. Sc.*, 180: 1624.
— VINCENT, H. — 1928 — Indice toxique des races du Bacillus coli. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 187: 787.
- 6 — GILBERT, R., COLLEMAN, M., LAVIANO, A. B. — 1932 — Food poisoning due to toxic substances formed by strains of the cloacaeerogenes group. *Amer. Journ. Publ. Health*, 22: 721.
- 7 — SAVAGE e WHITE — 1939 — Cit. in Food Control — Its Public Health Aspects — New York — John Wiley and Sons, Inc., 1939.
- 8 — SHRADER, James Houston — 1939 — Food Control — Its Public Health Aspects — New York John Wiley and Sons, Inc.
- 9 — Dack, G. M. — Food poisoning. The University of Chicago Press. Chicago, 111.
- 10 — JORDAN, E. O. e IRONS, E. E. — 1912 — Cit. in Dack-Food Poisoning, *Journ. Inf. Dis.*, 11: 21.
- 11 — LODENKAMPER, H. — 1940 — *Centr. f. Bakt.* (Abt. 1) Orig., 145: 306.
- 12 — PARR, L. W. — 1939 — Coliform Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 3: 1.
- 13 — DULANEY, L. S. e MICHELSON, I. D. — 1935 — A study of *B. coli mutabile* from an outbreak of diarrhea in the new-born. *Am Journ. Publ. Health*, 25: 1241.
- 14 — SOUTO, A. Büller e MARTINS, H. — 1946 — Investigações microbiológicas sobre manteigas (Trabalho apresentado à 1.ª Jornada Brasileira de Bromatologia).
- 15 — MARTINS, H. — Investigações sobre estafilococos isolados de alimentos. (no prelo).
— MARTINS, H. — Investigações sobre a flora micótica de alimentos. (no prelo).

INVESTIGAÇÕES SÔBRE MÉTODOS RÁPIDOS PARA DIFERENCIAÇÃO DOS MICROORGANIS- MOS DO GRUPO COLIFORME.

A. BÜLLER SOUTO

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

MARIA APARECIDA MORENO, MARIA E. C. MACEDO, OLGA PUPO
E ZÉLIA GAMBIER

Técnicas de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

Desde a descoberta da *E. coli* e do *A. aerogenes*, o grupo das bactérias coliformes apresenta o mais profundo interêsse para os bacteriologistas e sanitaristas. Conforme referem Chem e Rettger²: “As theses organisms were first isolated from human intestine, their presence elsewhere has generally been taken as an index of fecal pollution”.

O estudo das bases da identificação e da diferenciação dos germes do grupo coliforme, levou a apreciar o seu comportamento nos diferentes meios de cultivo.

O estudo da fermentação da glicose pelos coliformes conduziu à descoberta de dois fatos importantes: a *E. coli* produz acidez elevada e utilização parcial de glicose, enquanto que o *A. aerogenes* produz acidez baixa e exaustão completa da glicose. Assim o comportamento do *A. aerogenes* em relação à glicose é totalmente diverso do da *E. coli*, ao passo que conforme verificou Thompson⁹, o comportamento do *A. cloacae* sobre a glicose é idêntico ao do *A. aerogenes*. Estudando o comportamento de certo número de bactérias em meios de cultivo ricos de glicose, Voges e Proskauer¹¹, em seus estudos sobre as bactérias da septicemia hemorrágica, descreveram uma reação colorida.

Esta reação foi denominada reação ou prova VP e, desde logo, foi empregada na identificação e diferenciação das bactérias, principalmente na diferenciação das bactérias do grupo coliforme, pois as do gênero *Escherichia* são VP negativas, ao passo que as pertencentes ao gênero *Aerobacter* são VP positivas.

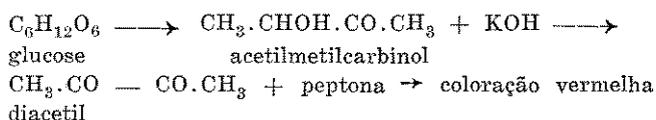
(*) Trabalho apresentado e aprovado pela 1.ª Jornada Brasileira de Bromatologia.

A reação de VP é devida à formação, por certo número de bactérias, de uma substância redutora denominada acetilmetilcarbinol (acetoina).

Segundo verificaram Harden e Norris³ o acetilmetilcarbinol é oxidado pela adição da potassa, em presença da peptona, comunicando ao meio uma coloração semelhante a da eosina.

O acetilmetilcarbinol, $\text{CH}_3\text{.CHOH.CO.CH}_3$, é um produto de oxidação do 2:3 butilenoglicol $\text{CH}_3\text{.CHOH.CHOH.CH}_3$. O carbinol oxidado em presença de álcalis fortes dá origem ao diacetil ($\text{CH}_3\text{.CO}_2$); êste, exposto ao ar e em presença de potassa, reage com a peptona formando um composto com coloração semelhante a da eosina.

A marcha obedecida pela reação de VP seria a seguinte:



A produção do acetilmetilcarbinol e do 2:3 butileno glicol seria devida à condensação do acetaldeído formado. Mais tarde Neuberg e Reinfurth⁵ verificaram que, adicionando acetaldeído a um meio contendo açúcar fermentado por levedura, forma-se a aciloina, por condensação pela união de uma molécula do aldeído adicionado a uma molécula do aldeído produzido pela levedura. Êssa condensação do aldeído e formação do acetilmetilcarbinol, seria devida à ação da levedura sob a influência de uma enzima denominada carboli-gase (Neuberg).

A reação sendo demorada e deixando, por vêzes, dúvidas quanto a sua interpretação, foi motivo de pesquisas a fim de tornar a sua leitura mais rápida. Assim Chen e Rcttger³ sugeriram a agitação, durante certo tempo, das culturas na quantidade de 5 a 6 cm^3 incubadas 5 dias a 37°C, com igual quantidade de solução a 10% de potassa e incubação novamente a 30°C por 1 à 3 horas e nova agitação. Walpole¹² observou que passando uma corrente de ar através da cultura forma-se acetilmetilcarbinol em quantidade 5 ou 6 vêzes maior do que sem o borbulhamento do ar.

Rogers e colaboradores⁸, verificaram que havia uma definida relação entre as bactérias do grupo VP e as da prova do vermelho de metila. As bactérias VP positivas eram sempre negativas sendo também verdadeiro o inverso.

A reação VP foi empregada para identificação da *E. coli* e para a diferenciação dos diferentes coliformes. Conforme referem Chen e Rettger³ a prova VP demonstrou ser muito útil para diferenciar a *E. coli* dos diferentes tipos de *Aerobacter*: "Neither the character of the medium nor the period of incubation seems to interfere with carbinol formation". A oxigenação abundante e a alcalinização forte seriam as condições indispensáveis para que a reação se produzisse.

Quando a incubação se prolonga por um longo período a reação de Voges-Proskauer torna-se negativa. Conforme verificaram Paine⁷ e Williams e Morrow¹⁴ as bactérias destroem o acetilmetilcarbinol. Como esta destruição não é paralela à exaustão da peptona Williams e Morrow¹⁴ concluem que "it seems probable that compound serves as a source of carbon". Tittsler¹⁰ verificou que no meio de Clark Lubs o gênero *Aerobacter* produz reação negativa com 5 dias e positiva com 3 dias, donde a necessidade de não prolongar a incubação além de 3 dias quando se prefere usar o meio de Clark Lubs (aliás, conforme recomenda o Standard Methods of Water Analysis A. Publ. Health Ass. 1933). Como o acetilmetilcarbinol está em relação direta com o "flavour" de numerosos alimentos tais como a manteiga, o pão, o café, o tabaco e a cerveja, Tittsler¹⁰ procurou verificar até que ponto os membros do gênero *Aerobacter* poderiam fermentar o acetilmetilcarbinol, transformando-o em diacetil e alterando portanto os característicos organoléticos daqueles alimentos. Verificou que aproximadamente a metade das amostras de *A. aerogenes* e *A. oxitocum* fermentam esta substância que não é atacada pelas amostras de *A. cloacae* e *A. levans*.

Partindo do princípio que a prova do VP pode ser apressada pela oxidação, Levine, Weldin e Johnson⁴ experimentaram vários oxidantes, com o objetivo de apressar a reação. Empregaram entre outros: o bicromato de potássio, o clorato de potássio, o perclorato de potássio, o peróxido de bário, o hipoclorito de cálcio e o peróxido de hidrogênio, lançando mão da sacarose em lugar da glicose. Com o emprêgo do primeiro conseguiram obter leituras positivas após 15 minutos. Em geral, porém, todos os oxidantes apressam a leitura, tendo o peróxido de hidrogênio dado resultados melhores. E' necessário, porém, juntar o peróxido de hidrogênio após ter misturado a cultura com a potassa e depois de já ter aquecido esta mistura em banho-Maria por 2 minutos. O peróxido de hidrogênio

é adicionado na quantidade de 2 a 3 gotas. A coloração aparece em 1 ou 2 minutos e persiste por várias horas. Um excesso de peróxido de hidrogênio torna a reação muito fugaz. Nos meios glicosados a adição do peróxido não é inteiramente satisfatória, pois, segundo referem Levine e colaboradores⁴: "The difficulty is probably due to the coloration which develops when the glucose — KOH mixture is heated".

Com idêntico objetivo de apressar a leitura do VP foi empregado o peróxido de sódio por Bedford¹; o inconveniente maior no uso desse agente oxidante reside na natureza transitória da coloração, nas culturas positivas.

Procurando evitar êsses inconvenientes Werkmann¹³ empregou o cloreto férrico como catalisador afim de apressar a oxidação do acetilmetilcarbinol em diacetil. Acentua Werkmann¹³ várias vantagens no emprêgo desta substância: a coloração forte aparece na superfície após poucos minutos e se estende para o fundo do tubo, a coloração é estável por vários dias e assim permanece mesmo após uma semana, dando a prova resultados positivos desde os três primeiros dias de incubação a 30°C.

A técnica consistia em juntar 2 gotas de uma solução a 2% de cloreto férrico a 5cm³ da cultura, adicionava-se depois 5cm³ de uma solução de soda a 10% sendo o tubo agitado. A adição do cloreto férrico deve ser feita antes da soda, porque depois forma-se uma floculação marcada. A reação é apressada aquecendo-se a cultura mais o cloreto férrico, sem a soda, durante um minuto em água fervendo.

Tomando em consideração as objeções comumente feitas contra os métodos de diferenciação aconselhados pelo "Standard Methods for Water Analysis" resolveram Lindsey e Meckler⁵, empregar comparativamente o método de Werkmann¹³ em culturas em caldo glicosado de 24 horas a 37°C e o método padrão e verificar se os mesmos coincidiam exatamente.

Tendo em conta, também, as diferenças de potenciais de oxido-redução entre *E. coli* e *A. aerogenes*, Lindsey e Meckler⁵ resolveram igualmente investigar a possibilidade de ser empregado o potencial redox para a diferenciação de coliformes, utilizando a redução dos corantes como indicador. Verificaram assim que pingando uma gota de uma solução aquosa saturada de azul de metileno em uma cultura de 24 horas de *A. aerogenes* em caldo lactosado, o azul de metileno é reduzido em poucos minutos. No caso

da *E. coli* só havia redução após várias horas. Não empregavam meios especiais, utilizando apenas os tubos de fermentação de caldo lactosado usados nas “provas complementares” para o grupo *coli-aerogenes*.

Assim conseguiram diferenciar com a maior facilidade a *E. coli* do *A. aerogenes* em apenas uma hora, sem a necessidade de serem usados meios especiais.

Porém, se em lugar do caldo lactosado empregavam o caldo comum, as culturas de 24 horas da *E. coli* reduziam o azul de metileno rapidamente.

A explicação seria a seguinte: durante o seu crescimento a *E. coli* aumenta a concentração iônica do caldo com açúcar tão rapidamente que o limite de tolerância é prontamente atingido e o crescimento para. Ao passo que o *A. aerogenes* tende a decompor o ácido à medida que o mesmo vai sendo formado e assim o crescimento prossegue por muito mais tempo. No caldo lactosado a *E. coli* não reduz mais o azul de metileno porque o crescimento, após 24 horas é paralisado integralmente e a taxa de crescimento é extremamente lenta. A média de crescimento é o fator principal na determinação dos potenciais de desenvolvimento das culturas.

TÉCNICA

Foi empregada a técnica de Lindsey e Meckler⁵: adicionava-se às culturas de 24 horas em caldo lactosado, uma gota de solução aquosa saturada de azul de metileno e observava-se por várias horas na temperatura ambiente.

O controle do VP era feito com a mesma amostra cultivada em caldo com sacarose e de acordo com o “Standard Methods of Pure Culture”.

RESULTADO

Foram examinadas 226 amostras sendo;

- 84 de *Aerobacter aerogenes*
- 52 de *Aerobacter cloacae*
- 51 de *E. coli*
- 39 de *E. freundii*

As amostras foram isoladas de produtos diversos.

Dentre as 84 amostras examinadas de *A. aerogenes*, 71 deram resultados positivos com o VP padrão e 13 discordaram, o que representa 18,3% de discordância entre os dois métodos de diagnóstico.

Dentre as 52 amostras de *A. cloacae*: 37 deram resultados positivos, 15 discordaram, o que demonstra uma elevada porcentagem de 40,5% de discordância.

De *E. coli* foram examinadas 51 amostras, havendo 49 concordantes e 2 discordantes ou sejam 4% de discordâncias.

Entre as 39 amostras de *E. freundii* somente uma discordou em 2,63% do total das examinadas.

Conforme se deduz dos resultados acima, a prova de VP comparada com a prova de redução de azul de metileno de Lindsey e Meckler⁵, demonstrou resultados aproximadamente comparáveis só nos germes do grupo *Escherichia*.

CONCLUSÃO:

1 — A diferença de potencial de óxido-redução entre os germes dos gêneros *Escherichia* e *Aerogenes* foi experimentada para a diferenciação rápida desses coliformes.

2 — O indicador usado foi o azul de metileno.

3 — A reação de VP foi tomada como termo de comparação.

4 — O método do azul de metileno apresentou 2,63% de discordância com o VP entre as espécies de *E. freundii*; 4% entre as de *E. coli*; 18,3% entre as de *A. aerogenes* e 40,5% entre as de *A. cloacae*.

5 — O método de diferenciação dos coliformes pelo descoramento do azul de metileno não oferece margem de segurança.

CONCLUSIONS

1st. — The difference in the oxy-reduction potential between germs of the *Escherichia* and *Aeropenes* genera was tried out as a basis for rapid differentiation of these coli-form germs.

2nd. — The indicator used was methylene blue.

3rd. — The V. P. reaction was taken as a means of comparison.

4th. — The methylene blue did not tally with the VP in 2,63% of the species of *E. freundii*, 4% of the *E. coli*, 18,3% of *A. aerogenes*, and 40,5% of the *A. cloacae*.

5th. — The method of differentiation of the coliform germs by the discoloration of the methylene blue is not secure one.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BEDFORD, R. H. — 1929 — A rapid method for obtaining the Voges Proskauer reaction. *Journ. Bact.*, 18: 93.
- 2 — CHEN, C. C. e RETTGER, L. F. — 1920 — A correlation study of colon aerogenes group of bacteria, with special reference to the organisms occurring in soil. *Journ. Bact.*, 5: 253.
- 3 — HARDEN, A. e NORRIS, D. — 1912 — The bacterial production of acetylmethyl carbinol and 2,3-butylene; glycol from various substances. *Proc. Roy. Soc.*, 85: 73.
- 4 — LEVINE, M., WELDIN, J. C. e JOHNSON, B. R. — 1917 — The Voges-Proskauer and correlated reactions of coli-like bacteria. *Journ. Inf. Dis.*, 21: 39.
- 5 — LINDSEY, G. A. e MECKELR, C. M. — 1932 — Two rapid methods for distinguishing between *Escherichia coli* and *Aerobacter aerogenes*. *Journ. Bact.*, 32: 114.
- 6 — NEUBERG, C. e REINFURTH, E. — 1923 — Eine neue form Unwandlung des Acetaldehyde durch gärende Hefe. *Bioch. Zeitschr*, 143: 553.
- 7 — PAINE, F. S. — 1927 — The destruction of acetyl-methylcarbinol by members of the colon-aerogenes group. *Journ. Bact.*, 13: 269.
- 8 — ROGERS, L. A., CLARK, W. M. e LUBS, H. A. — 1918 — The characteristics of bacteria of the colon type occurring in human feces. *Journ. Bact.*, 3: 231.
- 9 — THOMPSON, J. — The chemical action of *B. cloacae* on glucose and manitol.
- 10 — TITSLER, R. P. — 1938 — The fermentation of acetyl-methyl carbinol by the *Escherichia-aerobacter* group and its significance in the Voges-Proskauer reaction. *Journ. Bact.*, 35: 157.
- 11 — VOGES, O. e PROSKAUER, B. — 1898 — Beitrage zur Ernährungs-physiologie und zur differential diagnose der Bacterien der Hemorrhagischen septicaemie. *Zeit. fur Hyg.*, 28: 20.
- 12 — WALPOLE, S. G. — 1910-1911 — The action of *B. lactis aerogenes* on glucose and manitol. *Proc. Roy. Soc.*, 83: 272.
- 14 — WILLIAMS, O. B. e MORROW, H. B. — 1928 — The bacterial destruction of acetyl-metyl-carbinol. *Journ. Bact.*, 16: 43.

INVESTIGAÇÕES MICROSCÓPICAS SOBRE MANTEIGAS (*)

A. BÜLLER SOUTO

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

O. DE GODOY E J. B. FERRAZ MENEZES JÚNIOR

Químicos do Instituto Adolfo Lutz.

A manteiga é um alimento de consumo grande e muito difundido, daí o interesse que apresentam as investigações referentes a esse produto alimentício.

No intuito de melhorar os característicos físicos, químicos e organoléuticos das manteigas, adicionam-se, com frequência, culturas puras e selecionadas de certos microorganismos. Assim a contagem microscópica quantitativa global de todos os micróbios encontrados apresenta interesse relativo, da mesma maneira a análise bacteriológica quantitativa total proporciona poucos dados aproveitáveis para se avaliar do estado sanitário da manteiga.

Só a análise bacteriológica qualitativa é capaz de fornecer indicações úteis. Como "índices bacteriológicos" ou "germes de prova" foram escolhidos os cogumelos e as leveduras, germes esses normalmente presentes em quantidade pequena na manteiga adequadamente pausteurizada. A contagem desses microorganismos permite obter bom índice da qualidade sanitária da manteiga, conforme referem Mac e Richie². Esses autores admitem que a contagem dos cogumelos e das leveduras na manteiga serve como critério da eficiência da pasteurização e do estado sanitário das fábricas e usinas onde o creme e a manteiga são manipulados.

Na manteiga são pouco satisfatórias as condições para o crescimento dos microorganismos em geral. Essas más condições para o desenvolvimento dos microorganismos na manteiga foram postas em evidência por Hammer³ e são devidas ao fraco teor em lactose, ao elevado conteúdo de cerca de 90% de gordura relativamente resistente, ao baixo teor de umidade e à taxa de cloreto de sódio regularmente elevada nas manteigas salgadas.

(*) Trabalho apresentado e aprovado pela 1.^a Jornada Brasileira de Bromatologia.

Apesar destas condições desfavoráveis, alguns microorganismos conseguem se desenvolver sôbre a manteiga, acarretando modificações em seus característicos físicos, químicos e organoléticos e nas suas propriedades nutritivas. Dentre êsses microorganismos são justamente os cogumelos e as leveduras os principais responsáveis pelas alterações e decomposições da manteiga. Assim, os cogumelos quando crescem na superfície da manteiga, onde as exigências em oxigênio podem ser melhor satisfeitas, acarretam modificações no aspecto, no cheiro e no gôsto dêste alimento. Segundo escreve Hammer⁶: "Mold on butter is the cause of considerable loss because the moldy portion must be removed, this involving a decrease in weight and additional labor, and also because in influence of the mold growth on the flavor of the normal appearing portion. *In general, moldy butter is an indication of unsatisfactory methods of manufacturing and packing*".

Os tipos de cogumelos variam muito na aparência, no poder invasivo e produzem distintas substâncias capazes de influir na qualidade da manteiga. Algumas vêzes dois ou mais cogumelos podem crescer ao mesmo tempo exercendo influência mais pronunciada sôbre o carater da decomposição. No trabalho de Grimes, Cumins e Kennelly⁵, encontra-se extensa lista dos principais cogumelos isolados da manteiga e uma excelente descrição dos seus característicos morfológicos e culturais.

A atividade lipolítica e caseolítica dos cogumelos invasores exerce papel preponderante na qualidade da manteiga. Alguns dos cogumelos que crescem na manteiga produzem produtos que causam mau cheiro e mau gôsto, ao passo que outros não afetam os seus característicos organoléticos.

North e Reddish (ref. de Vandaveer e Wildman), examinando manteigas e cremes de boa qualidade, jamais encontraram mais de 5.000 oidios por cm³. Notaram haver inter-relação entre a presença de oidios em número considerável (50.000) e o emprêgo de cremes velhos ou deteriorados na manufatura da manteiga. Clarke (ref. idem) usando o método de Wildman¹⁰, chegou à conclusão de que devem ser encontrados sômente vestígios de filamentos micelianos na manteiga preparada com creme de boa qualidade, ao passo que a manteiga preparada com creme decomposto apresenta sempre grande quantidade de filamentos micelianos.

Adams e Parfit¹ observaram que a quantidade dos filamentos micelianos é bom índice da idade do creme empregado na fabrica-

ção da manteiga, e da temperatura em que o mesmo foi conservado antes de ser utilizado.

Em investigações realizadas sob os auspícios da Food and Drug Administration, no vale do Mississipi, Meyers, Pruitt e Slocum demonstraram que se a conservação era adequada, até 6 dias depois poderiam ser obtidos cremes isentos de cogumelos e, sem alteração dos característicos organoléticos, até 8.º dia. Tendo em conta essas observações, Vandaveer e Wildman⁹ investigaram sob o aspecto comercial, qual a importância do filamento miceliano na manteiga preparada com cremes de procedência conhecida.

Verificaram Vandaveer e Wildman⁹ que as manteigas preparadas com cremes velhos apresentam invariavelmente elevada porcentagem de filamentos micelianos donde a sua conclusão que: "*It is apparent that under conditions studied the mold mycelia count in butter reflects the age of the cream*".

Os fatores que influenciam o desenvolvimento do cogumelo na manteiga e no creme são muito variados, entre outros se destacam a temperatura, o tempo de conservação, a acidez, a lavagem frequente dos utensílios, as condições de mungidura do leite, a taxa de sal, a presença da caseína e o conteúdo em água.

O desenvolvimento do *Penicillium glaucum* é impedido no meio contendo 27% de cloreto de sódio e 83% de umidade relativa, ao passo que 12% de concentração de cloreto de sódio e 92% de umidade têm o mesmo efeito sobre o *Oidium lactis*. O salgamento da manteiga não previne o desenvolvimento dos esporos, apenas diminui a sua porcentagem. As espécies *Oidium*, *Alternaria* e *Cladosporium* em geral não se desenvolvem em manteigas com um teor de 2,5% de sal.

A prevenção deverá ser dirigida para o creme, pois é a origem de contaminação pelo cogumelo. Existe sempre relação estreita entre o conteúdo de filamentos micelianos da manteiga e a idade e a acidez do creme: "*A high mold mycelia count in butter, shows conclusively that decomposed or unfit cream was used*".

Tanto naquilo que se relaciona com o creme como com a manteiga os cogumelos são contaminantes muito prejudiciais porque decompõem as proteínas e as gorduras, produzindo produtos indesejáveis conforme verificaram Parfitt e Galema. Enfim, segundo

a opinião de Bouska²: “*One of the most undesirable germs in cream is the milk mold*”.

Assim, uma das preocupações do produtor deverá ser a de trabalhar com cremes isentos de cogumelos ou com taxa desprezível dos mesmos afim de conseguir manteigas com porcentagem pequena ou nula de filamentos micelianos. Além de alterarem as suas qualidades nutritivas, os cogumelos tornam a manteiga desprezível como substância alimentícia, pois a maioria dos consumidores têm repugnância natural pela manteiga “mofada”, o que acarreta prejuízos econômicos muito grandes, assim a condenação do produto é feita automaticamente pelo próprio consumidor.

As presentes investigações foram conduzidas com o fito especial de verificar a importância da presença do cogumelo e, se este deveria ser considerado como um constituinte natural e absolutamente inevitável do creme e da manteiga, como acontece com certos tipos de queijo.

Em extenso trabalho Wildman¹¹ investigou se poderiam ser obtidos cremes e manteigas isentos ou com porcentagem mínima de cogumelos. Tendo em conta as observações anteriores feitas por Greene⁴ sobre a aglomeração de cogumelos, Wildman empregou a solução de borax para dissolver o coalho de caseína da manteiga, corando as massas de cogumelos com o auxílio do azul de metileno.

Wildman¹² chegou à conclusão de que o desenvolvimento do cogumelo no creme é inevitável. A única distinção está entre a presença de alguns filamentos e de poucos esporos somente e a constatação de grandes quantidades dos mesmos.

A presença de grande quantidade de cogumelos pode provir tanto da contaminação do aparelho mal lavado e mal esquentado, como da contaminação de estábulo. A quantidade excessiva de cogumelos na manteiga também indica descuido no manêjo, falta de higiene, deficiência de refrigeração, período de armazenamento demasiado longo do creme e emprêgo de creme decomposto na fabricação da manteiga. O conteúdo em filamentos micelianos aumenta proporcionalmente nas amostras com característicos organoléticos condenáveis conforme escreve Wildman¹¹: “Data on this question show as a matter of fact the percentage of off — flavored samples increases as the mold mycelia content increase”.

A maior proporção das amostras de creme com característicos organoléticos anormais corresponde sempre a um aumento do teor de cogumelos nos mesmos. Quando são empregados êsses cremes.

com característicos organoléticos condenáveis, invariavelmente as manteigas obtidas de tais cremes apresentam contagens muito elevadas de filamentos micelianos.

Se os cremes ácidos e não pasteurizados não forem conservados em utensílios limpos e refrigerados o seu teor em cogumelos aumenta. O *ospora lactis*, cresce rapidamente nos resíduos de leite ou de creme deixados no vasilhame. O número de cogumelos que aí se encontra é sempre muito grande.

Sob o ponto de vista prático a maior fonte de contaminação é o uso de recipientes que não foram adequadamente lavados e escaldados e, nos quais, o creme tornou-se embolorado. A preocupação inicial deverá ser a de manter todos os utensílios e equipamentos em condições de limpeza a mais rigorosa possível. O creme deverá ser sempre conservado em temperatura abaixo de 20°C principalmente nos meses de verão. A adição de creme fresco duas vezes ao dia, com agitação completa, ao creme armazenado, tende a prevenir o desenvolvimento dos cogumelos contaminantes. A remessa frequente do creme para as cremerias ou a sua utilização o mais rapidamente possível é uma prática absolutamente recomendável. Essas recomendações já têm sido repetidas desde há muitos anos, e Wildman¹¹ cita mesmo o trecho de um artigo aparecido em 1850 no "Prairie Farmer":

"To make good butter there must be good cream. This would seem to be self evident; but it is frequently overlooked. A sweet and delicious article cannot be made of a bitter, or badly soured, or mixed cream; whether it is made so the keeping process previous to chunning".

É, pois, fato provado e perfeitamente estabelecido que jamais poderá ser obtida boa manteiga de um creme embolorado, envelhecido e mal conservado.

A taxa alta de gordura do creme é um fator de diminuição de seu teor em cogumelos, assim como o enchimento o mais completo possível dos latões destinados à remessa das grandes partidas de creme para as cremerias, concorre para diminuir os riscos do emboloramento.

Partindo do princípio perfeitamente estabelecido de que, quanto maior é a quantidade de filamentos micelianos na manteiga tanto pior é a sua qualidade, deverão ser empregados todos os cuidados afim de diminuir tôdas as possibilidades de contaminação ou que aumentem a quantidade dos filamentos micelianos. Uma das

vantagens principais do método de contagem dos filamentos micelianos é a possibilidade de dar informações sôbre a matéria prima empregada na fabricação da manteiga, permitindo assim o contrôlo retrospectivo do creme empregado.

Tôdas as vêzes que um creme embolorado for aproveitado na fabricação de manteiga, a mesma apresentará um alto teor em filamentos micelianos.

Sem um bom creme não poderá haver boa manteiga. Todo o creme embolorado é um creme deficiente sob o ponto de vista das condições de higiene, de colheita, de separação, de conservação e condenável sob o ponto de vista alimentício. O cogumelo se desenvolve tanto à custa das propriedades nutritivas do creme como da manteiga.

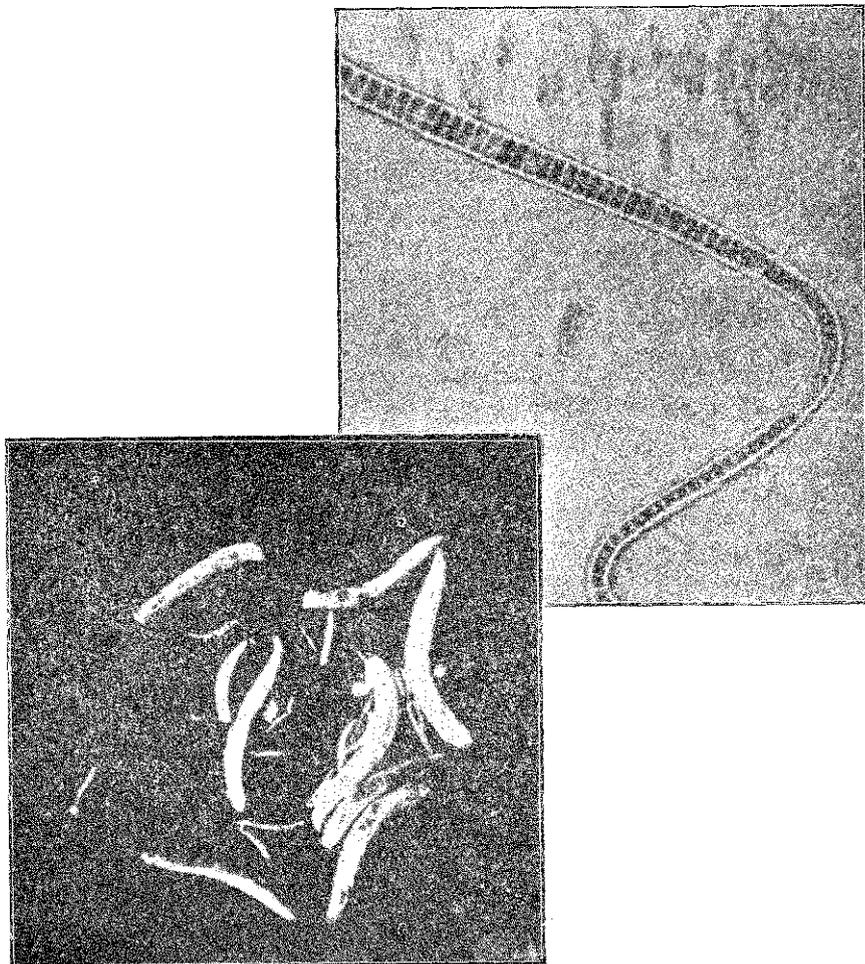
Investigamos detalhadamente o teor de filamentos micelianos nas manteigas do comércio, assim como qual a relação que poderia haver entre a idade da manteiga, as condições da sua conservação, de seu tipo e o seu teor em filamentos de cogumelos. Os resultados referentes a estas últimas investigações são relatados na parte experimental do presente trabalho.

SUJIDADES DA MANTEIGA

O exame microscópico da manteiga, permite também a verificação da presença de substâncias estranhas, de parasitas, de insetos e seus fragmentos. Essas sujidades da manteiga têm grande importância no contrôlo sanitário dêste produto. Com efeito, os pêlos de roedores, os fragmentos de excrementos de roedores, os insetos inteiros, os excrementos de insetos e os fragmentos do corpo de insetos e outras substâncias repugnantes, podem ser encontradas na manteiga oferecida ao consumo público. As sujidades podem ser encontradas mesmo nas manteigas de qualidade a melhor com referência à escala de classificação por pontos. De início a constatação das sujidades na manteiga produziram uma impressão muito forte. É o que se pode constatar lendo o número de setembro de 1935, pag. 441, da "Food Industries":

"Astonishing itens about butter have appeared in "Notices of Judgments" issued by the U. S. Department of Agriculture within the past twelve months.

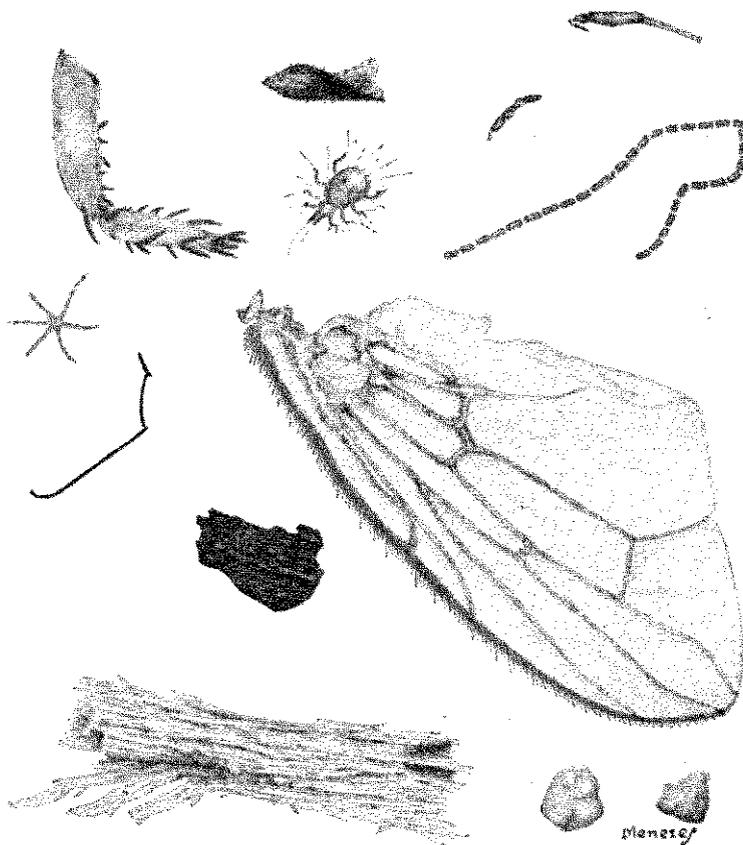
Butter, which most of us have heretofore regarded as the substance that gets into trouble only account of short-weight or too-high moisture content, has been repeatedly cited and condemned because the presence of filthy foreign matter".



Foram experimentados vários processos para o controle da verificação da presença de sujidades nas manteigas.

Os métodos comuns de flutuação com gasolina, clorofórmio e tetracloreto de carbono, comumente utilizados no exame das farinhas, não puderam ser empregados porque as impurezas encontradas na manteiga variavam muito em sua densidade.

Os métodos que consistiam simplesmente em dissolver a gordura da amostra e examinar o resíduo não dissolvido sob o microscópio, também esbarravam com a presença de caseína que, sendo um constituinte normal da manteiga e insolúvel nos solventes orgânicos, perturbava a pesquisa de qualquer substância estranha. Foi então utilizado nos ensaios dos vários métodos de contróle, a capacidade que tem o borax de dissolver a caseína. Verificou-se então que o borax dissolvendo a caseína não destruía as substâncias estranhas presentes na manteiga. O novo método devido a Greene⁴ consiste essencialmente no tratamento da manteiga por uma solução de borax quente, tornando solúvel a caseína coagulada e depois filtrando e lavando o resíduo. Por êste processo, as sujidades e outras matérias estranhas da manteiga são deixadas no papel de filtro onde podem ser facilmente examinadas e contadas ao microscópio.



Sujidades da manteiga (orig.).

TÉCNICAS EMPREGADAS

MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE COGUMELO NA MANTEIGA

Foi empregado o método da Microanalytical Division, descrito por Wildman¹⁰:

Aparelhos e reagentes:

- a) Colher de medição: colher de chá.
- b) Pipeta: 10 cm³.
- c) Solução de goma: Preparar um litro de uma solução a 0,75% de goma dragante, com 2% de formaldeído adicionado como preservativo. A goma seca deve ser previamente misturada, primeiro com 10-15 cm³ de álcool a 95% e agitando depois rapidamente com a quantidade suficiente de água. A solução deverá ser brandamente aquecida até a fervura, para expelir o álcool e o ar, sendo o aquecimento mantido por 25-30 minutos. Adicionar formaldeído e resfriar. Usar a solução clara sobrenadante, isenta de partículas, deixando repousar gradualmente os elementos celulares da goma.

Processo:

Deve ser feito cuidadoso exame prévio da superfície da manteiga, para verificar a ausência do desenvolvimento de cogumelos na mesma. Anotar-se-á qualquer crescimento visível de cogumelo. A fim de prevenir a possibilidade de contaminação não visível por cogumelo, deve-se raspar e rejeitar 3.8 milímetros da superfície

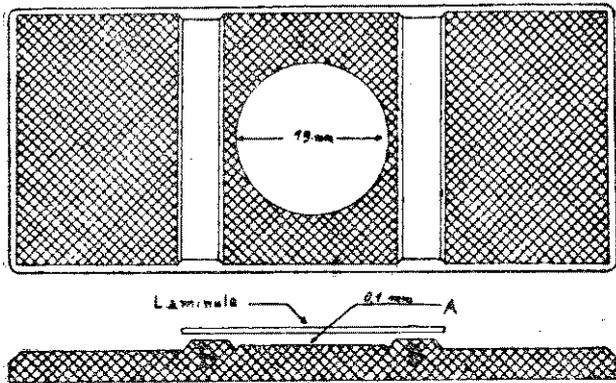
Pesar uma grama de manteiga por meio da colher de medida. Medir 7 cm³ da solução quente de goma e derramar 2 ou 3 cm³ sobre a colher que deverá estar sobre um bequer de 50 cm³. (Esta quantidade é geralmente suficiente para derreter a manteiga e fazê-la escoar-se no bequer).

Usar o resíduo dos 7 cm³ da solução quente para retirar a manteiga remanescente na colher.

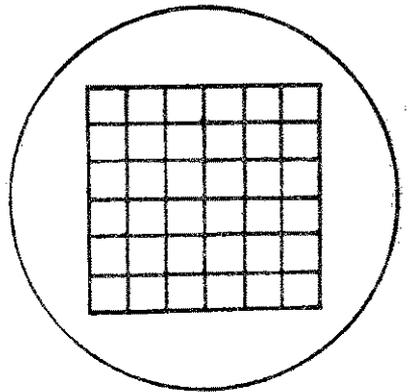
Agitar até que a solução fique bem misturada e os glóbulos de gordura alcancem 0,1-0,2 mm de diâmetro.

Colocar uma porção de mistura sôbre a lâmina de contagem do cogumelo e contar pelo método de Howard, de acôrdo com a técnica já descrita em nosso trabalho anterior³.

Anotar como campo positivo, sômente quando os comprimentos combinados dos dois filamentos mais longos excedem de 1/6 do diâmetro do campo. É aconselhável empregar o disco micrométrico de Howard.



Câmara de Howard



Disco micrométrico de Howard

MÉTODO PARA A VERIFICAÇÃO DE SUJIDADES SOB A FORMA DE INSETOS, E DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS ESTRANHAS NA MANTEIGA

O método da autoria de Greene⁴, da Food and Drug Administration, foi o empregado em nossas investigações.

Técnica: Pesar 100 g de manteiga em um bequer de 400 cm³. Adicionar à manteiga 150 à 200 cm³ de solução de borax (preparada pela dissolução de 40 g de borax em um litro de água; soluções alcalinas mais fortes não devem ser usadas porque destroem os pêlos). Aquecer sôbre platina aquecedora até à ebulição. Filtrar imediatamente através de um funil de sucção de Büchner de 7 cm³, munido com papel de filtro rápido, lavar o papel com gasolina para remover algum resíduo gorduroso e em seguida com água quente.

Quando a manteiga contém cogumelos, seja finamente divididos ou em grumos, os poros de papel podem ficar obstruídos; dessa maneira às vezes são necessários 10 papéis de filtro separados para filtrar uma amostra de manteiga extremamente embolorada.

Auxilia a filtração, uma tela de cobre circular, de 50 malhas, com 6,5 cm de diâmetro e ajustada ao fundo do funil. O papel é

então colocado sobre esta, o que permite ficarem o papel e a tela no centro, obturando perfeitamente e não permitindo a passagem de material algum em volta ou sob os ângulos. O papel pode ser umidecido com água para mantê-lo no lugar, antes de derramar a solução de manteiga no funil.

Pelo método acima descrito o coalho é transformado pela solução de borax, em um caseinato solúvel e, como consequência, a totalidade passa prontamente, não deixando depósito sobre o papel de filtro.

Quando a manteiga tem cogumelo, o mesmo fica retido sobre o papel de filtro seja finamente dividido ou em grandes aglomerações que, algumas vezes, assemelham-se ao coalho insolúvel; êsses filamentos micelianos devem ser raspados e colocados entre lamínula e lâmina sob o microscópio, com uma gota de óleo ou glicerina comprimindo-se ligeiramente.

Os bordos do funil de Büchner são examinados afim de certificar, que nenhum cogumelo, inseto ou outra substância estranha ficou aí retida. Em relação ao material suspeito como cogumelo, é necessário às vezes observar os característicos diferenciais entre cogumelo e papel, porque fragmentos dêste último podem ser também encontrados ocasionalmente. Deve ser notado que em alguns casos é obtido um resíduo viscoso sobre os papéis de filtro, sendo necessário fazer preparações com pequena porção de substância examinada. Deve-se tomar esta precaução devido ao fato de que algumas vezes êsses resíduos são formados de coágulos na sua maior parte e com poucos cogumelos. Esta precaução permite evitar equívocos.

O papel de filtro é examinado com o microscópio binocular de campo grande, com lentes dando ampliações de aproximadamente 15-20x. Uma ampliação mais baixa pode ser empregada para encontrar larvas mas a de 20x é recomendada para outros materiais. Os pêlos, os fragmentos de insetos e outras contaminações, exceto cogumelos, podem ser removidos com uma agulha e colocados em uma gota de glicerina sobre uma lâmina e recobertos com lamínula para exames ulteriores mais minuciosos.

As etapas principais do método de Greene são:

1 — Colocam-se 100 g da manteiga a ser examinada em um bequer de 400 cm³.

2 — Adicionam-se 150-200 cm³ de solução filtrada de borax.

3 — Aquece-se em um bico de gás ou em uma platina aquecedora até à ebulição, continuando-se a ferver durante 3 minutos exatos.

4 — Filtra-se por sucção em um funil de Büchner de 7 cm³, provido de um papel de filtro grosso. Lava-se o bequer e o papel cuidadosamente com a solução fervente de borax.

5 — Examina-se o papel com um microscópio binocular de fraco aumento de cêrca de 20 vêzes.

6 — Anota-se todo o material encontrado inclusive cogumelos. se fôr verificada a sua presença.

NOTAS

Para auxiliar a filtração, uma tela de cobre cortada com cêrca de 6 cm³ de diâmetro, mantém o papel no fundo do funil. O papel pode ser umidecido com água antes de se colocar a solução.

O cogumelo é geralmente encontrado em aglomerados semelhantes a grumos não dissolvidos. A sua diferenciação pode ser feita colocando-se uma pequena quantidade do material grumoso retido no papel de filtro, sôbre uma lâmina e misturando cuidadosamente com uma ou duas gôtas de uma solução de ácido hidrocloreídrico a 10%, antes de cobrir com a lamínula; desta maneira pode ser evitada a confusão entre filamentos de cogumelos e fibras de papel.

O cogumelo é expresso em unidades; cada unidade tendo uma área de 12,70 milímetros x 12,70 milímetros ou sejam 6,35 milímetros quadrados.

Os pêlos e outros materiais que necessitam de grande aumento para sua exata identificação, podem ser removidos com uma agulha e colocados sôbre uma lâmina, em uma gôta de glicerina.

Se os cogumelos são encontrados em quantidades que necessitam vários papéis para filtrar as 100 g da amostra e, se além d'isso, fôr verificado que outros contaminantes podem estar mascarados, substitue-se a solução de borax pela mesma quantidade de solução de ácido hidrocloreídrico a 2%, fervendo-se a mistura por 3 minutos.

Geralmente o cogumelo desaparece e se há outras matérias estranhas, estas são logo demonstradas.

As experiências feitas por J. D. Wildman da "Microanalytical Division", demonstraram a necessidade da fervura durante 3 minutos, para assegurar completa destruição dos cogumelos.

MÉTODO PARA MEDIR O NÚMERO DE UNIDADES DE COGUMELO NA MANTEIGA

O processo de Hodges⁷ permite medir, sôbre o papel de filtro, o número de unidades de cogumelos encontradas na manteiga.

Processo: A manteiga é tratada de acôrdo com o processo descrito no método de Greene⁴:

1) Os grupos de cogumelos espalhados sôbre o papel de filtro, são reunidos em u'a massa com espátula pequena.

2) Com o auxílio da espátula essa massa é aplainada dentro de uma depressão com um milímetro aproximadamente; o cogumelo é prensado para baixo firmemente. Se houver mais de um papel de filtro, todos os papéis devem ser tratados separadamente.

3) Com uma régua, medir o número de polegadas quadradas ou frações na área coberta pelo cogumelo e computar o número de unidades em tôdas as amostras.

4) Cada 6,35 milímetros quadrados — uma área de 12,70 milímetros por 12,70 milímetros — coberta pelo cogumelo, equivale à uma unidade.

5) Deve-se tomar precaução para não dilacerar o papel de filtro quando se reunir o cogumelo.

6) Antes de medir o cogumelo encontrado é necessário examinar primeiramente o papel de filtro para determinar a presença de outras matérias estranhas, tais como: pêlos, fragmentos de insetos, etc.

RESULTADOS

Foram examinados nos Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz, cêrca de 260 amostras de manteigas. Essas amostras foram examinadas tendo em consideração o acondicionamento, o tipo, e a procedência da manteiga.

I — *Quanto ao acondicionamento* — 349 amostras eram empacotadas e 11 amostras eram enlatadas.

II — *Quanto ao tipo* — 216 amostras eram de manteiga fresca de primeira, 39 amostras eram de manteiga fresca de segunda, 47 amostras eram de manteiga fresca de terceira; 32 amostras eram de manteiga salgada de primeira, 15 amostras eram de manteiga salgada e 11 amostras eram de tipo extra.

III — *Quanto à procedência* — 94 amostras eram estrangeiras e 226 eram brasileiras. Entre essas últimas, 238 amostras eram paulistas e 21 amostras eram de outros Estados do Brasil.

Examinando os resultados totais obtidos verificamos que:

a) *Quanto ao número de campos microscópicos positivos contendo cogumelos ou seus filamentos a porcentagem total foi de 35,8%.* Essa porcentagem global não é má. Porém, é de se lamentar termos encontrado amostras de manteiga com até 84% de campos microscópicos positivos, embora tivéssemos também outras com 14%;

b) *quanto ao número médio total de substâncias estranhas por 100 g de manteiga:* este foi de 1545;

c) *quanto à presença de parasitos ou insetos:* 10% das amostras examinadas, ou sejam 36 amostras em 360, revelaram a presença de parasitos ou insetos.

I — *Quanto ao acondicionamento:*

1.º) Entre as manteigas empacotadas foram encontrados 35,5% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos.

O número médio de substâncias estranhas por 100 g de manteiga foi de 1525.

Trinta e três das 349 amostras de manteiga empacotada ou seja 9,4% das amostras, demonstraram a presença de parasitos ou insetos.

2.º) Entre as manteigas enlatadas, 32% dos campos microscópicos apresentavam filamentos de cogumelos.

O número médio de substâncias estranhas por 100 g foi de 209.

Três das 11 amostras de manteiga enlatada ou seja 27,2% das amostras demonstraram a presença de parasitos ou insetos.

II — *Quanto ao tipo:*

1º) Entre as manteigas frescas de primeira, foram encontrados 32,2% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos.

O número médio de substâncias estranhas por 100 g de manteiga foi de 127.

Das 216 amostras examinadas 24 ou seja 11,11% demonstraram a presença de parasitos ou de insetos.

2.º) Entre as manteigas frescas de segunda foram encontrados 40,5% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos.

O número médio de substâncias estranhas por 100 g de manteiga foi de 167.

Sòmente uma das 39 amostras de manteiga fresca de segunda, demonstrou a presença de parasitos ou insetos.

3º) Entre as manteigas frescas de terceira foram encontrados 44,4% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos.

O número médio de substâncias estranhas por 100 g de manteiga foi de 125.

Nenhuma das amostras analisadas demonstrou a presença de parasitos ou insetos.

4º) Entre as manteigas salgadas de primeira foram encontrados 35,6% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos.

O número médio de substâncias estranhas por 100 g de manteiga foi de 202.

Das 32 amostras de manteiga salgada de primeira, 8 ou seja 25% demonstraram a presença de parasitos ou insetos.

5.º) Entre as manteigas salgadas de segunda foram encontrados 44,2% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos.

O número de substâncias estranhas foi de 175 por 100 g de manteiga.

Das 15 amostras de manteiga salgada 2 ou seja 13,3% demonstraram a presença de parasitos ou insetos.

6º) Entre as manteigas extras foram encontrados 39,5% de campos microscópicos positivos.

O número de substâncias estranhas foi de 39 por 100 g de manteiga.

Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de parasitos ou insetos.

III — *Quanto à Procedência*

1º) Entre as manteigas estrangeiras examinadas foram encontrados 22,2% de campos microscópicos positivos.

O número de substâncias estranhas foi de 61 por 100 g de manteiga.

Nenhuma das amostras analisadas apresentou parasitos ou insetos.

2º) Entre as amostras nacionais examinadas foram encontrados 41,2% de campos microscópicos positivos, sendo que entre as paulistas 40,4% e entre as manteigas de outros Estados 42% dos campos microscópicos estavam positivos.

O número médio de substâncias estranhas foi de 1922 por 100 g de manteiga analisada, sendo para as paulistas 185 e de outros Estados 200.

Das 226 amostras de manteiga nacional analisadas, 35 ou seja 12% demonstraram a presença de parasitos ou insetos, sendo que as paulistas a proporção foi de 13,4% e de outros Estados a proporção foi de 10,7%.

3º) Entre as 226 amostras de manteiga nacional examinadas foram verificadas as seguintes proporções:

Com 0% campos microscópicos positivos	0%
Entre 1 a 10% campos microscópicos positivos ...	0%
Entre 11 a 20% campos microscópicos positivos ...	31%
Entre 21 a 30% campos microscópicos positivos ...	18,49%
Entre 31 a 40% campos microscópicos positivos ...	31,32%
Entre 41 a 50% campos microscópicos positivos ...	34,32%
Entre 51 a 60% campos microscópicos positivos ...	9,81%
Entre 61 a 70% campos microscópicos positivos ...	1,88%
Entre 71 a 80% campos microscópicos positivos ...	0,37%
Entre 81 a 90% campos microscópicos positivos ...	0,37%
Entre 91 a 100% campos microscópicos positivos ...	0%

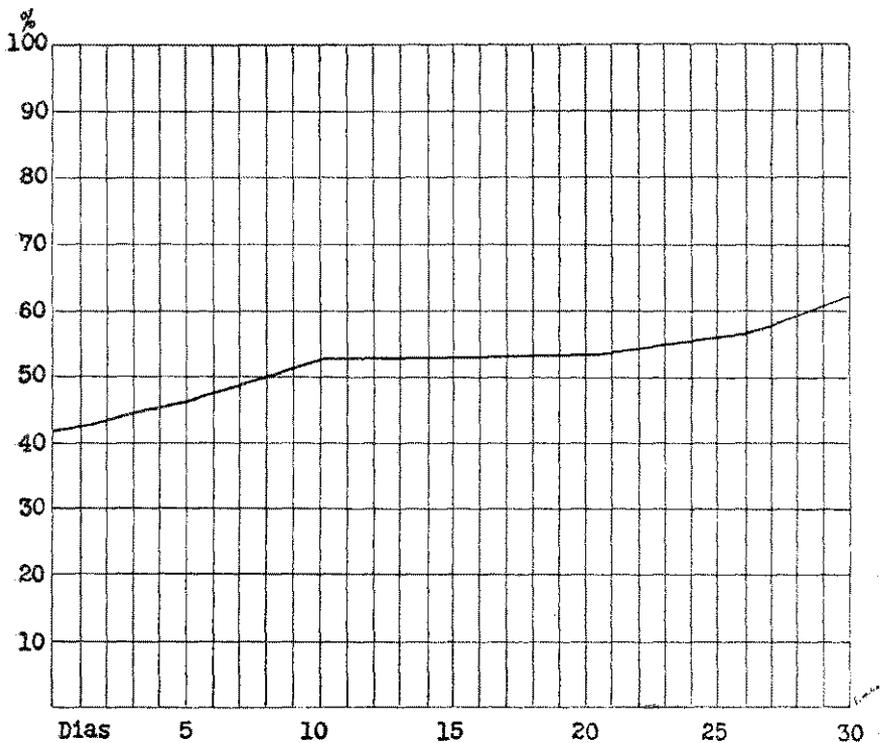
PARTE EXPERIMENTAL

Com o fim de comprovar exatamente se o envelhecimento acarretava aumento de número de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos, examinamos várias manteigas frescas e salgadas conservadas na geladeira e na temperatura ambiente. Foi também examinada a manteiga fresca conservada sob salmoura, com trocas frequentes desta salmoura, como é hábito em muitos estabelecimentos que vendem êsse produto no varejo, assim como um hábito doméstico muito difundido no Brasil.

Os gráficos abaixo dão exata noção dos resultados obtidos.

1º) *Manteiga fresca conservada em temperatura ambiente:*

GRÁFICO I

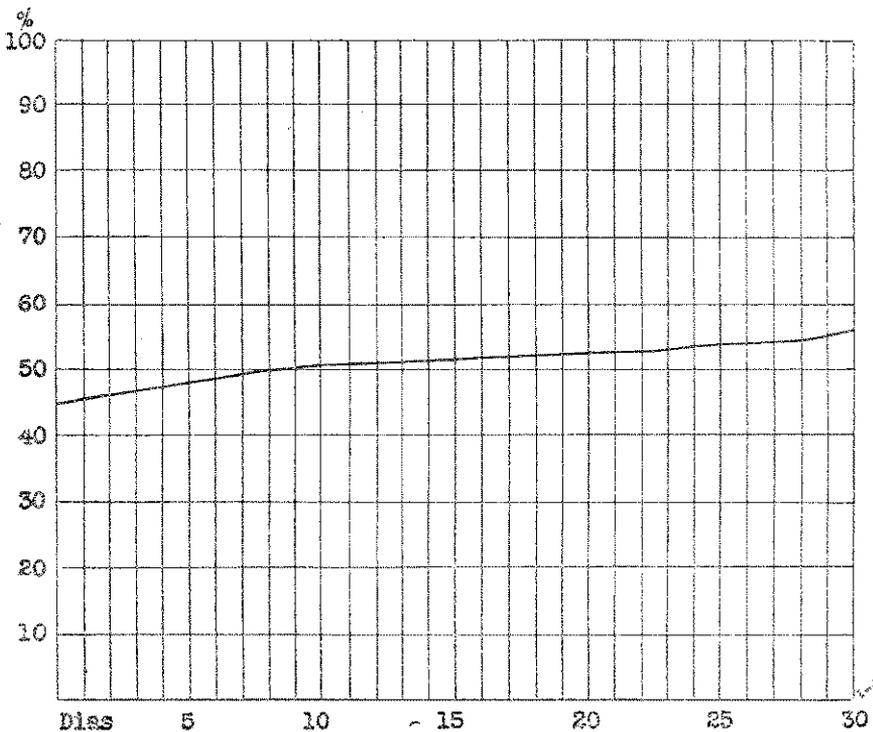


Analisando o gráfico acima notamos que a porcentagem de campos microscópicos positivos que era inicialmente de 42,3%, pas-

sou a 46,6%, 5 dias após; a 52%, 10 dias após; a 53,3% 20 dias após e a 63%, 30 dias após, havendo assim um aumento com relação à contagem inicial. Donde se pode concluir que na manteiga fresca conservada em temperatura ambiente, o número de campos microscópicos positivos aumenta com a idade.

2.º). *Manteiga fresca conservada em geladeira:*

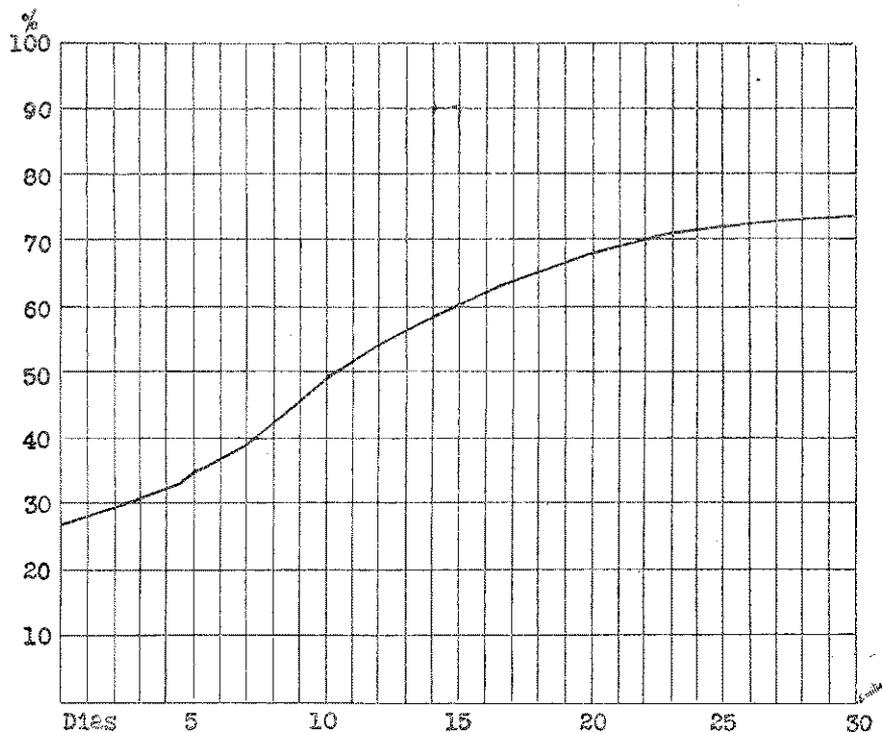
GRÁFICO II



Analisando o gráfico acima verificamos que na manteiga fresca e conservada na geladeira, a porcentagem de campos microscópicos positivos que inicialmente era de 45,6%, passou após 5 dias a 48,5%; 15 dias após a 51,3%; 20 dias após 52,3% e 30 dias depois a 56,6%. Donde se pode concluir que na manteiga fresca conservada em geladeira, o número de campos microscópicos positivos aumenta com a idade, ligeiramente menos que quando conservada em temperatura ambiente.

3º) *Manteiga salgada conservada na temperatura ambiente:*

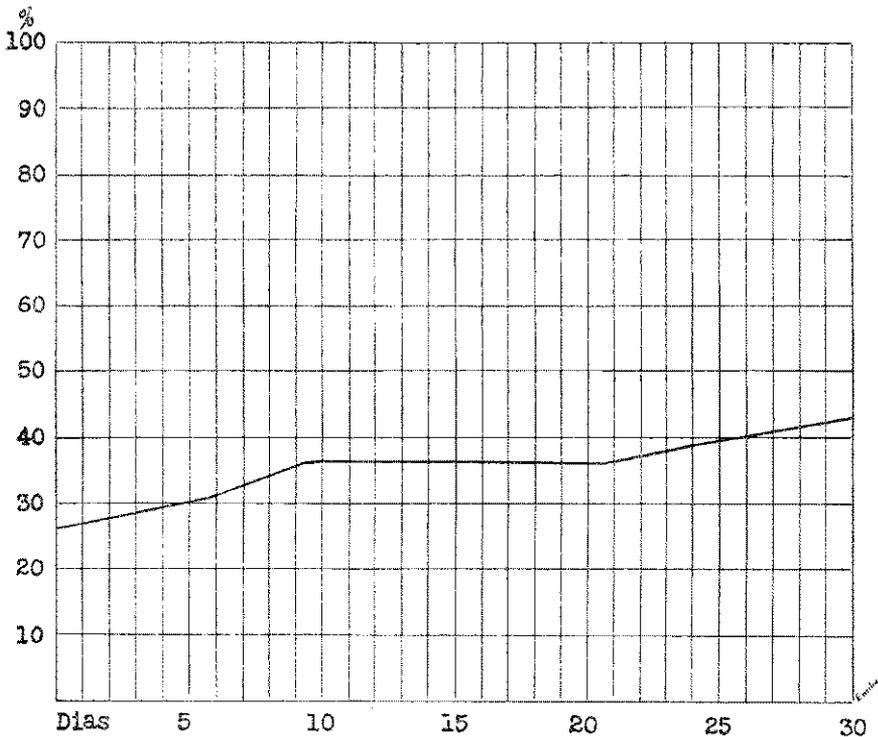
GRÁFICO III



Analisando o gráfico acima verificamos que os campos microscópicos examinados para a pesquisa de filamentos micelianos, demonstraram inicialmente 26,8% de positividade, passaram a 35,6% após 5 dias; a 50% após 10 dias; a 68,8% após 20 dias e a 75,6% após 30 dias. Houve, assim, um forte aumento em relação à contagem inicial. Donde se pode concluir que na manteiga salgada conservada em temperatura ambiente, o número de campos microscópicos positivos aumenta fortemente com a idade.

4º) *Manteiga salgada conservada na geladeira:*

GRÁFICO IV



Analisando o gráfico acima verifica-se que o número de campos microscópicos positivos, que inicialmente era de 26,8% passou a 36,4% após 5 dias, a 36,8% após 10 dias; após 20 dias não havia aumento do número dos campos microscópicos positivos que se conservavam em 36,8% e após 30 dias de permanência na geladeira, o número dos campos positivos subiu a 43,6%, havendo, pois, um fraco aumento em relação ao teor original de campos microscópicos positivos.

5.º) *Manteiga fresca conservada sob salmoura frequentemente trocada e na temperatura ambiente.*

Verificamos que o número de campos microscópicos positivos, que inicialmente era de 36%, passou, após 30 dias a 60%.

6.º) *Manteiga fresca conservada sob salmoura frequentemente trocada e na geladeira.*

O número de campos microscópicos que apresentava filamentos micelianos inicialmente de 36% passou a 38% após 30 dias. Assim a contagem dos filamentos micelianos, dá noção bastante segura da idade da manteiga e das condições de sua conservação, além das informações precisas que fornece sobre a idade do creme e das condições em que êste foi conservado.

Os menores aumentos foram verificados com as manteigas adequadamente conservadas na geladeira. Entre as manteigas conservadas na geladeira, as manteigas salgadas revelaram muito menor aumento de campos microscópicos positivos do que as manteigas frescas. Porém as manteigas salgadas e conservadas na temperatura ambiente foram as que apresentaram os mais altos índices de emboloramento após 30 dias.

O processo de conservação que resultou mais favorável para prevenir o emboloramento, foi o processo largamente difundido no Brasil e que consiste em conservar a manteiga em geladeira e mantida sob salmoura, frequentemente trocada. Após 30 dias o índice de emboloramento da manteiga conservada nestas condições, era praticamente desprezível.

CONCLUSÕES

1.º) Utilizando as técnicas para contróle de cogumelos, substâncias estranhas, parasitos e insetos em manteigas, procurou-se verificar o estado sanitário desse produto.

2.º) Foram examinadas 360 amostras de manteigas nacionais e estrangeiras.

3.º) Em relação ao contróle de cogumelos, verificou-se que a maior proporção foi de 35,8% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos. As taxas oscilaram entre um mínimo de 14% e um máximo de 84% de campos microscópicos positivos com filamentos micelianos.

4.º) Em relação as substâncias estranhas o número médio foi de 1545 por 100 g de manteiga examinada.

5.º) Em relação aos parasitos e insetos 10% das amostras examinadas demonstraram a presença dos mesmos.

6.º) Os dados obtidos demonstram que certos cremes empregados apresentam deficiência quanto às condições de colheita, de separação, de conservação e de higiene em geral.

7.º) O processo doméstico mais favorável para prevenir o emboloramento da manteiga é o de conservá-la em geladeira sob salmoura frequentemente trocada.

CONCLUSIONS

1st. — An attempt was made to determine the sanitary state of butter by employing technics for the control of foreign bodies, fungi, parasites and insects in this food-substance.

2nd. — 360 samples of national and foreign butter were examined.

3rd. — With regard to the control of the fungi the largest proportion was 35,8% positive microscopical fields with filaments of mycellia. The rates varied from a minimum of 14% to a maximum of 84% positive microscopical fields with filaments of mycellia.

4th. — With regard to the foreign bodies the average number was 1545 per 100 grms of butter examined.

5th. — Regarding the parasites and insects 10% of the samples examined showed parasites and insects.

6th. — The data collected gave evidence that certain creams in use are deficient as to the methods of collection, separation, preserving, of hygiene in general.

7th. — The most favorable domestic measure for preventing butter from becoming stale is to keep it in the ice-chest in salt-water, which could be frequently chanfed.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ADAMS, J. e PARFITT, E. H. — 1939 — *Journ. Dairy Sc.*, 22: 367.
- 2 — BOUSKA, F. W. — 1930 — *New York Produce Review and American Creamery*, 69: 520.
- 3 — SOUTO, A. Buller e GODOY, O. — 1942 — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2: 100.
- 4 — GREENE, W. S. — Examination of Butter. Microanalytical Division of Food and Drug Administration, Ed. Washington, s/d.
- 5 — GRIMES, M., CUMMINS, H. A. e KENNELLY, H. — 1934 — *Le lait*, 12: 899.
- 6 — HAMMER, B. W. — 1937 — *Dairy Bacteriology*, 2.^a ed., John Wiley and Sons ed., London.
- 7 — MACY, H. e RICHIE, H. B. — 1929 — *Journ. Dairy Products*, 12: 351.
- 8 — PARFITT, E. J. e GALEMA, M. L. — 1931 — *Am. Creamery and Poultry Produce Review*, 71: 462.
- 9 — VANDAVEER, R. L. e WILDMAN, J. D. — 1940 — *Journ. Ass. Off. Agric. Chemist*, 33: 693.
- 10 — WILDMAN, J. D. — 1937 — *Journ. Ass. Off. Agric. Chemist*, 20: 93.
- 11 — WILDMAN, J. D. — 1939 — Mold in Commercial Cream and Butter, Microanalytical Division of Food and Drug Administration, Ed. Washington.
- 12 — WILDMAN, J. D. — 1938 — Mold in cream and it is detection, Microanalytical Division of Food and Drug Administration, Ed. Washington.

ESTUDO MORFOLÓGICO E QUANTITATIVO DO MÉTODO DE HALBERG NA COLORAÇÃO DO BACILO DA LEPROSA.

GUILHERME V. CURBAN
Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

I. INTRODUÇÃO

Halberg¹, em 1939, apresentou um novo método de coloração do bacilo de Koch.

Reenstierna² empregou o método de Halberg na coloração do bacilo da lepra, e apresentou o resultado de suas pesquisas iniciais em nota anexa ao trabalho de Halberg, prometendo uma nota futura mais detalhada à propósito do assunto. No presente trabalho, vimos comunicar os resultados de nossas observações pessoais sobre o método de Halberg na coloração do bacilo da lepra.

II. MÉTODO DE HALBERG

Consta de três operações: a) coloração do bacilo; b) descoloração, ou prova de ácido resistência; c) contra coloração, ou coloração de fundo.

a) *Coloração*. — A coloração dos bacilos no método de Halberg, é realizada com uma solução de Nachtblau, cuja fórmula é a seguinte:

N.º 1 — Nachtblau (Grübler & Cia.)

1) Solução alcoólica saturada de Nachtblau	10	cm ³
(5 grs. de Nachtblau em 100 cm ³ de álcool a 95%)		
2) Fenol liquefeito	2,5	cm ³
3) Hidrato de potássio a 10%	0,2	cm ³
4) Água destilada	100	cm ³

Modo de preparar a solução de Nachtblau: dissolve-se o hidrato de potássio na água destilada e depois adiciona-se o fenol, e quando este estiver dissolvido, junta-se a solução saturada de Nachtblau.

As lâminas contendo esfregaços do material a pesquisar previamente secos o ar e fixados à chama, são inteiramente recobertas com a referida solução. A seguir, procede-se ao aquecimento das mesmas até o desprendimento de vapores, evitando a fervura. Esta operação é repetida várias vezes durante 5 minutos. Deixa-se a preparação esfriar, permanecendo a solução corante em contacto com o esfregaço durante mais 5 minutos. Isto feito, lança-se fora o corante.

b) *Prova de ácido resistência.* — A descoloração do esfregaço é feita com a seguinte solução:

- | | |
|---------------------------------|---------------------|
| 1) Ácido clorídrico à 25% | 3 cm ³ |
| 2) Álcool à 70% | 100 cm ³ |

Este líquido é colocado sobre a lâmina, retirado e substituído o número de vezes necessário a que não mais contenha traços de cor azul própria do corante. A seguir, a lâmina é lavada em água corrente.

c) *Coloração de fundo.* — Quatro contra corantes podem ser usados nesta operação:

- | | |
|---|---------------------|
| a) Vermelho neutro (Kahlbaum extra) | |
| 1) Vermelho neutro | 0,1 gr. |
| 2) Ácido acético a 1% | 0,2 gr. |
| 3) Água destilada | 100 cm ³ |
| b) Pironina | |
| 1) Pironina | 0,25 gr. |
| 2) Fenol cristalizado | 0,50 gr. |
| 3) Água destilada | 100 cm ³ |
| c) Fucsina fenicada | |
| 1) Solução concentrada de fucsina concentrada | 5 cm ³ |
| 2) Água destilada | 100 cm ³ |
| d) Vesuvina (Bismarckbraun) | |
| 1) Vesuvina | 2 gr. |
| 2) Água destilada | 100 cm ³ |

A solução escolhida é colocada sobre a lâmina, devendo permanecer um espaço de tempo que varia segundo a solução escolhida; 5 a 10 segundos para o vermelho neutro, fucsina e vesuvina, 30 a 60 segundos para a pironina.

O bacilo da tuberculose, e também o da lepra como o verificou Reenstierna, tomam uma côr azul escura, ao passo que os outros elementos e germes não ácido resistentes tomam a côr do contra corante. Halberg refere as seguintes vantagens apresentadas por êste método na preparação de materiais tuberculosos. Os bacilos aparecem maiores e mais distintos, são mais fáceis de encontrar, e parecem ocorrer em maiores números do que nos esfregaços correspondentes, corados pelo método de Ziehl.

Refere também o encontro de um fungo de tipo oídio, sob a forma de ramos micelianos ou formas celulares ovóides, redondas ou piriformes. O encontro destas formas vem sendo, desde 1912, verificado por Reenstierna em preparações de material leproso, preparadas por outros métodos, sendo também encontradas por êle nas preparações feitas com o método de Halberg.

III. OBSERVAÇÕES PESSOAIS

Em nossas observações, procuramos estudar o emprêgo do método de Halberg na coloração do bacilo da lepra, e analisar, o quanto possível, se as vantagens por êle obtidas nas preparações de materiais tuberculosos ocorriam também pelo emprêgo do seu método em material leproso.

Trabalhamos com esfregaços de material, colhido segundo a técnica habitual de escarificação, de lesões cutâneas de vários tipos morfológicos de 32 doentes de lepra lepromatosa internados no "Sanatório Padre Bento".

a) *Observações morfológicas com o método de Halberg na coloração do bacilo da lepra.* — Nos esfregaços preparados com o método de Halberg (usamos como contra corante o vermelho neutro, Grüber & Co.), os bacilos da lepra apresentaram-se como bastonetes de dimensões variáveis e de coloração azul escura, isolados e dispersos e também aglomerados em formações de glóbulos ou em paliçada (fig. 1). Os elementos não ácido-resistentes, germes, células epiteliais e leucocitos, tomaram a côr do contra corante (fig. 2). Em algumas preparações foram observadas bem nítidas formas vacuolares, difteroides e aspectos granuloses, assim como bacilos de aspecto recurvado (fig. 3).

Quanto às formas de fungo descritas por Reenstierna, nossa nenhuma experiência sôbre elas nada nos permite afirmar, embora

possamos dizer que poucas vezes encontramos formações que se assemelhavam aos elementos descritos por Reenstierna, mas sobre cuja natureza nada pudemos decidir (fig. 4).

b) *Tentativa de estudo comparativo quantitativo entre o método de Halberg e o método de Gabbet.* — Estudamos a questão relativa à eficiência do método de Halberg na coloração do bacilo da lepra, confrontando-o com um método de reconhecida eficiência, classicamente usado e adotado neste Instituto: o método de Gabbet.

Para tanto, procedemos a uma tentativa de comparação quantitativa entre estes dois métodos. Preliminarmente, devemos dizer que desta tentativa não se pode esperar um êxito absoluto, por não ser possível atenuar causas de erro insuperáveis, capazes de influenciar de maneira decisiva os resultados.

Em primeiro lugar, o material com que foi feita esta tentativa não apresenta um requisito primordial para comparação quantitativa, que é a homogeneidade de conteúdo bacilar e nem era possível conseguí-lo por meio de homogeneização.

Não sendo cultivável o bacilo da lepra, não se podem obter suspensões de cultura, que é um recurso empregado para obtenção de material com certa homogeneidade de conteúdo bacilar.

Nem são aplicáveis processos de homogeneização a material colhido de lesão cutânea, com cujos esfregaços tínhamos de trabalhar.

Tudo o que foi possível fazer, consistiu unicamente em observar o maior rigor na seleção da procedência do material a ser estudado. Assim, na tentativa de confronto, todas as comparações foram procedidas entre uma preparação feita pelo método de Halberg e outra feita pelo método de Gabbet, com material colhido por uma mesma escarificação de uma mesma lesão de um doente.

Procuramos evitar, dessa forma, as diferenças de teor bacilar que podem existir entre as várias lesões de um doente, ou ainda variações do teor bacilar que podem ocorrer em uma mesma lesão em consequência de alterações próprias da moléstia: involução, surtos reacionais.

Erros em que se incorreria, se o material fosse colhido de lesões diferentes de um doente, ou da mesma lesão de um doente, porém em épocas diferentes.

Além do que, deve ser levada em conta a tendência própria e natural do bacilo da lepra a se aglomerar, o que concorre para maior diversidade de distribuição do conteúdo bacilar do material, nos vários campos de um esfregaço.

Quanto às causas de erro decorrentes da preparação dos esfregaços, tomamos unicamente as precauções usuais no sentido de evitar insuficiente fixação ou queima de material.

Sucedee também que, apesar de todos os cuidados tomados, a coloração não é uniforme em tôda a extensão do esfregaço, havendo no mesmo, campos insuficientemente corados.

Tôdas estas causas de erro, deviam, por fim, ser atenuadas pelo recurso de contagem de germes no maior número de campos microscópicos do esfregaço. Uma dificuldade especial de contagem, surgiu na consideração das glóbias, cujo número real de germes não pode ser contado. Contâmo-las em separado, e também em conjunto com os germes e atribuímos a uma glóbia o valor correspondente ao de um germe, por analogia às recomendações de Neisser e Klein³ em casos de acúmulos de germes.

1) Material pesquisado: trabalhamos com material colhido, segundo a técnica habitual de escarificação, de lesões cutâneas de vários tipos morfológicos de 32 doentes de lepra lepromatosa, internados no "Sanatório Padre Bento". Do material colhido por uma mesma escarificação de uma mesma lesão de um doente, eram feitos dois esfregaços, dos quais um era corado pelo método de Halberg e outro pelo método de Gabbet.

2) Coloração dos esfregaços: método de Halberg foi realizado segundo a técnica descrita na primeira parte deste trabalho. O método de Gabbet foi realizado conforme a técnica usada no Instituto, e que passamos a descrever.

Método de Gabbet. — Na coloração do bacilo é usada uma solução corante de fucsina cuja fórmula é a seguinte:

Fucsina básica	1,0 gr.
Álcool absoluto	10,0 cm ³
Solução de ácido fênico a 5%	90,0 cm ³

Modo de preparar: triturar a fucsina e ajuntar o álcool. Quando a fucsina estiver dissolvida, acrescentar a solução de ácido

fênico. Agitar. Deixar em repouso algumas horas. Filtrar em papel.

As lâminas que contém esfregaços de material a ser pesquisado, previamente secos ao ar e fixados à chama são recobertas com a referida solução. À seguir, procede-se ao aquecimento da solução corante, por sucessivas passagens sob a lâmina, da chama do bico de Bunsen, até o desprendimento de vapôres.

Este aquecimento é repetido várias vezes, durante cinco minutos. Deixa-se então a solução corante resfriar, sendo depois lançada fora e a lâmina lavada em água corrente.

Descoloração do bacilo e coloração de fundo: nestas duas operações realizadas a um só tempo, é utilizada a seguinte solução:

Azul de metileno	1,0 gr.
Ácido sulfúrico concentrado	25,0 cm ³
Água destilada	75,0 cm ³

Modo de preparar: Diluir o ácido sulfúrico em água. Resfriar e dissolver o azul de metileno. Filtrar em papel.

As lâminas, previamente coradas pela solução de fucsina e lavadas em água corrente, são recobertas pela solução ácida de azul de metileno, que é lançado fora, quando é verificado no esfregaço a coloração própria da fucsina. Lava-se então em água corrente e seca-se.

3) Técnica de contagem: Os esfregaços eram examinados com objetiva de imersão em óleo de cedro e ocular Spencer 10x. Eram contados os germes e as glóbias contidos em um campo, num total de 100 campos, em cada preparação. Nas preparações em que em 100 campos 1 ou nenhum germe era contado, a contagem foi realizada em toda a extensão do esfregaço.

4) Comparação quantitativa: Para comparação quantitativa entre os métodos de Halberg e Gabbet, levamos em conta o número de germes e de glóbias contados e o número de campos em que foram contados em cada esfregaço. Além do que, traduzimo-los no valor correspondente na escala de Gaffky. De um mesmo material eram postos em confronto os valores numéricos absolutos e relativos acima referidos, obtidos no esfregaço corado pelo método de Halberg e em seu correspondente corado pelo método de Gabbet.

O confronto geral vem expresso na tabela seguinte:

TABELA GERAL DA COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DOS MÉTODOS DE HALBERG E GABBET

Material			N.º de campos	N.º de germes		N.º de glóbulos		Escala de Gaffky	
N.º	Pron.	Iniciais		Halberg	Gabbet	Halberg	Gabbet	Halberg	Gabbet
1	10	G. I. M.	100	24	99	5	5	2	3
2	645	J. R.	100	827	634	21	40	6	6
3	646	E. M.	T	2	4	0	0	1	1
4	224	A. M.	100	3	235	0	9	1	4
5	471	J. T. S.	100	16	18	3	0	4	4
6	131	J. R.	T	1	3	0	0	1	1
7	570	J. Z.	100	159	746	23	92	4	6
8	596	L. B. L.	100	345	457	78	60	5	5
9	692	H. R.	100	122	174	9	10	3	4
10	173	O. F. G.	100	159	157	35	16	4	4
11	724	C. M.	100	63	17	9	1	2	2
12	36	I. O.	T	6	2	0	0	1	1
13	359	J. C.	T	1	2	0	0	1	1
14	166	M. E.	100	610	Incont.	29	Incont.	5	10
15	361	M. S.	100	9	6	0	0	2	2
16	604	A. P.	T	2	4	0	0	1	1
17	577	L. F.	100	219	13	35	1	4	2
18	142	V. F. B.	100	7	5	0	0	2	2
19	3	Z. V.	100	298	156	15	21	4	4
20	353	M. T.	100	156	34	0	5	4	2
21	598	A. G. M.	100	42	64	3	2	2	2
22	28	M. R. P.	100	9	4	0	0	2	2
23	259	V. F.	100	17	135	0	0	2	3
24	168	V. G.	100	180	472	35	25	4	5
25	210	B. B.	100	156	91	3	5	4	3
26	352	J. F.	T	0	0	0	0	0	0
27	253	C. A.	100	379	3168	40	121	5	8
28	398	P. P. R.	100	37	101	1	6	2	3
29	183	J. O.	100	18	22	0	0	2	2
30	562	J. C.	100	2904	2019	272	94	8	7
31	101	J. X. B.	100	25	68	1	8	2	2
32	735	B. G.	100	28	22	0	2	2	2

Total 6214 8872 588 523

T — Tõda a extensõ dos esfregaços corados.

Incont.-incontaveis.

Nêstes totais nã estã incluidos os valores obtidos nas pre-parações do material n.º 14.

COMENTARIOS

Consideramos os resultados do confronto realizado, sob quatro aspectos diferentes:

a) contagem de germes; b) contagem de glóbulos; c) contagem dos elementos bacilares; germes e glóbulos em conjunto; d) valor obtido na escala de Gaffky.

a) *Confronto entre o número de germes.* — Dos 32 materiais examinados, as preparações do material n.º 14 não puderam ser postas em confronto do ponto de vista quantitativo, por não ter sido possível proceder à contagem de germes contidos na preparação feita pelo método de Gabbet, tão numerosos eram os germes e tão emaranhada a sua distribuição. No material n.º 26, nas preparações feitas pelos dois métodos, não foram encontrados germes, razão pela qual o referido material foi considerado negativo.

Por conseguinte, a comparação quantitativa direta foi realizada entre as preparações correspondentes de 30 materiais. Nestes, a preparação feita com o método de Gabbet apresentou em 17 materiais número de germes mais elevado do que a preparação feita pelo método de Halberg, cabendo ao método de Halberg apresentar maior número de germes em preparação com êle feita em 13 materiais.

A soma total de germes contados em tôdas as preparações feitas pelo método de Gabbet, superou em 2658 a soma total de germes contados em tôdas as preparações correspondentes, feita pelo método de Halberg.

Nos materiais n.º 4 e 17 a diferença verificada no confronto entre as preparações realizadas pelos dois métodos, foi de intensidade tal, que permite admitir-se erro accidental de preparação, não obstante o exame das lâminas não ter fornecido indícios seguros disto.

b) *Confronto entre o número de glóbulos.* — No material n.º 14, por razões já expostas, não foi possível fazer a comparação numérica entre as glóbulos existentes nas respectivas preparações. Em 11 materiais, em ambas as preparações feitas não foram encontradas glóbulos. Nos demais 20 materiais, 1 material apresentou igual número de glóbulos nas respectivas preparações, e em 11 materiais, nas preparações feitas pelo método de Gabbet foi contado maior número de glóbulos do que na preparação correspondente feita pelo método de Halberg, verificando-se o contrário em 8 materiais.

c) *Confronto da contagem conjunta dos elementos bacilares: germes e glóbulos.* — Excetuados o material n.º 14, em que não pudemos contar, e o material n.º 26, de pesquisa negativa, o confronto foi realizado em 30 materiais.

Em 16 materiais, a preparação feita pelo método de Gabbet apresentou resultado numericamente superior ao verificado na preparação correspondente feita pelo método de Halberg. Em 14 materiais, na preparação feita pelo método de Halberg, foi contado maior número de elementos bacilares do que na sua correspondente feita pelo método de Gabbet.

A soma total de germes e glóbias contados em todas as preparações feitas com o método de Gabbet, foi maior do que a soma total de germes e glóbias contados em todas as preparações correspondentes feitas pelo método de Halberg.

d) *Confronto entre os valores obtidos pelas preparações na escala de Gaffky.* — A atribuição de valores da escala de Gaffky às preparações, foi feita considerando o número total de germes e glóbias contado na preparação e a extensão do esfregaço em que foi contado. À cada glóbia foi atribuído valor equivalente ao valor de um bacilo.

Em 19 materiais, a preparação feita pelo método de Gabbet e a preparação correspondente feita pelo método de Halberg, obtiveram valores iguais. Em 8 materiais, neles incluindo-se o n.º 14 ao qual foi atribuído valor 10, a preparação feita pelo método de Gabbet obteve valor superior ao obtido pela preparação correspondente feita pelo método de Halberg. Em 4 materiais, a preparação feita pelo método de Halberg obteve valor superior ao da preparação correspondente feita pelo método de Gabbet.

CONCLUSÕES

Tendo sempre presente as limitações com que devem ser tiradas quaisquer conclusões da parte comparativa deste trabalho, dadas as múltiplas causas de erro capazes de influenciar-lhe os resultados, julgamos todavia possível adiantar um juízo que, longe de ser absoluto, é entretanto aquele a que somos levados pelos fatos verificados.

O método de Halberg pode ser considerado um método eficiente na coloração do bacilo da lepra, como o demonstraram os resultados do confronto realizado, dentre os quais achamos que devem ser ressaltados como de maior expressão, os resultados obtidos em preparações de material de conteúdo bacilar escasso, o que de um certo modo, atesta a eficiência e segurança oferecidas por um método de coloração.

Por tudo o que foi exposto, não apresentando o método de Halberg maiores vantagens sobre o de Gabbet, não achamos justi-

ficado o emprêgo preferencial do método de Halberg para fins diagnósticos, pois, apesar de sua eficiência, êle não se revelou superior ao método de Gabbet. Entretanto, acreditamos que êle representa um recurso, cujas possibilidades não pudemos avaliar com rigor, no estudo da morfologia do bacilo da lepra e particularmente de alguns de seus aspectos morfológicos menos conhecidos.

SUMÁRIO

No presente trabalho, o A. estuda na coloração do báculo da lepra, o emprego do método de Halberg, para coloração do báculo da tuberculose.

O A. relata, primeiramente, o resultado de suas observações sobre o báculo da lepra corado pelo método de Halberg, referindo os vários aspectos morfológicos encontrados. A seguir, o A. estuda a eficiência do método de Halberg na coloração do bacilo da lepra, procedendo a um estudo de comparação quantitativa entre êste método e o método de Gabbet. Preliminarmente, analisa as múltiplas causas de êrro capazes de influenciar decisivamente os resultados dêste estudo comparativo e descreve a orientação e os recursos utilizados para atenuá-las.

Neste estudo comparativo quantitativo, que constou de um confronto numérico entre preparações correspondentes de material de lesões cutâneas de 32 doentes de lepra lepromatosa, o método de Gabbet apresentou resultados superiores aos apresentados pelo método de Halberg.

Admitindo as restrições com que devem ser tiradas conclusões desta parte do trabalho, o A. baseado nos resultados por êle obtidos, não acha justificado o emprêgo preferencial do método de Halberg para fins de diagnóstico de lepra.

Não obstante considera o método de Halberg, um método eficiente, como o demonstram os resultados obtidos, dentre os quais merecem especial destaque os verificados em preparações de material leproso de escasso conteúdo bacilar.

Além do que, o A. considera o método de Halberg um novo recurso, cujo real valor necessita ser avaliado, no estudo da morfologia do báculo da lepra e especialmente das formas menos conhecidas do germe.

SUMMARY

Halberg's staining method for tuberculous bacillus was applied to the staining of leprosy bacillus.

The Author describes several morphological aspects observed on leprosy bacilli stained by such method, and discusses its value on the basis of a quantitative comparison with Gabbet's method. This comparative study was made by using both methods to stain duplicate smears of material from cutaneous lesions of 32 patients with lepromatous leprosy. The Author analyses a number of causes apt to decidedly affect conclusions drawn from such study, and discusses the means to minimize them.

As far as it is reasonable to conclude from the results presented, the method of Halberg proved less helpful than Gabbet's, there being no justification for the use of the first as the method of choice in the diagnosis of leprosy.

Notwithstanding, the results of the quantitative comparison demonstrated the method of Halberg a very efficient method for staining leprosy bacilli, being of special value for this concept the results obtained with it in the research of leprosy bacilli in lepromatous material of low bacilli content.

Moreover, is the Author's impression that Halberg's method should be considered as a new resource in the morphological studies of the leprosy bacillus, particularly worthy of being tried in the investigation on the less well known forms of the germ.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos cordialmente aos srs.: Dr. Nelson de Souza Campos, DD. Diretor do Departamento de Profilaxia da Leprosia do Estado de São Paulo; Dr. Lauro de Souza Lima, DD. Diretor do Sanatório Padre Bento e Dr. Gil de Castro Cerqueira, DD. Vice Diretor do Sanatório Padre Bento, nos ter tornado possível a execução do presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — HALBERG, V. — 1941 — A new method for staining tubercule bacilli. *Acta medica scandinavica*, 108, fasc. I e II: 12.
- 2 — REENSTIERN, J. — 1941 — The use of the Halberg method for staining leprosy bacilli. Note in Halberg, Vide: (1), 15.
- 3 — NEISSER, M., KLEIN, W. — 1923 — Keimzählung, in Kraus, R. Uhlenhuth, P. Handbuch der mikrobiologischen Technik. 2: 1081, Urban u. Schwarzenberg, Wienn. Berlin.

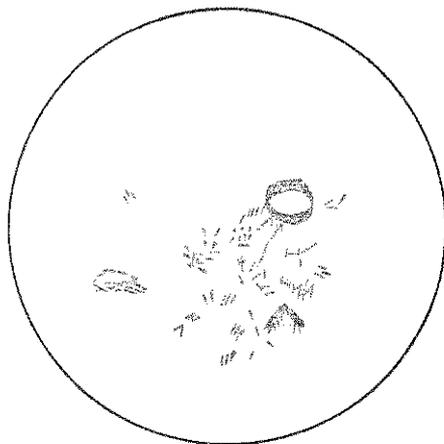


FIG. 1

Bacilos da lepra. Coloração: método de Halberg. Obj. Imersão. Oc. Zeiss 4 x. Material 14. Doente M. B. Pront. 166. Sanatório Padre Bento. Lesão: tubérculo. Notar bacilos dispersos e isolados e também aglomerados bacilares em glóbulas e paliçadas.

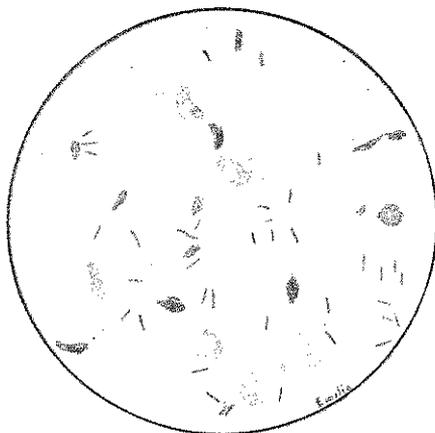


FIG. 2

Bacilos da lepra. Coloração: método de Halberg. Contra corante: vermelho neutro Grübler & Cia. Obj. imersão. Oc. Zeiss 4 x. Material n.º 8. Doente L. B. L. Pront. 596. Sanatório Padre Bento. Lesão: tubérculo. Notar germes isolados e aglomerados em glóbulas e paliçadas, e células degeneradas tomando a cor do contra corante.

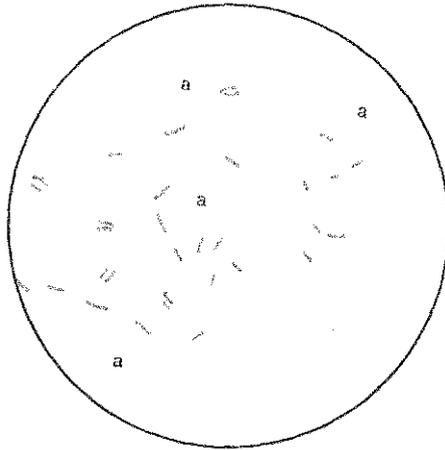


FIG. 3

Bacilos da lepra. Coloração: método de Halberg. Obj. de imersão. Oc. Zeiss 4 x. Material n.º 30. Doente S. C. Front. 562. Sanatório Padre Bento. Lesão: tubérculo. Notar bacilos com formações vacuolares, outros com coloração bipolar e aspectos granulosos em alguns corpos bacilares.

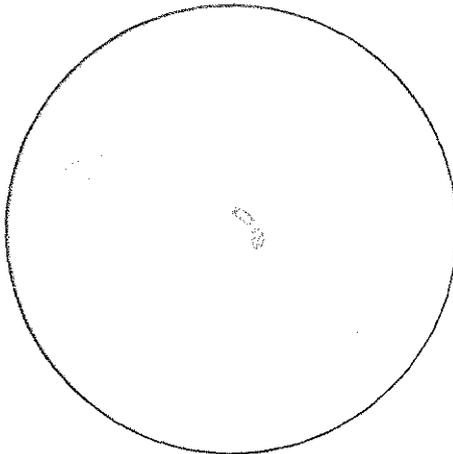


FIG. 4

Material leproso. Coloração: método de Halberg. Contra corante: vermelho neutro Grübler & Cia. Obj. de imersão. Oc. Zeiss 4 x. Material n.º 31. Doente J. X. B. Front. 101. Sanatório Padre Bento. Lesão pápulo-tuberosa. Notar formações leveduroides.

UMA NOVA MADEIRA FÓSSIL DO BRASIL MERIDIONAL

Dadoxylon roxoi sp. n.

(Formação Estrada Nova, Estado de São Paulo)

JORDANO MANIERO

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho constitue o estudo descritivo e comparativo de um fragmento de madeira petrificada fóssil, sendo o mesmo referido provisoriamente, ao gênero *Dadoxylon* Endlicher.

Até esta data foram descritas e referidas a êsse gênero seis diferentes espécies no Brasil, ocorrentes em formação do "Sistema de Santa Catarina" de I. C. White (1908). (Permo-triássico).

O quadro seguinte ilustra a posição estratigráfica das madeiras fósseis conhecidas, incluso a espécie aqui descrita:

<i>Idade</i>	<i>Formações</i>	<i>Fósseis</i>
Permo-triássico	Série Estrada Nova (I. C. White)	<i>D. roxoi</i> <i>D. nummularium</i> (7)
Permiano inferior	Série Iratí (I. C. White)	<i>D. Whitei</i> (1)
Permo-carbonífero	Série Tubarão, White 1908 (Itararé-Tubarão, E. Oliveira 1919)	<i>D. pedroi</i> (8) <i>D. meridionale</i> (7) <i>D. butiense</i> (6) <i>D. derbyi</i> (2,4)

O material aqui estudado procede da localidade de Jacutinga, município de Guareí, Estado de S. Paulo, onde foi encontrado em camadas do topo da Formação Estrada Nova, jacente logo abaixo de um horizonte de arenito betuminoso (Formação Piramboia).

O holotipo foi coletado por J. Camargo Mendes, durante uma excursão promovida e chefiada por Mathias de Oliveira Roxo, Diretor da Divisão de Geologia do Departamento Nacional de Produção Mineral, e encontra-se no Departamento de Geologia e Paleontologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, registrado sob indicação 7-245, Coleção Paleontológica Brasileira.

Na preparação das lâminas foi aplicado o método do descolamento pela nitrocelulose, (nitrocellulose "peel")³.

DESCRIÇÃO

ESTRUTURA HISTOLÓGICA

O fragmento de madeira fóssil estudado apresenta forma tabular, com faces quasi paralelas, duas a duas. As faces tangenciais medem cêrca de 5cm. de largura por 15 de comprimento; são levemente curvas com raios medindo cêrca de 24cm. Radialmente as espessuras variam de 2' a 2,5cm. Estas faces deixam vêr a ruptura original de madeira. As secções transversais são bastante irregulares.

Tôda a superfície apresenta-se pardo-escura antes de ser atacada pelo ácido fluorídrico, tornando-se depois, branca, em partes.

CARACTERES EXTERIORES

Secção transversal. — Os traqueídios apresentam-se dispostos mais ou menos regularmente em fileiras radiais. Suas paredes são espêssas, côr de ouro, ou incolores com as camadas internas e externas finas e negras. Os diâmetros radiais e tangenciais das celulas em geral são iguais; em muitos casos, porém, são alongados no sentido tangencial ou radial. Variam os mesmos de 20 a 53 *micra*, tendo em média, 30. Apresentam os traqueídios, contornos quadrangulares, pentagonais ou hexagonais; nos ângulos de união, as paredes são mais espêssas, ou, em casos pouco frequentes formam-se espaços inter-celulares.

Os raios medulares distam entre si de 1 a 13 fileiras de celulas, na mesma linha transversal, sendo mais frequentes 7 celulas.

Secção radial. — Mostram-se as paredes tangenciais dos traqueídios, grossas, negras inteiramente, ou apenas nas camadas externas e internas. Apresentam pequenas curvaturas em geral, havendo casos em que as terminações formam bolsas que se entrelaçam entre si, ou com os traqueídios dos raios medulares; às vêzes terminam em ângulo.

Pontuações areoladas estão presentes na maior parte dos traqueídios. A disposição das mesmas pode ser dispersa ou agrupada; quando agrupadas encontram-se em fileiras, ou em disposição irregular. As fileiras podem ser simples, duplas ou, raramente, triplas, sendo que as pontuações bisseriadas em geral se alternam.

Contornos externos das pontuações, em geral, circulares, encontrando-se também poligonais, quando contíguas. Suas dimensões variam de 4 a 20 *micra* sendo de 8 *micra* o seu maior número.

Poros bem distintos, completamente incolores na maioria, (ausência de toros) quase sempre centrais, delimitados por um traço delgado e bem preto. Apresentam-se, os poros, em pequenos contornos sub-redondos ou em forma navicular, de comprimentos variáveis, os quais, são inclinados em graus diferentes, alcançando, às vêzes, 12 *micra* de comprimento.

Raios medulares de comprimento muito variável. As alturas oscilam entre 3 e 22 traqueídios.

Em certos casos nota-se a superposição das paredes tangenciais dos traqueídios do xilema com as paredes horizontais das células dos raios medulares do que resulta a formação de um retículo.

Nos raios medulares as pontuações são raras e pouco nítidas; no retículo são vistas claramente.

Células dos raios medulares com membrana divisória bem nítida, sendo ora perpendicular, ora inclinada.

Secção tangencial — Paredes radiais das células ligeiramente sinuosas. Raios medulares usualmente unisseriados havendo casos de bisseriados. As dimensões dos traqueídios variam de 20 a 40 *micra* de altura, sendo de 25 *micra* a altura média. As larguras dos mesmos variam de 12 a 33 *micra*, com mais frequência 20; os bisseriados atingem a 53 *micra*. Pontuações, relativamente frequentes, unisseriadas ou, em casos raros, bisseriadas.

DISCUSSÃO

A determinação genérica da madeira baseia-se apenas nos caracteres do xilema secundário, uma vez que faltam na mesma, a medula, o xilema primário e o cortex. Apesar da feição tipicamente araucariana do lenho secundário, a classificação genérica só poderá ser mais segura quando forem estudados os elementos faltantes.

A estrutura foi comparada (veja-se a Tabela) com as seis espécies de *Dadoxylon* Endlicher ("*Araucarioxylon*" Kraus) conhecidas no Brasil, diferindo das mesmas pelos seguintes caracteres: dimensões diferentes dos traqueídios longitudinais e radiais, das pontuações e dos poros; presença de espaços inter-celulares; duplicidade de fileiras, em toda a altura, de alguns raios medulares, pontuações trisseriadas em secção radial e bisseriadas em secção tangencial e bem assim pelo contorno navicular dos poros.

Não dispondo no momento de literatura estrangeira suficiente para estabelecer o seu confronto com certos *Dadoxylon* de idades próximas ocorrentes em terrenos gondwânicos, proponho entretanto, uma denominação, crente de que contribuo assim para facilitar as referências e comparações estratigráficas no sul do país. A mesma será denominada *Dadoxylon* (*Araucarioxylon*) *roxoi* em homenagem ao paleontólogo brasileiro Mathias Gonçalves de Oliveira Roxo.

SUMMARY

In this paper the author studies a new specie fossil wood, *Dadoxylon roxoi*, n. sp., occurring in the Estrada Nova formation.

The fossil was found at Jacutinga, municipality of Guareí (State of São Paulo).

The author discusses the characters that distinguish it from other species already studied in Brazil, especially *D. nummularium* White also of the Estrada Nova. The paper ends with a comparative table dealing with the principal characters of eight araucarian woods of Brazil. The microscopical preparations were made by the nitrocellulose peel method.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — MANIERO, JORDANO — 1944 — *Dadoxylon whitei* sp. n. — *Bol. Fac. Ciên. Letr. Univ. S. Paulo*, XLV, Geologia 1: 107, 5 fig. S. Paulo, 1944. "*Revista do Instituto Adolfo Lutz*", 4: 209 — S. Paulo.
- 2 — MANIERO, JORDANO — 1945 — Sôbre a estrutura de *Dadoxylon derbyi* Oliveira. *Bol. Fac. Fil. Ciên. Letr. Univ. S. Paulo*. L. Geologia 2: 133, 4 fig. S. Paulo.
- 3 — MANIERO, JORDANO — 1945 — Aplicação do Método do Descolamento ("Nitrocellulose Peel") às Madeiras Silicificadas Fósseis do Brasil. *Mineração e Metalurgia*. 8: 377.
- 4 — OLIVEIRA, E. — 1936 — *Dadoxylon derbyi* sp. n. *Serv. Geol. Miner.*, Notas prelim. e estds., n. 1:1, Rio de Janeiro.
- 5 — RAU, W. — 1933 — *Cedroxylon canoasense*, una madera fósil nueva del Río Grande del Sud. "*Revista Sudamericana de Botânica*". Montevideo, 1: 65, fig. 5.
- 6 — RAU, W. — 1934 — *Dadoxylon* (*Araucarioxylon*) *butiense* sp. n. — *Bol. Soc. Engenharia do Rio Grande do Sul*, 12: 169 11 fig.; Porto Alegre, 1935. "*Revista Sudamericana de Botânica*", 1: 169 Montevideo.
- 7 — WHITE, D. — 1909 — Flora fósil das Coal Measures do Brasil-Relatório Final da Comissão dos Estudos das Minas de Carvão de Pedra do Brasil, parte III — p. 337 t. 5-14; Rio de Janeiro.
- 8 — ZEILLER, R. — 1805 — Sur quelques empreintes vegetales des gisements houilleux du Brasil Meridional — *Comptes Rendus de l'Acad. des Sci., Paris*, 121: 961.

TABELA COMPARATIVA DAS MAD

Dadoxylon roxoi		D. nummularium	De. Whitei	D. Pedroi	
Xilema Secundário	Traqueídeos longitudinais	Disposição radial regular Raramente disposição irregular Diâmetro tangencial: de 25 a 61 μ (média 41 μ) Diâmetro radial: de 24 a 57 μ (média 41 μ) Espaços inter-celulares Lamela média, em geral	Disposição radial regular Diâmetro tangencial: 34 μ Diâmetro radial: menor que 34 μ Paredes escuras	Disposição rad. regular Sub quadrangulares Mais largos que altos Traqueídeos longos e regulares Paredes levemente onduladas Diâmetro radial: 20 a 40 μ (25 μ em média)	Disposição um pouco irregular Traqueídeos finos e longos
	Traqueídeos radiais	Unisseriados De 3 a 20 cel. distantes De 1 a 13 cel. de altura Altura média: 7 células Bisseriados na alt. de 1 a 2 cel. Bisseriados em todas as alturas Largura: 13 a 33 μ (média 20 μ) Os bisseriados com 53 μ de largura Altura: 20 a 40 μ (média 25 μ) Póros naviculares, agrupados	Unisseriados De 1 a 2 cel. distantes De 1 a 30 cel. de altura Altura média: 6-7 células Bisseriados na alt. de 2 ou 3 cel. Largura: menor que 30 μ Altura: 30 μ	Unisseriados De 2 a 20 células distantes De 1 a 41 cel. de altura Largura: 20 μ Altura: 30 μ Pontuações presentes	Unisseriados Larg. de diversas células Altura de 1 até 50 células Pontuações presentes
	Pontuações areoladas	Em geral unisseriados ou bisseriados Raramente trisseriados Redondas ou poligonais De 3 a 20 μ de diâm. (média 8 μ) caso raro, 2,5 μ Afastadas ou contíguas Presentes em acção tangencial	Em geral unisseriadas Raramente bisseriadas Redondas ou quasi Com 10 μ de diâmetro Em geral afastadas	Fleiras simples ou duplas Raramente triplas Redondas ou ovais Com 10-12 μ de diâm. Contíguas ou dispersas As vezes aglomeradas	Unisseriados em geral Algumas bisseriadas Raramente afastadas Geralmente contíguas Poligonais
	Poros	Em geral centrais Pequenos e grandes (até 12 μ de diâm.) Sub redondos Naviculares	Centrais Muito pequenos Redondos ou quasi	Centrais ou não Pequenos Redondos ou ovais	Centrais Pequenos Exatamente redondos As vezes excêntricos
				Aneis anuais	
Xilema primário			Traqueídeos reticulados Traqueídeos escalariformes Traqueídeos espiralados	Traqueídeos perfurados Traqueídeos escalariformes Traqueídeos anulares Traqueídeos espirais	
Medula			Cilíndrica Com câmaras longitudinais Parenquima irregular	Tri-carenada Grande; sem câmaras Células secretoras Células do parenquima, alongadas	

EIRAS ARAUCARIANAS DO BRASIL

D. meridionale	D. butiense	D. derbyi	Cedroxylon canoasense
Largura moderada Traqueídes longos e regulares Paredes levemente onduladas Diâmetro radial: 26 μ		Disp. em geral regular Disposição irregular com certa freq. Bifurcação de fileiras Contorno sub-quadrangular em geral Diâm. tangencial, 16 a 34 μ Diâm. radial, 20 a 41 μ Paredes de 8 a 20 μ de espessura	
Unisseriados De 1 a 6 células distantes De 1 a 3 células de altura Bisseriados na altura de 1-6 cel. Altura 25 cel.	Bisseriados Alguns unisseriados Tri ou tetrasseriados Altura: até 52 cel. Com pontuações	Unisseriados De 1 a 30 cel. distantes De 3 a 7 cel. de altura Largura: 25 μ Altura: de 25 a 30 μ Comprimento: 20 a 30 μ Alguns redondos Sem pontuações	Unisseriados Raramente bisseriados De 3 a 30 cel. de altura Largura 14-21 μ Comprimento: 21-28 μ Com pontuações
Fileiras simples (extritamente) Alongadas horizontalmente Com 13 μ de diâmetro Usualmente contíguas As vezes aglomeradas	Unisseriados Algumas bisseriadas, raramente trisseriadas De 10 a 13 μ Aglomeradas (excepção) Presente em secção tangencial Quadrangulares ou pentagonais	Unisseriados Arredondados As vezes achatados Geralmente contíguas Diâmetro de 8 a 12 μ Presentes em secção tangencial	Unisseriados Raros bisseriados Em geral ovalados Raramente circulares Diâmetro de 9 a 15 μ
Ovais oblíquos	Redondos ou ovais Oblíquos	Sem póros	Pequenos Redondos em geral Raramente ovalados Nunca oblíquos
		Anéis anuais bem distintos	Anéis anuais (pouco distintos)

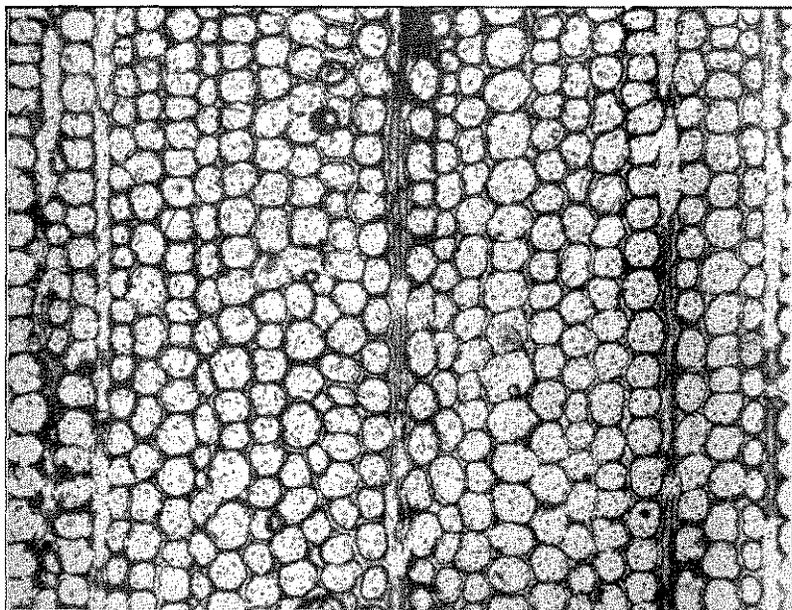


FIG. 1
Secção transversal. x 110.



FIG. 2
Secção tangencial. x 110.

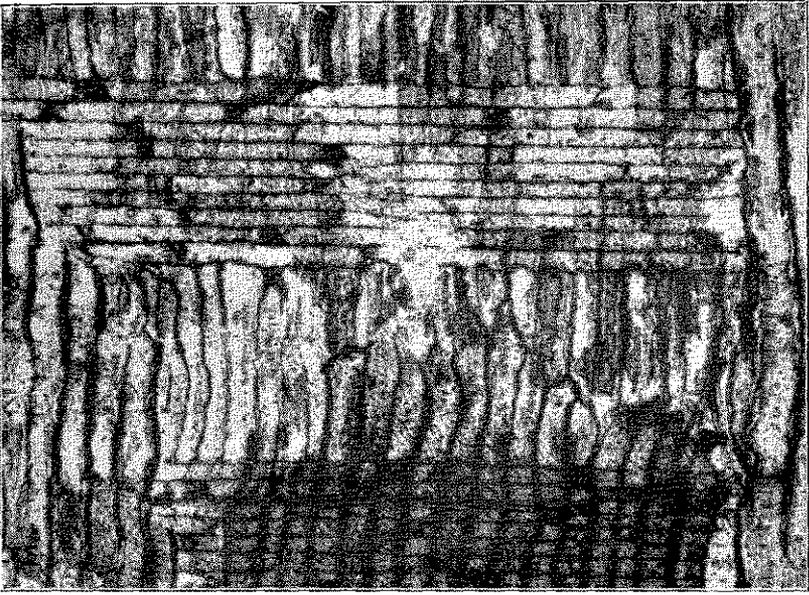


FIG. 3
Secção radial. x 90.

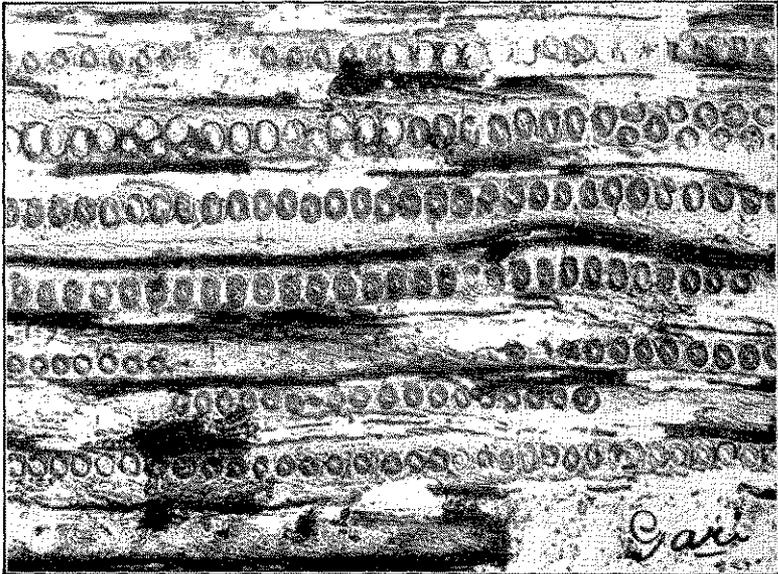


FIG. 4
Secção radial. x 275.

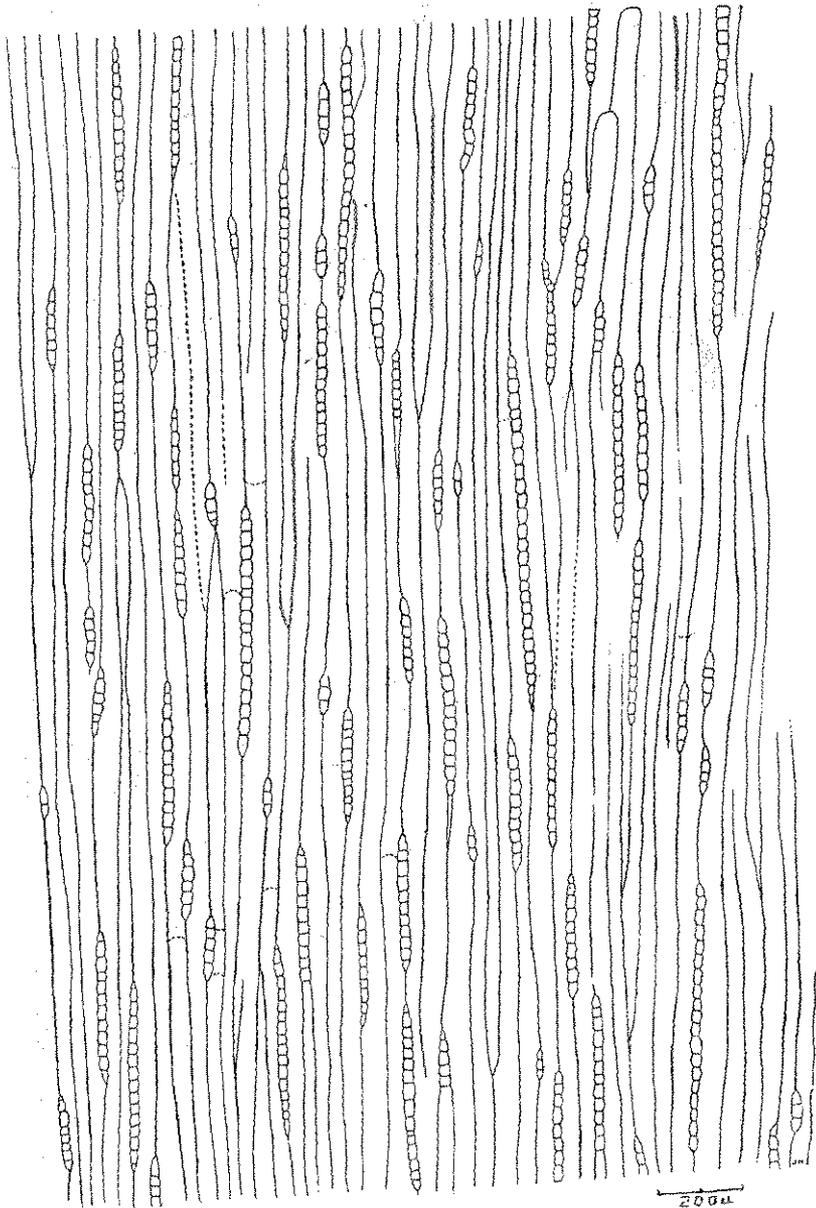


FIG. 5
Secção tangencial, desenho semi-esquemático,
em câmara clara e luz refletida.

CARACTERES ORGANOLÉTICOS DE ALIMENTOS E BEBIDAS

MÁRIO SAMPAIO MELO

Químico do Instituto Adolfo Lutz.

Dentre as determinações analíticas que o técnico é forçado a proceder ao analisar gêneros alimentícios e bebidas, os caracteres organoléticos destacam-se pela sua delicadeza, pela sua obrigatoriedade e pelo caráter eliminatório que muitas vezes determina. O problema dos caracteres organoléticos apresentados pelos alimentos e bebidas, deve, portanto, merecer alguma atenção e cuidado, mesmo porque os nossos códigos e regulamentos, prevêm a observação rigorosa dêsse exame, prescrevendo taxativamente que certos e determinados produtos alimentícios e bebidas, deixando de corresponder aos característicos normais e próprios dos produtos genuínos e típicos, sejam por isso considerados como produtos alterados ou fraudados.

Sobre as vantagens e desvantagens e sobre o valor e possibilidades de execução do exame organolético, alguma coisa já se tem dito e discutido. Algumas opiniões são francamente favoráveis ao seu procedimento por serem tais observações muito úteis e mesmo imprescindíveis em alguns casos, ao analista. Outras opiniões, porém, já foram emitidas, discordando da fixação de tais características, em vista da difícil possibilidade de êxito, em muitos casos, na sua execução, pela dependência do fator pessoal, pela imprecisão dos processos de tal análise, e pela variação individual e comum de cada analista, dando, portanto, aos resultados do exame, um valor relativo e restrito.

No nosso modo de pensar discordamos dos que assim opinam, pois sempre consideramos e demos a tais características, grande valor e importância por constituírem, na maioria dos casos, fortes indícios eliminatórios, pois tais são, às vezes, as alterações de côr, de cheiro e de sabor, muitas vezes até de aspecto, que desnecessária se tornaria qualquer outra determinação ou pesquisa complementar.

Senão, vejamos: o sabor *adstringente* e *ácido* de uma determinada manteiga *rançosa*, o cheiro *acético* e o gosto *acre* de um

vinho francamente *acetificado*, o cheiro *desagradável* e *sulfídrico* de uma conserva enlatada, o simples aspecto *estufado* da lata contendo tal conserva, o cheiro *anormal* e *impróprio* de uma banha ou de um óleo, a *côr estranha* de um xarope de groselha ou de licor "Piperment" que, apesar de possuírem as características de cheiro e gôsto correspondentes, se deixarem de apresentar-se tipicamente coloridos o primeiro em vermelho e o último em verde, deixarão também de corresponder aos produtos típicos genuínos, por não agradarem e não atenderem à exigência visual de seus consumidores. Além desses exemplos, poderíamos ainda acrescentar numa longa série, inúmeros outros, onde os caracteres organoléticos já por si poderiam concorrer para a eliminação do produto.

Em outros casos, essas características constituem ainda ótimos pontos de referência, para a qualificação de um produto alimentício ou mesmo uma indicação muito útil ao técnico, mostrando-lhe o caminho a seguir na sua análise. Muitas vezes um simples aroma *típico* ou *estranho*, uma pequena tonalidade colorida *própria* ou *imprópria* do produto, já podem, de certo modo, indicar a origem, a qualidade ou mesmo a alteração do produto. No caso do leite normal e natural, sua *côr* deve ser *branca* ou *branco-amarelada*, mais ou menos pronunciada conforme seja a riqueza de gordura contida no mesmo. Os leites desnatados ou molhados já se apresentam menos *opacos* e ligeiramente *azulados*. O cheiro do leite normal fresco é característico e *agradável*, sendo o sabor levemente *adocicado* e *salino*, ao passo que os leites alterados por fermentação láctica ou pútrida, leites modificados pela presença de germes alterantes, leites alterados pela presença de substâncias diversas, além de princípios aromáticos ou corantes das plantas ingeridas na alimentação, que passam facilmente para o leite, vamos encontrar cheiro e sabor muito diversos e fora do cheiro e sabor *típico* do leite fresco normal. Algumas vezes mesmo, pode-se encontrar leites com cheiro e mesmo sabor de sais e substâncias medicamentosas administradas aos animais. Os leites quando conduzidos por canalizações metálicas sem serem devidamente estanhadas ou protegidas, quando conservados ou mesmo simplesmente transportados em recipientes metálicos principalmente de cobre, ferro ou zinco, devido à acidez que geralmente possuem, poderão conter metais tóxicos, tendo sempre cheiro tipicamente *metálico* e sabor *adstringente* e desagradável. É muito comum entre nós encontrarmos leites dados ao consumo, apresentando *péssimas* características organoléticas, principalmente quanto ao cheiro e sabor. Essas alterações provêm geralmente da falta de

assêio e cuidado por ocasião da ordenha, das dificuldades e deficiências de transportes e da grande série de manipulações que tais produtos geralmente sofrem antes de sua exposição ao consumo público.

No caso das carnes frescas, nas quais distinguimos para cada espécie diferente, o aspecto *próprio*, a côr *vermelha* ou *róseo-viva*, o cheiro *fresco* e *típico* "sui-generis" que a prática rapidamente permite conhecer, a reação dessas carnes deverá ser francamente *ácida* ao tornesol. Em geral as carnes se apresentando com aspecto *suspeito*, dando reação *anfotérica* ou *alcalina*, ao tornesol, com côr *escura* e *esverdinhada* e com cheiro *impróprio* e *desagradável*, devem ser sumariamente rejeitadas para o consumo, pois as mesmas como sabemos, nessas condições e em comêço de putrefação, tornam-se perigosíssimas pelos produtos de alteração que encerram e que muitas vêzes constituem perigo mortal para seus consumidores, em vista de tais toxinas não serem destruídas pela fervura nem mesmo por ação de calor mais intenso. Nos casos suspeitos de alteração das carnes, costuma-se fazer uma prova de cozedura, pondo-se num bequer de 200 ml um pequeno pedaço de carne que se cobre com certa porção de água e se faz ferver. Quando se iniciar a ebulição, aspira-se o vapor aquoso que se desprende. Se a carne estiver em boas condições não deverá haver neste ensaio nenhuma impressão *desagradável*. Se, porém, o produto estiver em início de decomposição, o cheiro desprendido será *desagradável*, *fétido* e *nauseante*, conforme seja o grau de alteração do produto.

Quanto aos peixes frescos, é sabido por todos que a epiderme *viscosa* e *brilhante* dos mesmos, que suas guelras *úmidas* e naturalmente *róseas* ou *avermelhadas* e não apresentando cheiro senão o peculiar do peixe, que seus olhos *brilhantes*, *convexos* e *salientes*, ocupando completamente as órbitas, que sua carne *consistente*, *firme*, que seu ventre *não saliente*, já indicam a boa qualidade e conservação dos mesmos, ao contrário do que observamos nos pescados de carne *opaca* e *flácida*, de olhos *sem brilho*, *embaciados* e muito enterrados nas órbitas, do pescado de guelras pardo arroxeadas ou então pintadas de vermelho, mas cuja coloração artificial facilmente se conhece e se remove, dos pescados com o ventre saliente, com cheiro *amoniacal acentuado* e geralmente desagradável, já denunciam sua alteração e impropriedade para o consumo.

Passando para o exemplo das frutas, estas devem ser rejeitadas quando se apresentarem demasiadamente *amolecidas* ou em *deli-*

quescência, quando *verdes* ou *mal sazonadas*, pois possuindo excesso de acidez podem acarretar, quando ingeridas, graves inconvenientes para a saúde, produzindo cólicas e infecções aos seus consumidores.

No caso típico das batatas que, sob a ação da luz e da umidade, germinam e enverdecem, tornando-se impróprias para a alimentação, visto nelas se desenvolver elevado teor de um glicósido tóxico e narcotizante denominado "solanina" que, com sua porcentagem média de quasi 30.0mg pode causar danos para a saúde pública, devendo porisso serem regeitadas. As batatas, principalmente as brancas, também são atacadas por um tipo de moléstia que os argentinos denominam de "papa-aguachenta" que faz com que os tubérculos se apresentem aguados, sem sabor de espécie alguma e com grande propensão para apodrecerem pela umidade. Outra moléstia, a "Bacillose" provocada pelo "*Bacillus caulivorum*" pode facilmente ser constatada, cortando-se os tubérculos e notando-se na sua parte interna um tanto afastada da casca, uma zona ligeiramente parda amarelada. Essas batatas assim atacadas, quando ingeridas, apresentam gosto *repulsivo* e *desagradável* de *môfo*.

Passando-se ao capítulo das farinhas de trigo, diremos que elas deverão se apresentar *brancas* ou ligeiramente *amareladas*, deverão ser *sêcas*, *suaves* ao tacto, possuir cheiro *fraco* mas *agradável* e *próprio*. Uma pequena porção deste produto, posta na língua, não deverá apresentar gosto *ácido* e nem tão pouco *amargo*. Apresentando eventualmente tal produto um cheiro *forte* e *desagradável* de *ranço* ou *môfo*, e uma *côr acinzentada*, deverá ser considerado produto velho e defeituoso. Quando peneirada num tamiz de malha fina a farinha de trigo não deverá apresentar torrões difíceis de se desfazerem, sendo que a presença de larvas, detritos e insetos seria indicação segura de uma farinha *velha* e *avariada*. A farinha de trigo, deixando no tamiz pequenas películas e detritos de casca, seria considerada, num determinado critério, de qualidade inferior, farinha de elevada porcentagem de extração.

Quanto às massas alimentícias, temos a *côr* desses produtos que representa grande importância, podendo-se, pela mesma observar o grau de peneiração da semolina empregada e também se a massa contém substâncias vegetais juntadas, se é preparada com ovos ou se foi colorida artificialmente. O aspecto da fratura dos bons macarrões deve ser *vítreo*, sua massa deve ser *uniforme* e *compacta*, se *farinosa* ou *quebradiça* será uma indicação de que a

matéria prima empregada não foi das melhores, que não foi junta-da sêmola à massa ou que a pasta não foi bem trabalhada. Os bons macarrões não devem turvar o líquido em que são cosidos, porque isso indicará desagregação fácil da pasta que neste caso foi mal fabricada.

As massas alimentícias são facilmente alteráveis, principal-mente quando conservadas em lugares úmidos. Os produtos são dêsse modo facilmente invadidos por bôlores e microorganismos di-versos, operando-se nêles uma fermentação especial geralmente com produção de ácido láctico. As massas assim alteradas adqui-rem cheiro *acre* e *desagradável* e seu sabor tornar-se *amargo* e *ácido*.

Passando para o caso dos pães devemos lembrar que um pão fabricado com farinha de boa qualidade e convenientemente prepara-da deverá se apresentar bem crescido, com côr *amarelo-dourada* e com tons mais escuros, *poroso-leve*, sem ser mole, com crosta *dura* e *friável*, com sonoridade nítida à percursão, apresentar superfi-cie relativamente *lisa*, sem *fendas* ou *rugos*. Seu miolo deverá ser *leve*, *esponjoso*, *homogêneo* e *elástico*, não aderindo aos dedos quan-do comprimido. Um bom pão deve apresentar cheiro e sabor espe-cial e agradável e nunca cheiro ou sabor *desagradável*, *ácido* ou de *môfo*.

O pão é um alimento muito sujeito a alterações e avarias que podem dar cheiro e sabor impróprios e maus.

Dentre as causas que mais concorrem e influem para prejudi-car as qualidades do pão, podem ser citadas as seguintes como principais: imperfeição do modo de fabrico ou de conservação, na má qualidade da água empregada, na adição de farinhas más ou avariadas que darão aos pães aspecto *desagradável*, deixando sabor *acre persistente*, quando mastigados. Outras causas seriam ainda: qualidade e quantidade dos levedos empregados, junção de sais mi-nerais, como sulfatos de cobre e zinco e alumen para corrigir o aspecto defeituosos dos pães *mal manipulados* e com hidratação exa-gerada; os pães *insuficientemente* cozidos ou muito hidratados são facilmente invadidos por bolôres, sofrendo então grandes modifi-cações, principalmente nos seus caracteres organoléticos.

Pães com crostas *brancas* e *moles*, separadas do miolo ou ain-da com crosta queimada, indicarão um cozimento mal conduzido.

Numerosa é a variedade de pães, que diferem mais notada-mente segundo a qualidade, natureza e quantidade das farinhas

empregadas no seu preparo. Em geral os próprios consumidores desses produtos sabem conhecer, de acôrdo com seu paladar, quando um pão reúne tôdas as condições de boa qualidade.

Além do aspecto, do cheiro e gôsto, a côr também é às vêzes um guia seguro especialmente para alguns tipos de pães confeccionados com mistura de farinhas. As farinhas de arroz, de cevada, de soja, de centeio, as farinhas integrais, os fubás de milho, dão geralmente modificações mais ou menos sensíveis aos pães permitindo às vêzes fácil identificação da mistura.

Referindo-se à melhor matéria prima para panificação, como também para a confecção de massas alimentícias, devemos lembrar ser o trigo o principal e indispensável material para tais preparos. Sem trigo não poderá haver bom pão, pois só êle contém determinados teores de glutem que com suas qualidades tenazes e elásticas permitem dar ao pão o devido e indispensável crescimento.

Os outros cereais não possuindo glutem nem em qualidade e nem em quantidade suficientes para permitir o entumescimento da massa, são por isso pães *compactos, pesados, viscosos e indigestos*.

É porisso, para os tipos de pães de centeio, milho, aveia ou cevada que são os mais comuns, indispensável a junção de uma porcentagem de farinha de trigo, afim de serem obtidos pães com possibilidade de serem ingeridos e mais facilmente trabalhados pelo organismo humano.

Os pães de fubá de milho, geralmente não apresentam características que os tornem tão apetecíveis e nutritivos como os pães de trigo, ou mesmo os de centeio; pelo contrário, são produtos mais pesados, mais grosseiros e de digestão mais difícil pela constituição natural córnea e um tanto lenhosa daquele cereal. Além disso, seus teores de lipídios geralmente acarretam sua alteração, azeitando-os com muita facilidade, a não ser que se empreguem fubás com teor de lipídios reduzidos e provindos de semente previamente desgerminadas.

Para se obter uma panificação razoável com êste sucedâneo, deverá ser juntado nunca menos de 50% de farinha de trigo de boa qualidade. Os pães assim obtidos serão denominados pães mixtos, mas não passarão de broas de milho.

Os pães de centeio também nas mesmas condições, necessitam de sensível teor de trigo para a obtenção de bons produtos. Os pães de centeio, geralmente se apresentam com crosta acinzentada e pastosa, miolo mole, com olhos pequenos e cerrados. Compri-

mindose com os dedos êle não retorna à forma primitiva, senão lentamente. Ao sair do forno, são tão úmidos que não podem ser logo consumidos. Por êsse motivo é que o pão de centeio torna-se mais apreciado e apetitoso um o dois dias após sua fabricação. Êsse tipo de pão apresenta, pois, esta grande vantagem sôbre os pães de trigo puro.

Em geral, os pães de boas farinhas endurecem lentamente, sem perder seu sabor peculiar, ao passo que os pães confeccionados com farinhas velhas ou avariadas ou mal manipulados, endurecem rapidamente, adquirindo gôsto acre e azêdo, criando além disso, bolôres com grande facilidade. O mesmo fenômeno de endurecimento rápido do produto, se dá com certa intensidade, quando se emprega em mistura com trigo, teores mesmo baixos de farinhas de leguminosas, farinha de arroz e fubá de milho.

Finalizando êste capítulo referente a pães, teremos sômente a acrescentar que a manipulação dos pães de trigo é relativamente fácil, mas a panificação de produtos mixtos requer sempre de seus manipuladores uma técnica diferente e mais cuidadosa — quer no amassamento das farinhas, quer na sua mistura, quer na qualidade e quantidade do levedo a empregar, quer no descanso da massa para seu devido crescimento, quer no tamanho dos pães, quer ainda, na temperatura do forno.

São requisitos capitais que, uma vez não observados, irão contribuir para a obtenção de pães *pesados*, de *mau aspecto*, de gôsto e cheiro nem sempre agradáveis e apetitosos e com um índice alimentício e digestivo bastante sacrificado.

Quanto à temperatura é o pão de trigo puro que menor temperatura requer para seu cosimento, o pão de centeio exige mais que o de trigo e menos que os de aveia, cevada ou milho. A temperatura, pois, deve ser regulada de acôrdo com a espécie de pão que se vai cozer, com o estado da massa na ocasião do enforramento e com o tamanho dos pães a serem preparados.

Os Regulamentos vigentes estabelecem obrigatòriamente o pêso máximo de 2 quilos para cada pão de tipo redondo, afim de evitar que fiquem os mesmos com suas crostas externas muito queimadas e ao mesmo tempo apresentem no seu interior, onde o calor não atingiu, massa crua e de maus caracteres organoléticos.

Quanto ao tipo ideal de pão mixto, já foi feito um detalhado estudo entre nós, onde uma comissão de técnicos paulistas da qual fizemos parte, estudou e experimentou, no decurso de três anos, tôda

a série de sucedâneos possíveis de serem empregados em panificação, com o fito de obter-se um pão mixto que fosse tão agradável e tão apetecível como o pão de trigo puro; um tipo de pão mixto onde os principais característicos organoléticos fossem análogos ou semelhantes o mais possível aos apresentados pelos pães 100% de trigo. Ao mesmo tempo a conservação do produto, a sua digestibilidade e seu poder alimentício não foram descuidados. A finalidade principal, no entretanto, era a obtenção de um pão mixto tão *leve*, tão *branco* e com tôdas as demais características dos pães de trigo puro.

Encontrou-se a fórmula para isso, onde com a economia de 30% de trigo seriam empregados em substituição fécula de mandioca, farinha de arroz e amido de milho na proporção de 10% para cada um. Outro tipo de pão mixto com cerca de 20% de farinha panificável de mandioca, foi bastante tempo empregada entre nós.

Infelizmente, porém, a necessidade governamental de assinar convenções e acordos com países produtores de trigo, não permitiu fosse incentivado tal emprêgo, com o qual hoje, talvez, estivessem nossas populações livres da grande crise de trigo que assoberba o mundo inteiro.

Pensou-se também, naquela ocasião, nas possibilidades do pão integral.

Devemos, no entretanto, reafirmar agora a nossa mesma opinião sobre o assunto. Seria uma tarefa muito árdua e talvez improdutiva, impor-se apenas a título de ser mais nutritivo um produto bastante diferente do pão branco e comum de trigo, com cujo paladar os consumidores já estão acostumados. Seria debater uma velha questão que desde o século passado está sendo tentada sem que, no entretanto, até hoje nenhum país do mundo em tempos normais tenha conseguido impor a obrigatoriedade de consumo do pão integral, retrogradando, por assim dizer, o paladar mais apurado e mais exigente.

Bem reduzida seria a porcentagem dos que conscientemente conhecendo as vantagens nutritivas de tal tipo de pão iriam trocá-lo pelo seu predileto pão branco de trigo que, apesar de conter reservas menores de princípios alimentícios, ainda continua a ser o mais saboroso e apetecível.

Passando para outro produto, o mel de abelhas, lembraremos que este não deve apresentar espuma superficial e nem conter insetos, detritos ou sujidades; seu sabor deve ser *próprio e agradável*.

vel sem nada de *amargo* ou *picante*, variando sua côr e aroma geralmente de acôrdo com as flores com cujo nectar as abelhas os fabricam. Já temos encontrado méis com cheiro *típico* de flores de laranjeira ou de flores de cafeeiro.

O sabor e o aroma do mel são tão variados e tão diferentes, como variado e diferente é o perfume das flores, pois as abelhas, em sua elaboração, não modificam o sabor do nectar. São, por isso, encontrados sabores delicadíssimos em certas qualidades de mel, ao passo que outras, são encontradas, mesmo quando ainda contidas nas próprias colmeias, apresentando sabores naturais amargos e desagradáveis e mesmo sabores apimentados, provindos das espécies de flores com cujo nectar foram elaborados.

Uma das melhores plantas melíferas é o algodoeiro, cujas lavouras deveriam ser aproveitadas para essa rendosa e util industrialização. O mel provindo das flores do algodoeiro é muito claro e possui gôsto muito suave. Depois de completamente amadurecido pode ser comparado favoravelmente com as melhores qualidades de mel. Este tipo de produto se granula facilmente e nesta forma cristalizada é quase incolor e de um grão muito fino. O aspecto e a composição do mel variam também conforme as espécies de abelhas que os produzem e conforme, também, as estações do ano. Geralmente, no período invernal, as abelhas não recolhem mel senão para sua alimentação quotidiana. O mel é um produto muito delicado, alterando-se com muita facilidade, principalmente quando contém fragmentos de insetos ou grande quantidade de polem. Há, nesse caso, uma fermentação com desprendimento de gás carbônico e modificação completa de seus caracteres organoléticos.

Vejamos agora, rapidamente, o caso dos vinhos, produtos aliás muito sujeitos a modificações provenientes de causas diversas. O simples emprêgo no transporte das uvas, de vasilhame ou veículos impróprios ou que não estejam perfeitamente limpos, o que é muito comum, pode acarretar aos vinhos com elas fabricados, sabores anormais difíceis de se precisar, pois as uvas, quando maduras, absorvem facilmente tôda sorte de aromas estranhos. Algumas vêzes, a junção de alguns produtos químicos impuros nas tinas de fermentação, como por exemplo os sulfitos, é muito suscetível de provocar a formação, no vinho, de sabores *anormais* e *impróprios*. Devem merecer também, por parte dos viticultores e interessados na indústria vinícola, um certo cuidado e cautela os vasilhames novos, cuja madeira, por tratamento inadequado, não tenha perdido ainda completamente

suas substâncias extrativas que, dissolvendo-se no vinho, irão dar-lhe uma adstringência exagerada que porá em risco tôda a produção em vista da sensação de rudeza *desagradável* de seu sabor. Essa adstringência, contraindo os músculos da lingua, produzirá uma impressão estranha e repulsiva nas papilas nervosas do paladar. Outras alterações accidentais produzidas por causas anormais e inesperada e que ainda poderão ser citadas como causadoras das alterações dos caracteres organoléticos dos vinhos são: colheitas defeituosas, efetuadas em tempo impróprio e chuvoso, às vêzes a própria uva sujeita ao contacto de criptogamas e insetos daninhos, outras vêzes fermentações incompletas por falta de calor, fermentações morosas, operações enológicas mal executadas, erro de técnica nas manipulações previstas, variações de temperatura, engarrafamentos precoces, emprêgo de vasilhame e garrafaria mal limpos e que são, geralmente, a causa dos vinhos com sabores estranhos de môfo, de sabão, de querosene, de alcatrão e outros. Algumas vêzes, os recipientes metálicos, tais como vasilhames, aparelhos, bombas, pasteurizadores, por onde passa o vinho, são facilmente atacados pelos ácidos naturais do produto, dando formação de sais metálicos que comunicam ao mesmo, sabor e muitas vêzes cheiro *desagradável, repulsivo e impróprio*. Outras alterações ainda no caso dos vinhos poderão ser citadas, por acarretarem modificações tais no seu aspecto, na sua côr, no seu sabor e no seu cheiro que, por uma simples inspeção do produto, já poderíamos dar uma conclusão pouco favorável ao mesmo. Essas alterações são motivadas pelas denominadas moléstias ou enfermidades do vinhos, cuja importância, de passagem, devemos mencionar. Dentre as principais destas moléstias que geralmente transtornam completamente as características dos vinhos, destacaremos as seguintes: a "floração", moléstia produzida pelo desenvolvimento do "mycoderma vini", mais ou menos semelhante ao levedo alcoólico que, consumindo o álcool do vinho, transforma-o em gás carbônico e água. Essa moléstia é observada pela formação, na superfície dos vinhos atacados, de uma película branca denunciadora de tal alteração; a "azedia", outra moléstia bem mais comum que a precedente, é produzida pelo desenvolvimento do "mycoderma aceti", que oxidando o álcool, transforma-o em ácido acético, de modo que os vinhos assim alterados têm o sabor ácido e próprio dos vinagres, ao mesmo tempo que sua acidez volátil irá aumentar consideravelmente; "turvação", que é produzida por um germe anaeróbio que, atacando o ácido tartárico, a glicerina e o açúcar dos vinhos, produz ácido acético, ácido propriônico e gás car-

bônico. Esta alteração é caracterizada pelo *desprendimento de gás carbônico*, percebida na superfície do vinho doente sob a forma de pequeninas bolhas gasosas e pelo seu cheiro e gosto bastante *desagradáveis*. “Toldação” — os vinhos atacados por esta moléstia são mais ou menos *turvos*, e apresentam sabor e cheiro *desagradáveis* e *impróprios* pela destruição do ácido tartárico e pela produção dos ácidos acético, tartrônico e láctico. “Engorduramento”, moléstia peculiar dos vinhos pobres em álcool e em tanino, vinhos brancos e novos e produzida por pequenos germes esféricos que se apresentam em forma de rosário que tornam o vinho *denso* e *viscoso* em vista da substância mucilaginosa que segregam. “Amargor”, moléstia devida a germes com forma de filamento, mais espessos que os da toldação, sendo ainda impregnados de matéria corante. Os vinhos assim atacados tornam-se *amargos* e *picantes*. A sua acidez é aumentada, havendo produção de ácido butírico que acarreta ao vinho um gosto *amargo* mais ou menos acentuado. E para finalizar, “Fermentação manítica”, cujo fermento não ataca propriamente os vinhos mas o mosto durante a vinificação, quando a temperatura atinge de 30 a 35°. Os vinhos manitados são, portanto, produtos de sabor *desagradável*, excesso de acidez volátil e teor elevado de açúcares. São essas as principais moléstias dos vinhos, as quais, como já frisamos, acarretam sempre aos produtos alterações tais no aspecto, côr, sabor e cheiro que, por uma simples observação, podemos dar uma conclusão segura e ao mesmo tempo desfavorável.

No caso, porém, dos produtos normais, dos produtos obtidos com a devida técnica, livres dessas alterações e defeitos, vamos ainda notar que sua côr já constitui um ótimo indicio para classificação, mas o cheiro e o sabor, ainda no caso especial dos vinhos, constituem no comércio, magnífica prova para a apreciação, havendo mesmo especialistas no assunto, denominados “degustadores” que, pelo aroma do produto e pela prova de pequenas porções podem dizer com relativa facilidade, o tipo, a classe, a força alcoólica, a procedência e até mesmo a idade dos vinhos. E já que falamos em degustação, vamos citar outra espécie de produto onde também temos o exemplo típico — o dos classificadores de café que, na “prova de chícara”, têm o melhor e mais seguro modo de executar a classificação do produto em tipos diferentes, demonstrando assim que por uma simples e única prova degustativa é possível, em certos e determinados casos, classificar com relativa segurança e acerto, um produto alimentício ou bebida. No caso, por exemplo, da manteiga e da margarina, produtos de aspecto semelhante e de gosto e

cheiro também semelhantes, tendo como distinção, além da prova do revelador que as margarinas obrigatoriamente devem conter, e que são verificadas quimicamente, a coloração amarela bastante acentuada que as margarinas devem apresentar e que já concorre para permitir uma distinção nítida entre os dois produtos. Uma outra manteiga, *excessivamente salgada*, terá, ao ser provada, desvendada facilmente sua alteração. As boas manteigas devem apresentar consistência *própria, semi-sólida*, de cheiro aromático e agradável. Sua cor geralmente é amarelada, às vezes mais ou menos pronunciada em vista da concessão legal da junção de determinados corantes. As manteigas, quando novas, podem apresentar a cor *branca*, que se vai tornando *amarelada*, à medida que o produto envelhece.

No capítulo de queijos, cujos caracteres organoléticos têm grande importância, já na observação do formato externo do produto, no seu próprio acondicionamento, na sua crosta de superfície lisa ou contendo fendas ou rachaduras, na observação da consistência e aspecto de sua massa, na sua cor, na regularidade dos olhos que apresente, na observação de seu sabor que deve corresponder e ser *próprio* ao tipo a que pertença, não devendo nunca ser nem *amargo* e nem *muito picante*, apresentando cheiro *agradável característico* do tipo, não sendo nunca *fétido* ou *desagradável* de modo a revelar no produto um princípio de *alteração* ou *putrefação*.

Exemplificando o caso dos licores, dos xaropes, das aguardentes e demais, onde, muitas vezes, o simples aspecto, as suas colorações típicas, bem como seus aromas e sabores apropriados já bastariam para de início comprovar cabalmente a classificação e muitas vezes a impugnação legal desses produtos. Inúmeros exemplos como esses poderiam ainda ser citados para demonstrar com nitidez o valor e o inestimável auxílio que tais características trazem ao analista. Embora alegando-se o caráter pessoal a que muitas vezes estão afetadas tais observações, o técnico bem treinado adquire aptidões para o assunto, resolvendo-o geralmente com grande facilidade. Somos, portanto, de parecer que tais provas devem continuar a encabeçar os paradigmas analíticos de todos os produtos alimentícios e bebidas. Somos ainda de parecer que essas características sejam mantidas nos Códigos e Regulamentos, como uma garantia e uma segurança na produção e aprovação de gêneros alimentícios genuínos e perfeitos, dentro de um critério sensato e justo. Reconhecemos, entretanto, que muitas vezes surgem difi-

culdades para exprimir-se com a devida justeza e precisão, o sabor, o cheiro e igualmente a côr de um determinado produto. Tais são as variedades caprichosas de tons, as variedades de odôres muitas vêzes inexplicáveis, de sabores exquisitos e sem fixidez certa, que o analista, mesmo bem treinado e possuindo boas qualidades degustativas, olfativas e visuais, sente dificuldades no momento de resolver o assunto. Grande seria, pois, a necessidade do estabelecimento de normas que, de qualquer modo, servissem, favorecessem ou facilitassem aos técnicos o desencargo e cumprimento exato e uniforme de tais características, principalmente nos momentos difíceis. Para isso, pensamos em estabelecer um quadro cromático como o que se acha anexado, contendo padrões colorimétricos onde, para cada tonalidade diversa, correspondesse uma determinada expressão de côr. Ao lado dêsse quadro cromático, pensamos também em estabelecer uma série de expressões que lembrassem e definissem os diversos e principais tipos de sabores que os gêneros alimentícios pudessem apresentar, quer quando em boas condições de conservação, quer quando alterados ou decompostos. Do mesmo modo com referência ao cheiro e ao aspecto, que apesar de também ser muito variado nos alimentos e bebidas, poderia ter uma norma típica baseada numa série de expressões mais comuns dentre as quais o técnico pudesse se basear para o bom desempenho de sua missão.

Essas expressões referentes às tonalidades coloridas, aos odores e aos sabores dos alimentos e bebidas, poderão ainda ser complementados com outras expressões indicativas da intensidade de tais características. Assim, poderíamos dizer, referindo-nos a um vinagre: líquido de côr *ligeiramente rósea*, de aroma *fortemente acético* e gôsto *ácido acentuado*; no caso de um açúcar aromatizado, diríamos: pó fino de côr *branco acinzentada*, com gôsto *adocicado* e cheiro *típico de vanilina*; com referência a um xarope: líquido denso de côr *vermelho-violácea*, com sabor *dôce-aromático* e cheiro de *essência de groselha*; ou ainda, num caso de geléia diríamos: massa gelatinosa de côr *amarelo-alaranjada*, de sabor *ácido-adocicado* e cheiro típico de laranja.

O técnico, de posse desta série de exemplos padrões que poderá ser acrescida de muitos outros terá, ao analisar alimentos e bebidas, facilitada a sua tarefa, pois com a consulta de tabelas explicativas e auxiliares, poderá resolver qualquer dificuldade, escolhendo e adotando, para cada caso, as características organoléticas de tão indiscutível e insofismável utilidade em exames bromatológicos.

CONCLUSÕES

1. O exame organolético representa na análise de alimentos e bebidas grande importância por indicar de antemão ao analista a espécie e qualidade do produto analisado.

2. Tal exame deve, portanto, continuar a figurar nos Códigos e Regulamentos Bromatológicos, afim de que os mesmos exijam taxativamente que todos os alimentos e bebidas correspondam às características dos produtos típicos.

3. O exame organolético sendo o primeiro que se procede numa análise bromatológica, deve sempre encabeçar os mapas e paradigmas analíticos dos diversos alimentos e bebidas.

4. Com o auxílio de padrões de côres e expressões próprias e adequadas, os caracteres organoléticos poderão ser expressos com maior facilidade, dando-se aos mesmos certa uniformidade e coerência e permitindo dêsse modo distinguir-se claramente o que é bom e próprio do que é mau e impróprio.



Branca



Branco-pérola



Branco-marfim



Branco-cinza



Cinzeno-clara



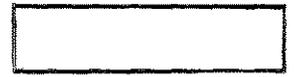
Cinzena



Cinzeno-escura



Cinzeno-esverdeada



Amarelo-clara



Amarela



Amarelo-palha



Amarelo-ouro



Amarelo-suja



Amarelo-ambar



Amarelo-alaranjada



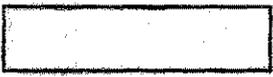
Amarelo-esverdeada



Amarelo-pardacenta



Alaranjado-clara



Alaranjada



Alaranjado-escura



Marron-clara



Marron



Marron-escura



Marron-amarelada



Marron-esverdeada



Marron-avermelhada



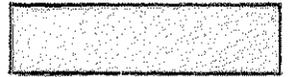
Róseo-clara



Rósea



Róseo-avermelhada



Róseo-escura



Róseo-violácea



Vermelha



Vermelho-escarlata



Vermelho-vinhosa



Vermelho-cereja



Vermelho-alaranjada



Vermelho-pardacenta



Vermelho-carmenzim



Vermelho-fucsina



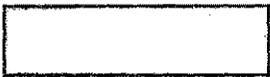
Vermelho-violácea



Azul-clara



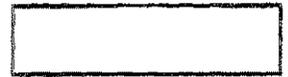
Azul



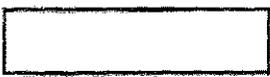
Azul-violácea



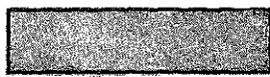
Azul-esverdeada



Verde-clara



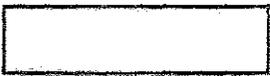
Verde-esmeralda



Verde-folha



Verde-oliva



Verde-amarelada



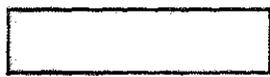
Verde-azulada



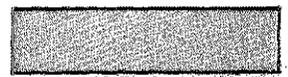
Violeta-clara



Violeta



Violeta-azulada



Violeta-avermelhada

QUADRO DOS PRINCIPAIS SABORES E AROMAS APRESENTADOS
PELOS ALIMENTOS E BEBIDAS

SABORES	AROMAS
1 — Ácido	1 — Ácido
2 — Acre	2 — Acre
3 — Acético	3 — Acético
4 — Adocicado	4 — Alcoólico
5 — Adstringente	5 — Aliáceo
6 — Alcalino	6 — Amoniacal
7 — Alcoólico	7 — Aromático
8 — Aliáceo	8 — Azêdo
9 — Almisarado	9 — Cáustico
10 — Amargo	10 — Defumado
11 — Ardente	11 — Enfumaçado
12 — Aromático	12 — Etéreo
13 — Azedo	13 — Excitante
14 — Defumado	14 — Fermentado
15 — Doce	15 — Fétido
16 — Enfumaçado	16 — Inodor
17 — Insípido	17 — Insuportável
18 — Intragável	18 — Irritante
19 — Fermentado	19 — Metálico
20 — Ferruginoso	20 — Mofado
21 — Insosso	21 — Nauseante
22 — Metálico	22 — Nauseabundo
23 — Nauseante	23 — Picante
24 — Picante	24 — Penetrante
25 — Putrefato	25 — Putrefato
26 — Rançoso	26 — Suave
27 — Salgado	27 — Sulfídrico
28 — Salino	28 — Sulfuroso

QUADRO III

QUADRO DOS PRINCIPAIS ASPECTOS
APRESENTADOS PELOS ALIMENTOS
E BEBIDAS

Bastões	
Barras	
Beijú	
Blocos	
Bombons	
Caramelos	
Compotas	
Comprimidos	
Confeitos	
Cristais	
Cristalizado	
Crostras	
Drágeas	
Extrato	{ concentrado dessecado mole fluido xaroposo
Flocos	
Flocos secos	
Frutos	
Gelêa	
Granulados	
Grãos	
Lâminas	
Líquido	{ consistente com depósito com precipitado denso efervescente espumante fermentado fluido límpido oleoso opalescente translucido turvo xaroposo
Massa ou Pasta ..	{ butirosa com ovos compacta consistente cozida crua dura elástica esfarelenta fresca friável fundida gelatinosa gomosa gordurosa homogênea irregular macia mole oleosa semi-dura seca pastosa prensada pulverulenta recheada úmida untosa
Palhetas	
Pastilhas	
Pérola	
Pó	{ áspero cristalino impalpável fino granuloso grosso
Poipa	
Pralinés	
Raspas	
Sementes	
Taboinhas	

EFICIÊNCIA DOS MEIOS DE ENRIQUECIMENTO DE KAUFFMANN E DE GLICERINA-CLORETO DE SÓDIO NO ISOLAMENTO DA EBERTHEL- LA TYPHOSA

SÍLVIO SOARES DE ALMEIDA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

AMÉLIA PACHECO TRIGO

Técnica de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

A pesquisa de bactérias patogênicas nas fezes é realizada em três fases sucessivas: na primeira procura-se preservar ou enriquecer o germe que se tem em vista isolar; na segunda fase semeia-se o material em estudo em meios de isolamento adequados; finalmente procede-se à identificação das colônias isoladas. Neste trabalho será considerada somente a primeira dessas fases — a de preservação ou enriquecimento — em relação ao isolamento do bacilo tífico.

Para o enriquecimento do bacilo tífico nas fezes, este Instituto utiliza a solução de glicerina a 30% em solução de cloreto de sódio a 0,6%. As fezes enviadas ao laboratório são emulsionadas nessa solução de glicerina e esta é deixada à temperatura ambiente por 24 horas; após esse espaço de tempo o material é então semeado nas placas.

O meio de glicerina-cloreto de sódio para a preservação do espécime fecal foi proposto por Teague e Clurman¹, baseados no fato de que a demora de algumas horas, desde que as fezes são colhidas até que sejam examinadas, acarreta um crescimento abundante de outros germes não patogênicos, o que dificulta grandemente ou torna mesmo impossível o isolamento do bacilo tífico. Segundo estimativa de Ficker e Hofmann² só é possível o isolamento dos bacilos tíficos quando estes se encontram numa proporção de 1/300 em relação às outras bactérias fecais. Para o material procedente de localidades afastadas e que, portanto, só chegava ao laboratório com um inevitável retardo, foi então sugerido que as fezes logo após terem sido emitidas, fossem conservadas na glicerina; esta impedia

a exagerada proliferação dos germes intestinais comuns e permitia a obtenção de resultados positivos em material retardado vários dias, e mesmo várias semanas³. Importa acentuar então que a glicerina foi proposta apenas para a conservação do material durante o trajeto dêste para o laboratório, e não como processo de enriquecimento posterior à chegada das fezes ao local de exame.

Um primeiro objetivo dêste trabalho foi, então, verificar se haveria vantagem em semear na glicerina as fezes já recebidas pelo laboratório, e deixar a glicerina 24 horas à temperatura ambiente, ou se os resultados seriam melhores utilizando-se a glicerina apenas como meio de suspensão, e procedendo-se a uma semadura imediata nos meios de isolamento. Um segundo objetivo foi comparar a eficiência do meio de Teague e Clurman com o meio de tetratationato-verde brilhante, proposto por Kauffmann⁴ para o isolamento de Salmonelas, e que na experiência pequena dêste autor parecia também apropriado para o enriquecimento do bacilo tífico.

MATERIAL E MÉTODOS

Êste estudo foi realizado em 200 amostras de fezes que representam pouco menos de metade das que foram enviadas ao laboratório para pesquisa de portadores de bacilos tíficos, no período de Abril a Outubro de 1945. O material procedia na sua maior parte do Hospital de Isolamento Emílio Ribas e de Centros de Saúde do interior do Estado.

Em cada um dos casos foram efetuados 4 exames, da maneira seguinte: 1) dois exames com o material semeado em glicerina; o primeiro ao fim do tempo máximo de 2 horas e o segundo após 24 horas de permanência da glicerina à temperatura ambiente; o contato das fezes com a glicerina pelo prazo de duas horas corresponde praticamente a uma semeadura imediata, pois nesse curto espaço de tempo é difícil admitir-se qualquer ação inibitória. 2) dois exames com o material semeado em meio de Kauffmann, sendo o primeiro realizado ao fim de 24 horas de incubação a 37° e o segundo ao fim de 5 dias, também na estufa a 37°. O enriquecimento em Kauffmann pelo espaço de 5 dias demonstrou ser útil para o isolamento de Salmonelas, na experiência de Hormaeche e Surraco⁵; por esta razão o mesmo processo foi experimentado para a *Eberthella typhosa*.

Conforme a técnica de rotina dêste Instituto⁶ utilizaram-se para cada caso dois meios de isolamento: o de Calazans-Rangel

Pestana e o meio de Holt-Harris e Teague. As colônias isoladas nesses meios eram semeadas em tríplice açúcar de Krumwiede, e após 24 horas de estufa procedia-se à aglutinação com sôro tífico.

RESULTADOS

Nos 200 casos examinados o bacilo tífico foi isolado 78 vêzes. Os resultados obtidos com os diferentes processos de enriquecimento estão representados no quadro seguinte, no qual o número de casos positivos pelo uso combinado de todos os meios é considerado como representando um isolamento de 100%.

Total de casos positivos	78	100%
Glicerina 2 horas	58	74,2%
Glicerina 24 horas	56	71,2%
Kauffmann 24 horas	58	74,2%
Kauffmann 5 dias	28	35,8%

Êsses dados revelam que a glicerina em 2 horas e o Kauffmann em 24 horas, permitem o isolamento de maior número de casos positivos do que a glicerina em 24 horas; o enriquecimento em Kauffmann durante 5 dias constitue o processo menos eficiente. Analisando-se os resultados obtidos com a combinação dos dois meios estudados, os resultados são os seguintes:

Total de casos positivos	78	100%
Glicerina 2 hs. glicerina 24 hs.	61	78,2%
Glicerina 2 hs. Kauffmann 24 hs. ..	72	92,3%
Glicerina 24 hs. Kauffmann 24 hs.	72	92,3%
Kauffmann 24 hs. Kauffmann 5 dias	62	79,4%

Êsse quadro demonstra que a realização de dois exames, com o material semeado em um determinado meio, aumenta o número de resultados positivos que tinham sido obtidos por um só exame. Êste aumento é ainda maior quando os meios que se utilizam são diferentes. Assim, a realização de dois exames com o material semeado na glicerina, e nela tendo permanecido respectivamente 2 e 24 horas, aumentou de 58 para 61 o número de resultados positivos, enquanto que a execução de dois exames, combinando-se a glicerina com o meio de Kauffmann, elevou o número de casos positivos de 58 para 72.

COMENTARIO

A superioridade da glicerina de 2 horas sôbre a de 24 horas era esperada, em vista do que se conhece sôbre a ação dêsse meio relativamente ao isolamento do bacilo tífico nas fezes. Teague e Clurman já tinham observado que a ação inibitória da mistura de glicerina-cloreto de sódio, embora se exercendo com mais intensidade sôbre os bacilos fecais não patogênicos, também se fazia sentir sôbre os bacilos tíficos. Nas primeiras 48 horas esta ação inibitória não era muito intensa, mas acentuava-se depois dêsse tempo. Confirmação do efeito nocivo da glicerina sôbre o bacilo tífico foi fornecida por Havens e Dehler⁷. A permanência na glicerina é, portanto, desvantajosa, após a chegada do material ao laboratório. Desde que existe a possibilidade dêsse material ser semeado imediatamente nos meios de isolamento apropriados, deve-se dar preferência à semeadura imediata, processo que não só aumenta as possibilidades de se revelar a presença dos germes, como também permite que se obtenha um resultado com antecedência de 24 horas.

O meio de Kauffmann para enriquecimento de Salmonelas, após a incubação por 24 horas, deu resultados idênticos aos da glicerina de 2 horas. Estes dados são comparáveis aos obtidos por Rangel Pestana e Faraco⁶ em grande número de exames realizados. Este meio não deve então ser considerado como particularmente favorável para o enriquecimento do bacilo tífico das fezes, possivelmente, como sugerem Knox⁸ e colaboradores, por conter um excesso de tiosulfato ao qual a *Eberthella typhosa* é mais sensível do que as salmonelas. O excesso de tiosulfato, além de prejudicial ao bacilo tífico, tornaria o meio menos apropriado por favorecer o desenvolvimento dos proteus; realmente, na nossa experiência, um crescimento exagerado dêstes germes foi frequente no material enriquecido em Kauffmann, prejudicando muitas vêzes o isolamento das placas.

CONCLUSÕES

1. A semeadura imediata das fezes enviadas ao laboratório para pesquisa de bacilos tíficos, dá resultados melhores do que os que são obtidos após permanência das fezes na glicerina pelo espaço de 24 horas à temperatura ambiente.

2. O meio de enriquecimento de Kauffmann não se mostrou superior à sementeira imediata.

3. A associação dos meios de glicerina e de Kauffmann é vantajosa; no material estudado, a combinação desses dois meios permitiu o isolamento de 92,3% do total de casos positivos isolados.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — TEAGUE, O. e CLURMAN, A. W. — 1916 — *Journ. Inf. Dis.*, 18: 653.
- 2 — FICKER e HOFMANN, — 1904 — *Arch. f. Hyg.*, 49: 229.
- 3 — GILBERT, R., COLEMAN, M. B. e ZIMMER, M. — 1926 — *Am. Journ. Publ. Health*, 16: 743.
- 4 — KAUFFMANN, F. — 1935 — *Zeit. fur. Hyg.*, 117: 26.
- 5 — HORMAECHE, E. e SUBRACO, N. L. — 1941 — *Arch. Urug. de Med. Cir. y Esp.*, 18: 485.
- 6 — RANGEL PESTANA, B. e FARACO, M. J. — 1942 — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2: 269.
- 7 — HAVENS, I. C. e DEHLER, S. A. — 1924-25 — *Journ. Lab. Clin. Med.*, 10: 238.
- 8 — KNOX, R., GELL, P. G. H. e POLLOCK, M. R. — 1943 — *Journ. Hyg.*, 43: 147.