

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

VOL. VI • OUTUBRO DE 1946 • NUM. 2



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

OUTUBRO DE 1946

N.º 2



SÃO PAULO — BRASIL
AV. DR. ARNALDO, 3

S U M Á R I O

ADMAR VAZ DE SAMPAIO — Contribuição para a dosagem do tanino nos vinhos	107
ADMAR VAZ DE SAMPAIO — Considerações sôbre dados analíticos de bebidas em geral	116
CORDÉLIA NÓBREGA DUARTE e MARIA DE LOURDES BARBOSA — O problema do descoramento de bebidas e conexos	122
EMMA DE LIMA — Algumas notas sôbre a seleção de um meio de cultura para os germes do grupo "Lactobacillus"	132
FANNY S. TABACOW HIDAL — Colesterol — Da determinação em ovos e produtos que contêm ovos	139
FLORIANO DE ALMEIDA, CARLOS DA SILVA LACAZ, DOMINGOS ANDREUCCI e OLGA DE BARROS — Frequência de cogumelos na vagina e importância dêsses microorganismos como agentes de vulvovaginites	149
J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR — Investigações sôbre alterações da estrutura vegetal pela ação do calor	183
JOSÉ CARLOS RIBAS e MANOEL DE BRITO E SILVA — Notas sôbre o cultivo do Meningococo — I. Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono	193
JOSÉ LOPES NETO — Variações nas Fórmulas Leucocitárias	204
LEÃO TIKER — Considerações sôbre análises de Whiskies	215
MANOEL DE BRITO E SILVA e JOSÉ CARLOS RIBAS — Notas sôbre o cultivo do Meningococo — II. Emprêgo do ácido paraminobenzóico	221
THEODÓSIO M. P. DA SILVA — Redutase e emprêgo do Resazurim nos exames de leite	228

CONTRIBUIÇÃO PARA A DOSAGEM DO TANINO NOS VINHOS

ADMAR VAZ DE SAMPAIO

Químico do Instituto Adolfo Lutz.

O ácido tânico, mais comumente chamado tanino, é o nome genérico de um grupo de produtos muito encontrado nos caules, raízes, folhas, frutos e, particularmente, na casca de um grande número de vegetais.

O tanino existente na uva está localizado nas películas e pevides das sementes e sendo, portanto, encontrado nos vinhos em maior ou menor quantidade.

É adstringente e de um amargor um pouco pronunciado; colore em preto os sais de ferro; forma com a gelatina e a albumina, precipitados volumosos; dissolve-se no álcool fraco, e tem grande afinidade pela matéria corante do vinho, o que não se dá com os princípios corantes existentes nas outras frutas. F. Jean, já em 1876, observou que o vinho continha uma matéria adstringente especial que êle denominou, primeiramente, do oenotânico e que, mais tarde, foi designado por ácido oenogálico, para o distinguir do tanino verdadeiro fornecido pelas pevides ou engaços de cachos de uva. Segundo êste químico, o ácido oenogálico é caracterizado pela cor verde que êle toma em presença (contacto) do perclorato de ferro e por sua inocuidade sobre a gelatina que não precipita. E não é menos verdade que todos os vinhos tintos turvam-se ao contacto com a gelatina e a albumina, perdendo sua adstringência.

A presença do tanino no vinho é muito necessária, não somente como princípio conservador e tônico, mas, ainda como elemento próprio à clarificação do vinho, despojando do excesso do cremor de tartaro, matéria corante, mucilagem, fermento e etc.

Um vinho inteiramente desprovido de tanino, é muito mais susceptível de alteração, do que aquele que dele está provido, e é difícil contrair a doença conhecida sob o nome de gordura.

Eis porque, junta-se muitas vezes o tanino no vinho, quando êle não o contenha em quantidade suficiente, sendo entretanto muito importante conhecer-se a quantidade que êle contenha. A quantidade de tanino existente nos vinhos é variável; nos vinhos tintos e

adstringentes êsse teor atinge e às vêzes ultrapassa de 2,0 g. por litro; nos vinhos licorosos, Porto, Bordeaux êsse teor varia entre 0,5 a 1,5 g. por litro.

Para a dosagem das matérias tânicas do vinho ou adstringentes, foi aconselhado um grande número de processos que, aplicados ao mesmo produto ou substâncias, não deram resultados satisfatórios.

Os diversos processos utilizados podem ser classificados em três grupos distintos:

1.º grupo — Dosagem do tanino por uma pele animal ou por gelatina pura, processos usados por Davy (pele), Hammer (pele e areómetro), Muntz e Rampacher (pele e densidade), Fehling (gelatina), Müller (gelatina e alumen), Schulze (gelatina e carbonato de amônio) e etc.

2.º grupo — Dosagem por precipitação com a ajuda de sais metálicos ou de alcalóides: processo de Pedroni, Gerland (anético), Fleck, Wolf, (acetato de cobre), Handtke (acetato de ferro), Cribam, Schmidt (acetato de chumbo), Perroz (cloreto de estanho e carbonato de amônio) e etc.

3.º grupo — Dosagem por absorção do oxigênio livre; processos Mittenzwei, Terreil; ou por ação redutora; processos Commaille (ácido iódico), Prud'homme (hipoclorito de cálcio), Monier, Neubauer, Loewenthal, Pouchet (permanganato de potássio), Carpeni (acetato de zinco amoniacal e permanganato de potássio).

Entre os diversos processos acima citados, são apontados como que tenham dado resultados satisfatórios, os de Pedroni, Carpeni, e M. Sisley. Da grande maioria destes processos, poucos são os que podem ser aplicados aos vinhos, devido à presença de certas substâncias oxidáveis pelo permanganato de potássio, tais como o álcool, a glicerina, etc, que falseiam os resultados.

Processo Carpeni: — A. Carpeni (Gazzetta, 1875,5,129) recomenda para a avaliação do tanino nos vinhos, o uso de uma solução de acetato de zinco amoniacal, contendo um grande excesso de amônia; êsse reagente tem a propriedade de formar, com o oenotânico, um tanato de zinco, completamente insolúvel em água, amônia, e num excesso de reagente; não forma precipitado com álcool, ácido málico, ou ácido tartárico, tartratos, glicerina, gelatina, albumina, ou com sais de ferro, contidos em ácidos orgânicos. Com os ácidos gálicos ou sucínico, dextrose e os sais de alumínio, forma precipitados solúveis em um excesso de reagente e amônia. Tratando-se o vinho com excesso de acetato de zinco amoniacal, forma-se um precipitado, que consiste em tanato de zinco, misturado com uma pequena

quantidade de matéria corante. O vinho é aquecido até perto de seu ponto de ebulição, para aglomerar o precipitado, o qual, após ter esfriado completamente, é filtrado e lavado com pequena quantidade de água fervente, para remover as matérias corantes. O precipitado é dissolvido em ácido sulfúrico diluído, e a solução assim obtida é titulada com permanganato "Standard" e índigo.

Os resultados obtidos com êsse método são confirmados como sendo corretos, quando se trata de vinhos.

Processo M. Sisley — Neste processo, o autor preferiu isolar o tanino pelo acetato de zinco amoniacal, à frio; mas, operando à frio, em lugar de aquecer, como fazia Carpeni, que foi o primeiro a indicar êste processo, êle dissolvia o precipitado obtido, no ácido sulfúrico e dosava pelo permanganato de potássio em presença de índigo. O autor preparava a solução de acetato de zinco amoniacal, dissolvendo à quente 40,0 de óxido de zinco em 50 ml. de água destilada e 65 ml. de ácido acético cristalizável e, após resfriamento, completava o volume de 500 ml. com amoníaco a 22°.

Processo de M. J. PI. — Êste autor em seu processo empregava as seguintes soluções:

1.º) Uma solução de acetato de zinco amoniacal, preparada dissolvendo-se 4,5g. de acetato de zinco cristalizado em um pouco de água destilada e adicionada de amoníaco até que o precipitado formado, seja redissolvido; completa-se em seguida o volume de 200ml.

2.º) Um licor titulado de permanganato de potássio, contendo 0,558g. dêste sal por litro; 1ml. desta solução, corresponde a 0,001g. de tanino puro.

3.º) Uma solução sulfúrica de índigo, tratando-se 1,5 g de indigotina sublimada por 30,0 g. de ácido sulfúrico puro. Após alguns dias de contácto, completa-se com água destilada o volume de 1 litro; filtra e titula-se com a solução de permanganato de potássio.

Opera-se sôbre 10 ml. de licor de índigo, adicionado de 10 ml de ácido sulfúrico puro; completa-se em seguida com água destilada, o volume de 1 litro. A solução é colocada em um grande balão ou frasco de precipitação, colocando-se por baixo, uma folha de papel branco.

Deita-se gôta à gôta a solução de permanganato de potássio contida em uma bureta, agitando-se o líquido, até a aparição de uma côr amarela, indicando o fim da operação. O número de ml gastos,

representa o título da solução de índigo. Como no método Carpeni, prepara-se o tanato de zinco, precipitando 10 ml de vinho por 5 ml da solução de acetato de zinco amoniacal; evapora em banho-maria, junta-se água fervente e recolhe-se o precipitado sobre um filtro. Lava-se o precipitado com água quente e dissolve-se em ácido sulfúrico fraco ($10^0/_{00}$) e determina-se como precedentemente a quantidade de solução de permanganato necessária para oxidar o índigo e o tanino contido. Conhecendo-se o título de solução de índigo e o do licor de permanganato, é fácil calcular-se o tanino dosado.

Métodos de oxidação para análise do tanino. — Colocamos 5 ml da solução a analisar em uma cápsula de porcelana, diluindo-os mediante adição de 750 ml de água destilada e 20 ml de solução de índigo; um litro do mesmo deve conter 5,0 g de carmim de índigo puríssimo e 50 ml de ácido sulfúrico concentrado. O carmim de índigo (sulfo-indigotato de sódio) deve ser de qualidade tal, que a solução, quando, oxidada pelo permanganato tome uma coloração amarela, pura, livre de traços marrons ou alaranjados. O índigo-púrpura, que dá produtos de oxidação marrons, interfere na determinação correta do resultado da análise. A solução de índigo deve ser de uma concentração tal, que diluída com 750 ml de água, requeira de 14 a 16 ml de permanganato "Standard" para a sua oxidação. A solução contendo 1,0 g. de permanganato de potássio por litro, então é deitada, lentamente, gôta a gôta, mediante constante agitação, até que o líquido fique transparente; quando, após isto, continuarmos a adição cuidadosamente, apresenta uma coloração rósea em seus bordos. A titulação é repetida e nos dois casos juntamos o permanganato requerido. Empregando o processo de oxidação, o volume de permanganato necessário para o tanino, não deve em nenhum caso exceder a $2/3$ da quantidade reduzida pelo índigo. Se o resultado da titulação nos mostrar que a quantidade proporcional foi excedida, a experiência deve ser repetida com menor quantidade de solução de tanino.

Processo de M. Aimé Girard — Este processo é baseado sobre a propriedade que possui o tecido animal de fixar o tanino. M. Aimé Girard, emprega de preferência a corda ré de violão, de tripa de carneiro.

Reúnem-se 4 a 5 destas cordas, cortadas em fragmentos, e pesa-se 1,0 g. para os vinhos fracos, 5,0 g. para os vinhos tintos bem coloridos; a quantidade pesada é posta a umidecer na água durante 4 a

5 horas; as tripas se amolecem e se incham, e podem se distorcer facilmente com a mão; separam-se em seguida as cordas pesadas e colocam-se em 100 ml de vinho a analisar. Depois de 24 ou 48 horas de contacto, a matéria corante desapareceu completamente; verifica-se por meio de perclorato de ferro, a inexistência de tanino no vinho; lavam-se depois os fragmentos da corda por duas ou três porções de água destilada e secam-se em temperatura de 40° a 45° em um vaso chato. Quando perder sua propriedade adesiva, passa-se para um pisa filtro com tampa e acaba-se a secagem na temperatura de 100°C; fecha-se o frasco, esfria-se em dessecador e pesa-se.

O aumento de peso verificado nas cordas (deduzido o da umidade antes da dosagem) representa a quantidade de matéria corante e oenotanino contido no vinho.

Processo do Dr. Casamada — Para este processo são necessárias as seguintes soluções:

I — Solução titulada de permanganato de potássio N/100;

II — Solução de anil (carmin de índigo); dissolver 3,0 g. em água destilada, até completar um litro; conservar em temperatura de 70°C em frasco bem fechado;

III — Solução de perclorato de ferro a 10%;

IV — Solução de amoníaco a 10%;

V — Solução de ácido sulfúrico a 1:3.

a) Mede-se com auxílio de uma pipeta, um ml de vinho e passa-se para um balão de um litro; adiciona-se então 5 ml da solução de ácido sulfúrico; junta-se água destilada até 1 litro, mais ou menos; em seguida, por meio de uma bureta, junta-se a solução de permanganato de potássio. A cor azul do líquido passa ao verde e depois ao amarelo; junta-se então com muito cuidado, isto é, gota a gota, a solução de permanganato, até que a cor passe ao amarelo-ouro; lê-se na bureta o número de ml gastos.

b) Medem-se 5 ml de vinho que são diluídos com 10 ml de água destilada; adicionam-se 5 ml da solução de perclorato de ferro, agita-se, juntando imediatamente 5 ml de amoníaco; filtra-se então em um filtro bem seco.

Tomam-se 5 ml do filtrado incolor (equivalente a 1 ml de vinho) e dosa-se como em *a*. Lê-se o número de ml gastos em *b*.

A diferença entre a primeira determinação e a segunda, corresponde ao tanino contido em 1 ml de vinho.

Depois de passarmos em revista os diversos processos com aplicação direta à dosagem do tanino existente nos vinhos já usados dezenas de anos, apresentamos o método ou técnica oficial, que há já alguns anos vem sendo obrigatoriamente usado.

No Capítulo do Regulamento da Fiscalização da Produção, Circulação e Distribuição do Vinho e Derivados no Território Nacional, de acôrdo com a lei n. 549, de 20 de outubro de 1937, diz o artigo 73:

— Serão obrigatoriamente adotados para os efeitos dêste Regulamento em todo o Território Nacional, os métodos de análises de vinhos e produtos derivados, abaixo especificados.

Entre as determinações obrigatórias em análises completas ou prévias, figura a dosagem do tanino, cuja técnica mencionaremos em seguida:

Dosagem do tanino

Técnica — Evaporam-se 100 ml de vinho até cêrca de 1/3 de seu volume e recomponha-se êste com água destilada após o seu arrefecimento. Tomam-se 10 ml dêste líquido isento de álcool e colocam-se em uma cápsula de porcelana de 2 litros de capacidade, junta-se cêrca de 1 litro de água e exatamente 20 ml da solução de índigo preparada segundo indicação infra. Adiciona-se então da solução titulada de permanganato de potássio, 1 ml de cada vêz até que a coloração se torne amarelo ouro. Marca-se o número de ml de permanganato gastos: N. 1. Tomam-se em igual capsula outros 10 ml do líquido primitivo isento de álcool, junta-se carvão animal lavado e deixa-se tudo por 15 a 20 minutos; filtra-se, lava-se com água, adiciona-se 1 litro de água e 20 ml de índigo e titula-se com permanganato. Marca-se o número de ml gastos: N. 2. Ter-se-á N. 1 menos N. 2 igual N. (número de ml de solução de permanganato necessário para oxidação do tanino e da matéria corante de 10 ml do vinho).

Soluções — *Permanganato de potássio* a 1,333 g por litro controlada por meio de ácido oxálico N/10 (10 ml dêste diluidos a 500 ml, são aquecidos a 60°C e misturados com 20 ml de ácido sulfúrico a 1:3 em volume); 10 ml de ácido oxálico N/10 correspondem a 0,008 g de oxigênio e a 0,0623 g de ácido quaercio-tânico.

Sulfo indigotato de sódio preparado em balão de litro por dissolução de 6,0 g de sal Glueber & Cia., Leipzig, ou Gehe & Cia., de Dresden, em 500 ml de água, a quente; resfriado o líquido, juntam-

se 50 ml de ácido sulfúrico concentrado, eleva-se o volume a litro e filtra-se.

Carvão animal lavado — Fervem-se 100,0 g de material bem pulverizado em sucessivas quantidades de ácido clorídrico à 1:3, filtra-se e lava-se o resíduo com água fervente até ausência de cloretos.

Conserva-se o carvão dentro d'água.

Devido às falhas ou resultados duvidosos apresentados pelos diversos processos, inclusive o oficial, de uso obrigatório, resolvemos então estudar o assunto para conseguirmos um método, em que os inconvenientes já apontados, como dosagem da glicerina, cola, gelatina, albumina, etc., como sendo tanino, fossem eliminados.

Aproveitando as pequenas folgas de nossos trabalhos diários, fomos coligindo dados para que em momento oportuno, pudessemos apresentar um trabalho onde aparecessem as conclusões obtidas; é o que fazemos agora.

Passamos em revista os vários processos aqui enunciados e comparando os resultados obtidos, fomos aos poucos, abandonando um por um, até resolvermos estabelecer um método novo, aproveitando algumas soluções utilizadas em vários deles, com algumas modificações.

As soluções utilizadas em nossa técnica, foram as seguintes:

a) *Solução de acetato de zinco amoniacal* (indicada por M. Sisley), que é preparada do seguinte modo: Dissolve-se a quente 40,0 g de óxido de zinco p. a. em 50 ml de água destilada e 65 ml de ácido acético cristalizável, e após resfriamento, completa-se o volume a 500 ml com amoníaco a 22°.

b) *Solução de sulfo indigotato de sódio* (Indicada por Carpeni), que é preparada do seguinte modo: Dissolve-se 5,0 g de indigo em água destilada, junta-se 50 ml de ácido sulfúrico concentrado e após resfriamento, completa-se o volume de 1 litro com água destilada.

c) *Solução de permanganato "Standard"*, que é preparada, dissolvendo-se 1,0 g de permanganato de potássio em água destilada e completado o volume de 1 litro, (1 ml desta solução corresponde a 0,001 g de tanino).

d) *Solução de tanino*, preparada, dissolvendo-se 1,0 g de tanino puro e sêco em 1 litro de água destilada.

e) *Solução de ácido sulfúrico a 1%*.

Técnica — A técnica por nós observada, foi a seguinte:

Colocamos em um copo de precipitação (Becker) 1 ml de vinho, 20 ml de água destilada (para diluir aumentando o volume e facilitando a precipitação), algumas gotas da solução de acetato de zinco amoniacal (4 gotas, mais ou menos), o necessário para a precipitação do tanino, podendo, em caso de dúvida, serem juntadas algumas gotas a mais, sem que o precipitado formado seja dissolvido; filtra-se, em seguida lava-se várias vezes o precipitado formado com água fervente, afim de desembaraçá-lo de outras substâncias estranhas; após estas lavagens, despresando-se estas águas, dissolvemos o precipitado com a solução de ácido sulfúrico a 1%, que é juntada aos poucos, por meio de uma pipeta, gastando-se mais ou menos, de 20 a 30 ml; em seguida, a solução é colocada em uma cápsula de porcelana de capacidade de 2 litros, ou frasco de Erlenmeyer e juntamos 750 ml de água destilada; por meio de uma bureta, colocamos 10 ml da solução de sulfoindigotato de sódio e depois, por meio de uma bureta igual ou a mesma, junta-se aos poucos, gota a gota, a solução de permanganato de potássio "Standard", agitando-se sempre o líquido afim de homogeneizá-lo; a princípio a coloração que é azul, passa aos poucos ao verde, em seguida ao amarelo e finalmente à cor amarelo ouro.

A solução de índigo corresponde exatamente à solução de permanganato "Standard", isto é, 10 ml da solução de índigo são decolorados por 10 ml da solução de permanganato "Standard".

As conclusões por nós obtidas foram excelentes e achamos que será uma contribuição para a obtenção de um bom método, pois, além de ser de fácil e rápida execução, economisa reativo e pode ser determinado com pequenas quantidades de produto. As nossas determinações foram feitas com 1 ml e 10 ml de vinho; os resultados obtidos com essas quantidades foram os mesmos.

Foram por nós preparadas diversas amostras de vinho artificial e nelas juntadas quantidades variáveis de tanino, quantidades estas, que foram acusadas por essa técnica por nós adotada.

Concluindo, apresentamos um quadro comparativo de 24 determinações de tanino, feitas em vinhos de diversos tipos e procedência, onde poderão avaliar a diversidade de resultados obtidos.

entre o método oficial, o de Casamada, que a princípio nos pareceu bom e que depois resolvemos abandonar e o método por nós compilado e adaptado.

Amostras	Metodos		
	Oficial	Modificado	Casamada
Vinho tinto	31,875 ‰	1,80 ‰	4,988 ‰
Vinho tinto	23,051 ‰	1,30 ‰	2,909 ‰
Vinho branco	12,460 ‰	0,70 ‰	2,041 ‰
Vinho de laranjas	2,492 ‰	0,40 ‰	2,012 ‰
Vinho branco	1,869 ‰	0,30 ‰	2,000 ‰
Vinho tinto	26,166 ‰	1,40 ‰	3,594 ‰
Vinho clarete	20,559 ‰	0,20 ‰	3,024 ‰
Vinho tinto	26,789 ‰	3,90 ‰	4,532 ‰
Vinho branco	8,722 ‰	1,20 ‰	
Vinho clarete	13,083 ‰	0,20 ‰	
Vinho branco	3,543 ‰	0,50 ‰	
Vinho branco P.	2,876 ‰	0,10 ‰	
Vinho branco N.	3,742 ‰	1,80 ‰	
Vinho branco	5,820 ‰	2,00 ‰	
Vinho branco moscatel	3,690 ‰	1,20 ‰	
Vinho branco	4,720 ‰	2,00 ‰	
Vinho branco	5,030 ‰	2,00 ‰	
Vinho rosado licoroso	2,040 ‰	0,00 ‰	
Vinho clarete	2,680 ‰	0,43 ‰	
Vinho clarete	8,670 ‰	1,90 ‰	
Vinho clarete	3,649 ‰	0,21 ‰	
Vinho clarete	5,962 ‰	0,47 ‰	
Vinho tinto	6,472 ‰	0,60 ‰	
Vinho tinto	6,420 ‰	0,59 ‰	

CONSIDERAÇÕES SÔBRE DADOS ANALÍTICOS DE BEBIDAS EM GERAL

ADMAR VAZ DE SAMPAIO,

Químico do Instituto Adolfo Lutz.

Ao apresentarmos êste nosso pequeno trabalho, organizado em alguns momentos de folga em nossos afazeres quotidianos de laboratório, temos apenas o intuito de mostrar pelos dados analíticos que possuímos, como os produtores e comerciantes dêstes produtos presam a saúde do povo.

Para não nos alongarmos muito e mesmo não chegarmos a conclusões verdadeiramente alarmantes, resolvemos consultar nosso arquivo e de lá tirarmos apenas os resultados analíticos correspondentes aos 3 últimos anos, ou sejam, 1943, 1944 e 1945.

Os dados que vamos apresentar são referentes a bebidas sem álcool (refrescos e xaropes), fraca e fortemente alcoólicas (cervejas, vinhos, licores, amargos, aperitivos, aguardentes de cana, conhaques, gim, wodka, whiskies) e ainda como produtos ligados diretamente às bebidas, como sejam aromas, essências e corantes.

As análises procedidas na 2.^a subsecção Bromatológica no decorrer do ano de 1943, foram em número de 698 (seiscentos e noventa e oito), das quais 254 (duzentas e cinquenta e quatro) foram prévias e 444 (quatrocentas e quarenta e quatro) fiscais, contrôle, inspeção e estudos.

Das 254 amostras apresentadas pelas partes interessadas para análise prévia, 148 foram aprovadas e 106 foram condenadas e dêstes produtos, destacamos os seguintes: aguardentes aprovadas 107; condenadas 51; refrescos aprovados 3, condenados 11; xaropes aprovados 21, condenados 23; licores aprovados 2, condenados 7.

O motivo principal da condenação das aguardentes foi justamente por apresentarem os componentes secundários muito baixos, pois o Regulamento Estadual estabelece um mínimo de 0,250 mg por 100 ml de álcool a 100% e um máximo de 0,800 mg de componentes secundários no mesmo álcool; os produtos puros, em geral apresentam em média seus componentes secundários entre

0,300 a 0,500 mg em 100 ml de álcool a 100%; aguardentes condenadas por possuírem o teor de componentes abaixo do mínimo, só o podem ser por deficiência técnica dos produtores ou então por fraude. Outro motivo também que pode ser enquadrado como deficiência técnica é o teor de cobre acima de 0,010 mg por litro de aguardente, que é o máximo permitido pelo Regulamento Estadual.

Nos refrescos, como guaraná, soda limonada, águas tônicas, etc, os dados analíticos condenatórios são vários, predominando em grande parte a falta de escrúpulos ou deficiência técnica, pois apresentavam-se turvos e com abundantes depósitos; nos guaraná, além destas causas, ainda outra importante — a quantidade de trimetilxantina na maioria dos casos correspondia apenas à metade do mínimo exigido pelo Regulamento e, nestas mesmas condições encontramos as águas tônicas de quinino, com os seus teores em quinino bem abaixo do mínimo exigido.

Nos xaropes, os motivos condenatórios são também vários, entre eles a densidade muito baixa, portanto um teor em sacarose muito baixo também, sendo esta a matéria prima e essencial; é muitíssimo comum o emprêgo de corantes derivados da hulha em grande excesso, talvez para impressionar melhor a freguezia; em muitos casos são corantes derivados da hulha não tolerados pelo nosso Regulamento, para gêneros alimentícios.

Nas 444 (quatrocentas e quarenta e quatro) amostras para análises de fiscalização procedidas no mesmo período, apresentaram os seguintes resultados: aprovadas 230, condenadas 214. Ainda desta vez, nas análises de fiscalização as aguardentes tomaram parte saliente, pois foram aprovadas 26 e condenadas 26; sendo também um dos motivos principais da condenação o teor em componentes secundários muito abaixo do fixado pelo Regulamento Estadual, assim como o teor em cobre acima do máximo tolerado pelo Regulamento, que é de 0,010 mg por litro de aguardente.

Outro produto que aparece com um teor condenatório alarmante, urgindo uma fiscalização rigorosa e permanente, são os corantes derivados da hulha, cujos fabricantes e representantes em sua maioria, não cumprem os preceitos legais, à respeito de análises e rotulagens com as denominações científica e comercial de uso corrente; das 50 amostras colhidas para análise de fiscalização, somente 12 lograram ser aprovadas, enquanto as 38 restantes foram con-

denadas, não por conterem impurezas e sim por não se enquadrarem entre os 12 corantes permitidos pelo Regulamento Estadual para serem usados em dose estritamente necessária à obtenção dos coloridos.

Nos vinagres, tanto de vinho, de cana ou de açúcar, os motivos condenatórios são diversos, como sejam: acidez, extrato sêco e cinzas, muito baixos; turvos, anguilulas vivas e mortas, etc. Das 21 amostras analisadas, 9 foram aprovadas e 12 condenadas. Os vinhos tintos também apareceram com um teor bem elevado em condenações, pois em 95 amostras analisadas, 47 foram aprovadas e 48 condenadas, sendo em sua maioria a acidez volátil muito elevada e também apresentando extrato sêco baixo.

Outros produtos que apresentam volume nas condenações são os xaropes, que aparecem com a densidade muito baixa, excesso de corantes derivados da hulha permitidos, em doses excessivas e, muitas vezes, corantes derivados da hulha, não permitidos para gêneros alimentícios.

Em 15 amostras analisadas, 13 foram condenadas e somente 2 foram aprovadas.

No ano de 1944, foram analisados 314 produtos, sendo aprovados 113 e condenados 201; dêste total, 202 foram de análises prévias e 112 de análises de fiscalização. Das análises prévias foram aprovadas 76 e condenadas 126; das 112 análises fiscais, 37 foram aprovadas e 75 foram condenadas. O teor de análises condenadas foi portanto muito elevado, tendo contribuído bastante para êsses resultados, as aguardentes, que num total de 94 amostras analisadas, entre prévias e fiscais, foram aprovadas 40 e condenadas 54. Os motivos condenatórios são sempre os mesmos, componentes secundários baixos, furfurol e cobre acima dos máximos tolerados pelo Regulamento (0,020 mg e 0,010 mg, respectivamente). Os corantes derivados da hulha nêsse mesmo período, concorreram com uma grande porcentagem de condenações, pois em 13 amostras apresentadas para análises prévias, 5 foram aprovadas e 8 condenadas; nas 24 amostras apresentadas para análises de fiscalização, 10 foram aprovadas e 14 condenadas. Os corantes condenados, não o foram por conterem impurezas, e sim por não serem tolerados para gêneros alimentícios pelo Regulamento em vigor.

Entre os outros produtos condenados, encontramos as essências artificiais, que em 10 amostras apresentadas para análises prévias e

de fiscalização, somente 1 logrou aprovação, sendo que as 9 restantes foram condenadas por não corresponderem ao Regulamento Estadual na parte dos caracteres organoléticos, substâncias tóxicas e corantes estranhos.

Em 18 amostras de licores analisadas, 13 foram condenadas, por conterem algumas o teor de componentes secundários elevados, portanto álcool impuro ou ordinário, empregados em sua preparação, teor de sacarose muito baixo, etc. Os vinagres apresentaram também uma porcentagem elevada de condações, pois em 12 amostras analisadas, somente 1 foi aprovada e as 11 restantes, condenadas por apresentarem caracteres organoléticos impróprios, acidez baixa, extrato sêco baixo também, turvos e alguns coloridos artificialmente por corantes derivados da hulha.

Os vinhos tintos também foram condenados em boa proporção, pois das 18 amostras enviadas para análise de fiscalização, 10 foram condenadas.

Em 17 amostras de xaropes analisados em análise prévia, 12 foram condenadas em sua maioria por apresentarem o teor em sacarose muito baixo e coloridos excessivamente por corantes derivados da hulha, permitidos.

Os refrescos (guaranás, soda limonada e água tônica), constituindo um total de 45 amostras, sendo que 37 para análise prévia e 8 para análise de fiscalização, tiveram como resultado 36 condações e somente 9 aprovações.

Como sempre, estes produtos apresentavam indícios de alterações, como depósitos, turvações, e em uma parte dos guaranás, além disso, apresentavam também um teor em trimetilxantina muito baixo.

No ano de 1945, foram analisados em nossa subsecção 434 amostras de produtos diversos, sendo aprovados 198 e condenados 236. Os produtos enviados para análise prévia foram em número de 198 amostras, sendo aprovadas 96 e condenadas 102; das 236 amostras enviadas para análise de fiscalização, 102 foram aprovadas e 134 condenadas. Por estes dados, vemos que nos anos de 1944 e 1945 as condações foram em maior número que as aprovações. As aguardentes enviadas para análise prévia foram em número de 122 amostras, tendo sido aprovadas 65 e condenadas 57; das 16 amostras enviadas para análise fiscal, 9 foram aprovadas e 7 condenadas; os motivos de condação têm sido sempre os mesmos,

componentes secundários baixos e teor elevado de furfurool e cobre. O cobre, por exemplo, é motivado por uma falta de cuidado do fabricante de aguardente, pois o alambique deve ser estanhado internamente, estanhadura que deve ser renovada sempre que necessário, o que raramente é feito.

Em 32 amostras de corantes enviadas para análise de fiscalização, 22 foram condenadas por não serem permitidos e as 10 restantes foram aprovadas.

Dos licores analisados, em número de 23 amostras (fiscais e prévias) foram condenadas 10 e aprovadas 13.

Os vinagres, em número de 33 amostras, tiveram a porcentagem de condenação elevada, pois somente 9 foram aprovados e 24 condenados pelos motivos habituais.

Das 42 amostras de refrescos enviadas para análise, foram aprovadas 8 e condenadas 34, por serem, como sempre, produtos mal manipulados.

Os vinhos tintos concorreram com 16 condenações em 23 amostras analisadas.

Em 9 amostras de whiskies analisadas, foram verificadas 5 condenações.

Das 18 amostras de xaropes enviadas para análise, foram condenadas 15 e aprovadas 3.

Foram citados mais especialmente, nesta nossa breve exposição, os produtos — aguardentes, refrescos, vinhos, vinagres, licores e xaropes, por serem os de maior consumo público no gênero bebidas e também as essências artificiais e corantes, como parte integrante de um grande número de produtos alimentícios.

Como podemos avaliar, o risco que corre a saúde do povo é enorme, se não houver uma ação mais enérgica e eficiente na fiscalização dos produtos alimentícios.

Pelos dados analíticos, principalmente das análises prévias, nota-se que há deficiência técnica por parte dos fabricantes de produtos alimentícios, havendo, portanto, necessidade de lhes ser dada assistência técnica, orientando-os na preparação de seus produtos, de acôrdo com as normas estipuladas pelos Regulamentos em vigor.

ANOS	1943						1944						1945					
	Prévias		Fiscais		Total		Prévias		Fiscais		Total		Prévias		Fiscais		Total	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
PRODUTOS																		
Aguardentes	107	51	26	26	133	77	38	45	2	9	40	54	65	57	9	7	74	64
Álcool	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	13	4	13	4
Amargos	5	2	10	8	15	10	7	4	5	5	12	9	4	4	5	3	9	7
Aromas de baunilha	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Ácido acético	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—
Cervejas	—	1	—	—	—	1	1	—	—	1	1	1	—	—	—	1	—	1
Conhaques	2	2	2	2	4	4	—	—	1	4	1	4	1	—	—	5	1	5
Corantes	—	—	12	38	12	38	5	8	10	14	15	22	—	—	10	22	10	22
Essências	3	—	2	5	5	5	—	8	1	1	1	9	2	—	17	7	19	7
Gin	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Licores	2	7	10	20	12	27	5	11	—	2	5	13	10	6	3	4	13	10
Malte	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2	—
Mistura Vegetal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—
Refrescos	3	11	7	—	10	11	9	28	—	8	9	36	6	28	2	6	8	34
Rum	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
Saké	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—
Vinagres	—	3	9	12	9	15	1	3	—	8	1	11	2	1	7	23	9	24
Vinhos brancos	1	3	30	9	31	12	2	—	6	8	8	8	—	1	14	3	14	4
Vinhos compostos	—	—	74	32	74	32	2	1	3	4	5	5	—	—	9	17	9	17
Vinhos espumantes	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—
Vinhos tintos	1	3	46	45	47	48	—	—	8	10	8	10	—	—	7	16	7	16
Whiskies	1	—	—	2	1	2	1	1	—	—	1	1	—	1	4	4	4	5
Wodka	1	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	1	1	—	—	—	1	—
Xaropes	21	23	2	13	23	36	5	12	—	—	5	12	2	4	1	11	3	15
Very dry Cocktails	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
	148	106	230	214	378	320	76	126	37	75	113	201	96	102	102	134	198	236
	254		444		698		202		112		314		198		236		434	

O PROBLEMA DO DESCORAMENTO DAS BEBIDAS E CONEXOS

CORDÉLIA NÓBREGA DUARTE,

Química do Instituto Adolfo Lutz.

MARIA DE LOURDES BARBOSA,

Técnica de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

A determinação dos sacarídios em química bromatológica é, geralmente, feita pela redução do licor cupro-alcálico, exceto na dosagem de sacarose em açúcares, ou nos casos em que o desvio polarimétrico pode dar indicações sobre a natureza ou a pureza do produto em estudo.

Tanto na sacarimetria química, como na polarimetria, são requisitos indispensáveis que as soluções sejam límpidas e tão incolores quanto possível; nem sempre se satisfaz esta última exigência sem que se apresentem graves inconvenientes.

Numerosos são os clarificantes citados na literatura, sendo os mais comuns: carvão animal, carvão vegetal, suspensão de hidróxido de alumínio, acetatos neutro e básico de chumbo, nitrato de chumbo, sulfato e nitrato de mercúrio, hipoclorito de cálcio, decrolina, etc., empregados isoladamente ou associados, nos casos mais difíceis.

O carvão vegetal foi empregado nas usinas açucareiras da Europa desde o XV século¹; foi depois esquecido e posteriormente redescoberto.

O mecanismo da adsorção pela qual agem o carvão, a alumina e muitos outros descorantes² não está perfeitamente conhecido; sabe-se que a adsorção é mais acentuada quando as substâncias a adsorver se acham em estado coloidal, apresentando áreas interfaciais extraordinariamente extensas e prestando-se à manifestação de fenômenos de natureza elétrica e química.

Os sucos vegetais, matéria prima para a produção de vinhos, vinagres, sucos de frutas e aguardentes das mais variadas espécies, têm parte dos seus constituintes, inclusive matéria corante, sob forma coloidal. A maior parte dos descorantes que não agem por adsorção,

coagulam essas substâncias; para esta coagulação³, é necessária a colisão das partículas coloidais assegurada pelo movimento browniano mas, além disso, parece haver também intervenção de fenômenos elétricos.

Na indústria açucareira as determinações de sacarose são polarimétricas e o defecante geralmente usado é o sub-acetato de chumbo¹; nessas condições o erro a ser eliminado é o do volume do precipitado e o de qualquer excesso de clarificante capaz de alterar o desvio polarimétrico⁴.

Tratando-se de dosar açúcares em soluções quase puras, que contenham muito pouca matéria orgânica, o creme de alumina apresenta vantagens consideráveis, uma vez que a coloração não seja intensa. Nos outros casos obtém-se bons resultados por defecação com sais de chumbo, empregados na quantidade exatamente necessária e com o eliminador mais adequado. Quando este processo falha usa-se o carvão. Estas são normas gerais que procuramos aplicar ao estudo a que nos dedicamos.

Quando se trabalha com um sal de chumbo, acetato ou nitrato, importante é considerar a seleção do eliminador do chumbo; este atrapalha a redução do licor de Fehling, agindo sobre o oxídulo de cobre.

Segundo Eynon e Lane, citados por Browne⁴, em presença do cálcio que tem a propriedade de diminuir o poder redutor dos açúcares, é preferível trabalhar com oxalato de potássio ou de sódio; embora não o eliminem inteiramente, o chumbo permanece em quantidade insuficiente para afetar o cobre reduzido.

O reativo de Cook e Mc Allep, também citados por Browne⁴, destina-se a eliminar o chumbo e o cálcio; trata-se de uma solução contendo 7 g de fosfato dissódico e 3 g de oxalato de potássio em 100 ml.

Nos laboratórios de bromatologia está generalizado o uso do carvão para descoramento de bebidas, quaisquer que sejam elas e somente quando não dá resultado procura-se outro clarificante. Na prática diária do trabalho em série o emprêgo do carvão é de extrema simplicidade e em certos casos não é inconveniente; mas quando se trata de bebida com alto teor de açúcar o erro se torna considerável e nem sequer é um erro constante graças à dificuldade de se tomarem quantidades conhecidas de carvão; os próprios métodos

encontrados na literatura não determinam a quantidade ou a proporção em que o mesmo deve ser empregado, nem o tempo após o qual deve ser feita a filtração. Estudando o assunto, Bandeira de Melo e Mário Taveira⁶ verificaram que o carvão adsorve elevada porcentagem de glicose. Reproduzindo as provas anteriores, os mesmos autôres e o farmacêutico Silva Tavares trataram 50 ml de uma solução de glicose a 4% por 2 g de carvão animal, durante 1 hora, filtraram e titularam; observaram que o carvão adsorveu 20% da glicose.

Sendo questão assente a da ação adsorvente do carvão sobre os açúcares e não desejando alongar demasiadamente este trabalho, não nos dedicaremos ao estudo deste aspecto do problema, sem, entretanto, perdê-lo de vista.

Afim de estudar melhor o descoramento das bebidas, fizemos um esboço de classificação, segundo o qual temos os seguintes 7 grupos:

- 1 — Refrescos
- 2 — Xaropes
- 3 — Vinhos e vinagres
- 4 — Sucos de frutas
- 5 — Aguardentes
- 6 — Aperitivos
- 7 — Licores

que passaremos a estudar, sempre em linhas gerais, sob o aspecto que nos interessa. Além desses 7 grupos consideraremos também, em grupo especial, os extratos fluidos empregados na preparação de bebidas como guaraná, vermouth, vinho quinado, fernet, bitter, etc.

1 — Os refrescos em sua quase totalidade não necessitam de descoramento: as sodas limonadas, águas tônicas, maçãs e similares são incolores; os guaranás, laranjadas naturais e similares são pouco coloridos, em sua maioria pelo caramelo, mesmo em presença do corante natural. Para se fazer boa dosagem de glicídios é suficiente diluir a bebida; em geral o teor de açúcares das mesmas é de, aproximadamente, 10%; portanto uma diluição de 10% nos dará coloração muito fraca e uma porcentagem de glicídios dentro dos limites de eficiência do método.

2 — Os xaropes são coloridos, quase todos pelos derivados do alcatrão da hulha; aos de frutas nacionais costumam adicionar caramelo, mesmo em presença do corante natural; alguns, mais raros, são coloridos pela cachonilha.

As matérias corantes derivadas da hulha são muito fáceis de eliminar; o carvão as adsorve com grande facilidade; a alumina só é eficiente em quantidades muito elevadas e o sub-acetato de chumbo mostrou-se insatisfatório.

Visando prescindir do carvão e mostrar a superioridade do nitrato de chumbo sobre o de mercúrio, como clarificante, fizemos uma série de provas comparativas com os corantes derivados da hulha tolerados pelo antigo Regulamento e que eram os seguintes:

- a) Corantes róseos:
 - 1 — Eritrosina
 - 2 — Róseo bengala
- b) Corantes vermelhos:
 - 3 — Bordeaux S
 - 4 — Ponceau RR
 - 5 — Nova coccina
 - 6 — Vermelho sólido
- c) Corante alaranjado:
 - 7 — Alaranjado I
- d) Corantes amarelos:
 - 8 — Amarelo naftol S
 - 9 — Auramina O
- e) Corante verde:
 - 10 — Verde ácido J
- f) Corante azul:
 - 11 — Azul patente
- g) Corante violeta:
 - 12 — Violeta ácido 6B⁷

As soluções dos corantes foram preparadas nas porcentagens propostas pelo Sr. Mário Sampaio Melo, como base para a limitação dos teores máximos de corantes nos alimentos⁷.

PRIMEIRA PROVA

Material: Tubos de ensaio, pipetas, buretas, funís, papel-filtro, suportes, bastões, etc.

Reagentes:

1 — Nitrato básico de chumbo	250 g
Água destilada suficiente p/ completar	500 ml
2 — Hidróxido de sódio	100 g
Água destilada suficiente p/ completar	500 ml

Técnica: Tomamos 10 ml das soluções coradas e tratamos por 1 ml da solução de nitrato de chumbo; agitamos; após alguns minutos adicionamos 1 ml da solução de hidróxido de sódio; agitamos; filtramos.

Como o descoramento foi completo, repetimos a prova com quantidades cada vez menores da solução de nitrato de chumbo, até que o filtrado passasse corado. Os resultados obtidos foram os seguintes: com eritrosina, bordeaux S, nova coccina, vermelho sólido e ponceau RR obtivemos descoramento completo com 0.1 ml de solução de nitrato de chumbo diluída na proporção de 1:8; com róseo bengala, alaranjado I e violeta ácido 6B obtivemos descoramento completo com 0.5 ml de solução de nitrato de chumbo; com azul patente e verde ácido J, empregando 1 ml da solução de chumbo, o filtrado conservou coloração mínima; esta perde a significação se nos lembramos de que os xaropes, por seu elevado teor de açúcares, têm que ser trabalhados em grandes diluições (1% aproximadamente); com o amarelo naftol S e a auramina O não obtivemos descoramento satisfatório, nem mesmo empregando quantidades elevadas do clarificante.

SEGUNDA PROVA

As soluções dos corantes foram preparadas com 3 g de ácido cítrico por 1000 ml.

Material: O mesmo necessário para a primeira prova.

Reagentes: Os mesmos empregados na primeira prova.

Técnica: A mesma empregada na 1a. parte da prova anterior.

Os resultados foram os seguintes: com eritrosina, róseo bengala, nova coccina, vermelho sólido, alaranjado I, amarelo naftol S, auramina O, verde ácido J, azul patente e violeta ácido 6B, os filtrados passaram corados; com bordeaux S e ponceau RR o descoramento foi completo com 0,5 ml da solução de nitrato de chumbo.

A primeira vista parece que não se pode empregar o nitrato de chumbo para descorar os xaropes, que contêm quantidades de ácidos orgânicos semelhantes às das soluções empregadas nesta prova; mas não nos devemos esquecer de que não vamos descorar xaropes, mas soluções bastante diluídas de xaropes.

TERCEIRA PROVA

As soluções dos corantes não continham ácido cítrico.

Material: O mesmo necessário para a primeira prova.

Reagentes:

1 — Solução de nitrato de mercúrio, preparada segundo as indicações do A.O.A.C. (método oficial);

2 — Solução de hidróxido de sódio 0,5N.

Técnica: Tomamos 10 ml das soluções coradas e tratamos por 1 ml da solução de nitrato de mercúrio e, após alguns minutos, por 4,5 ml da solução de hidróxido de sódio 0,5N; agitamos, filtramos.

Todos os filtrados passaram corados.

QUARTA PROVA

As soluções dos corantes foram preparadas com 3 g de ácido cítrico por 1000 ml.

Material: O mesmo necessário para a primeira prova.

Reagentes: Os mesmos empregados na prova anterior.

Técnica: Tomamos 10 ml das soluções coradas, tratamos por 1 ml da solução de nitrato de mercúrio e, após alguns minutos, 4,5 ml da solução de hidróxido de sódio 0,5N; agitamos e filtramos.

Obtivemos descoramento completo apenas com o bordeaux S; os demais filtrados passaram intensamente corados.

Com estas provas nos convencemos de que o nitrato de chumbo é defecante superior ao carvão, no que diz respeito à adsorção dos açúcares e ao nitrato de mercúrio e aos acetatos de chumbo no que diz respeito à eliminação do corante.

De acôrdo com as experiências realizadas, adotamos a seguinte técnica para o emprêgo do nitrato de chumbo: tomar uma quantidade de bebida a analisar, tendo em vista o provável teor de glicídios da mesma; juntar solução de nitrato de chumbo, procurando evitar excesso; agitar e deixar em contacto durante alguns minutos; juntar a quantidade correspondente de solução de hidróxido de sódio a 20% (essa correspondência deve ser estabelecida por uma titulação prévia); filtrar em funil de Büchner, lavar o precipitado sôbre o filtro, passar o filtrado para um frasco aferido que nos dê a diluição desejada; lavar cuidadosamente o Kitasato e só então completar o volume.

3 — Com os vinhos e vinagres foram experimentados os mesmos descorantes; para os vinhos secos, nos quais a quantidade de glicose é de aproximadamente 1 g por litro, o carvão pode ser empregado, porque aí o escopo é deduzir do extrato todo o açúcar que não seja resíduo da fermentação; o mesmo se dá com os vinagres, em que a quantidade de açúcar dá indicações sôbre a boa marcha da fermentação. A maioria dos vinhos doces, mesmo compostos, raramente necessita descoramento, sendo suficiente diluição apropriada; quando necessário o nitrato de chumbo dá bons resultados.

4 — Os sucos de frutas, em que as quantidades de matéria extrativa e de glicídios são elevadas, não devem ser tratados pelo carvão. Êste é um dos casos em que o nitrato de chumbo é especialmente aconselhável. Obtivemos ótimos resultados empregando 10 a 20% de nitrato de chumbo, calculado sôbre o volume da amostra a ser descorada.

5 — As aguardentes de cana, a bagaceira, e o gin são incolores ou pouco coloridos pelo caramelo e geralmente não contêm açúcares; o rum, o kirsh, o vodka e outros são coloridos pelo contacto com madeiras ou pelo caramelo e também não são açúcarados; as aguardentes compostas são coloridas pelo caramelo e por extratos vegetais e podem conter açúcares; quando pouco coradas, o creme de alumina pode ser usado; nos outros casos o nitrato de chumbo dá excelentes resultados.

6 — As bebidas denominadas amargos, aperitivos, bitters, fernets e semelhantes são fortemente coloridas pelos extratos vegetais

e pelo caramelo e são, em geral, muito difíceis de descorar; muitas vezes o carvão não dá resultado, nem mesmo a quente; o sub-acetado de chumbo falha; nas provas que tivemos oportunidade de fazer, obtivemos resultados inteiramente satisfatórios empregando o nitrato de chumbo, sendo êste um dos casos em que êste reagente é mais vantajoso.

7 — Os licores são geralmente coloridos pelos derivados do alcatrão da hulha, mas em certos casos não podem conter corante estranho, a não ser caramelo. Ainda neste caso é conveniente evitar o uso do carvão, fugindo assim a uma das causas de êrro tão comum na determinação dos glicídios. Em relação ao emprêgo do nitrato de chumbo, o problema apresenta-se semelhante ao problema do descoramento dos xaropes, sendo, porém, necessário eliminar preliminarmente o álcool.

Quando se tem necessidade de descorar extratos fluidos, luta-se com dificuldades: o carvão não os descora, nem mesmo a quente; os acetatos de chumbo dão resultados igualmente maus. Tomamos então diversos extratos fluidos comumente empregados na fabricação de bebidas e fizemos duas séries de provas, empregando em uma nitrato de chumbo e na outra nitrato de mercúrio.

Primeira prova — Trabalhamos com 8 amostras, sendo:

- 1 — Extrato fluido de guaraná
- 2 — Extrato fluido de guaraná
- 3 — Extrato aromatizante de cacau
- 4 — Extrato fluido de cumarú
- 5 — Extrato fluido de puxuri
- 6 — Extrato fluido de guaraná
- 7 — Extrato fluido de guaraná
- 8 — Extrato fluido de mate

Material: Tubos de ensaio, pipetas, buretas, funís, papel-filtro, suportes, bastões, etc.

Reagentes: Os mesmos empregados na primeira prova de descoramento de xaropes (nitrato de chumbo e hidróxido de sódio a 20%).

Técnica: Tomamos 1 ml de cada extrato fluido e tratamos por 1 ml da solução de nitrato de chumbo; agitamos; após alguns minutos adicionamos 1 ml da solução de hidróxido de sódio; adicionamos 7 ml de água destilada, agitamos e filtramos.

Como todos os filtrados passassem perfeitamente incolores, repetimos a prova diminuindo a quantidade de nitrato de chumbo, até obter descoramento completo com as seguintes quantidades:

1 — Extrato fluido de guaraná	0,2 ml
2 — Extrato fluido de guaraná	0,2 ml
3 — Extrato aromatizante de cacau	0,2 ml
4 — Extrato fluido de cumarú	0,2 ml
5 — Extrato fluido de puxurí	0,3 ml
6 — Extrato fluido de guaraná	0,2 ml
7 — Extrato fluido de guaraná	0,2 ml
8 — Extrato fluido de mate	0,3 ml

Verificamos, portanto, que êstes extratos fluidos descoram-se completamente quando tratados pelo nitrato de chumbo, na proporção de 20 a 30% sôbre a tomada de ensáio.

Segunda prova — Tomamos as mesmas amostras.

Material: O mesmo empregado na prova anterior.

Reagentes: Os mesmos empregados na terceira prova de descoramento de xaropes (nitrato de mercúrio, preparado segundo o A.O.A.C., método oficial, e solução de hidróxido de sódio 0,5N).

Técnica: Tomamos 1 ml de cada extrato fluido e tratamos por 1 ml da solução de nitrato de mercúrio; agitamos; após alguns minutos adicionamos 4,5 ml da solução de hidróxido de sódio 0,5N; juntamos 3,5 ml de água destilada; agitamos e filtramos.

Com exceção do extrato aromatizante de cacau, que descorou completamente, os demais filtrados passaram amarelados ou pardos-claros; o filtrado do extrato fluido de puxurí passou amarelo claro com bela fluorescência verde.

Fizemos mais duas provas com mistura vegetal líquida para vinho quinado (duas amostras diferentes), extrato fluido de bitter russo, extrato fluido de fernet e extrato fluido de amargo felsina. Conduzimos as provas exatamente como as anteriores, com o mesmo material, os mesmos reagentes. Os resultados obtidos foram bons, na prova feita com nitrato de chumbo e inferiores na feita com nitrato de mercúrio.

Mais uma vez verificamos que tínhamos razão de considerar o nitrato de chumbo o descorante de escolha para os extratos fluidos usados na fabricação de bebidas. No descoramento das cervejas

pretas, entretanto, não deu bons resultados, comportando-se de forma idêntica ao nitrato de mercúrio.

Não é nossa intenção eliminar o carvão dos laboratórios de bromatologia, mas achamos que não pode ser aplicado indiscriminadamente. Parece-nos que a escolha do clarificante deve obedecer às especificações do mesmo, às exigências de cada caso particular e à finalidade da determinação dos sacarídeos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CRAMER, MARC — 1927 — Le sucre et leurs derivés — Doin — Paris.
- 2 — FONSECA RIBEIRO — 1946 — *Apostilas de Química Biológica* — São Paulo.
- 3 — ALEXANDER — 1926 — Colloid Chemistry — *Chemical Catalog New York*, 1.
- 4 — BROWNE and ZERBAN — 1941 — *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis* — John Wiley, Third ed., New York.
- 5 — Official and Tentative Methods of Analysis — 1940 — Edited by Association of Official Agricultural Chemists, Fifth ed., Washington.
- 6 — MELO, J. Bandeira de e TAVEIRA, Mario — 1932 — Química Bromatológica da Cerveja — *Rev. Soc. Bras. de Química III* 3: 2.
- 7 — MELO, M. Sampaio — 1943 — Contrôles dos corantes da hulha em alimentos — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3: 1.

ALGUMAS NOTAS SÔBRE A SELEÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA OS GERMES DO GRUPO "LACTOBACILLUS"

EMMA DE LIMA.

Técnica de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

A escolha de um meio de cultura que satisfaça tôdas as condições favoráveis exigidas para o crescimento, cultivo, conservação, etc, de um determinado germe, requer da parte do técnico de laboratório muito critério e cautela na sua seleção.

Essa escolha torna-se ainda mais rigorosa quando se trata, como no presente caso, de se proceder a um exame de "contrôle".

Como é do conhecimento geral, os produtos chamados "acidófilos" deverão possuir grande número de germes vivos afim de estabelecer, quando ingeridos, abundante flora acidófila no intestino. Segundo Rettger¹, a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* constitue verdadeiro e importante fator na terapia acidófila. Kopelloff² diz que o tratamento pela terapia acidófila varia de acôrdo com o indivíduo e com as condições em que êle é tratado. Em geral, a dose média diária deve ser equivalente a 1.000 ml de uma cultura, contendo aproximadamente 200.000.000 de *Lactobacillus acidophilus* viáveis, por ml, podendo essa dose ser aumentada ou diminuída em alguns casos. Rettger³ informa que "The Council on Chemistry and Pharmacy, American Medical Association" (1934), estabelece que o leite acidófilo deve conter não menos de 200.000.000 de bacilos viáveis por ml, no dia da preparação, e não menos de 100.000.000 por ml na data da expiração do praso.

Ao procedermos ao exame de "contrôle" de um produto de *Lactobacillus*, devemos verificar em primeiro lugar a sua pureza, isto é, não deverá êle conter outros germes além dos mencionados no respetivo rótulo e, em segundo lugar, o número de germes vivos por ml.

Os germes do grupo *Lactobacillus* são exigentes para serem cultivados, não crescendo ou crescendo mal nos meios comuns de laboratório. A literatura sôbre o assunto é bem extensa, havendo

diversos autôres experimentado meios diferentes para o cultivo d'esses germes.

Dentre a enorme série de trabalhos publicados, podemos citar os seguintes: Kulp⁴, em trabalho bem descrito, recomenda o meio contendo sôro de leite-peptona e galactose, fazendo as diluições das culturas de acôrdo com o "Standard Methods of Milk Analysis". As placas semeadas com as diluições convenientes, eram incubadas a 37°C por 48 horas, em uma atmosfera contendo de 5 a 10% de CO₂. Em 1927, o mesmo autor⁵ estudou um meio contendo suco de tomate, fazendo cultivos comparativos com o ágar-sôro de leite-peptona galactose, concluindo pela vantagem do 1.º sôbre o 2.º, no qual havia um melhor crescimento das colônias. De acôrdo com o método, as placas eram incubadas em uma atmosfera contendo de 5 a 10% de CO₂, por 72 horas.

Mais tarde êsse mesmo pesquisador⁶ introduziu uma pequena modificação nêsse metodo, obtendo bons resultados. No mesmo ano (1932) Bachmann e Frost⁷ sugerem um meio para a determinação quantitativa em produtos contendo *Lactobacillus acidophilus*, meio êsse contendo suco de vegetais. Obtiveram os autôres bons resultados em suas experiências. Um trabalho muito interessante e bem completo é o apresentado por Sabine⁸, no qual o autor demonstra o resultado de um estudo comparativo de diversos meios de cultura, empregando 22 raças diferentes de *Lactobacillus*, de procedências diversas, acompanhado de quadros elucidativos bem discriminados.

Como vemos, a literatura é bem vasta, porém, para o nosso trabalho de laboratório, não era o bastante, pois interessava-nos mais de perto um meio de cultura que fôsse favorável não sômente ao crescimento do germe, mas que desse de modo o mais aproximado possível o número de germes vivos por ml de produto semeado.

Durante algum tempo o meio por nós empregado foi o de Sabouraud, ao qual juntávamos, no momento de usar, 10%, mais ou menos, de sôro de leite prèviamente esterilizado. Como é natural, não nos contentamos apenas com executar o nosso trabalho, esforçamo-nos sempre em melhorar a nossa técnica, afim de termos a segurança de que estamos cumprindo concenciosamente o nosso dever, procurando sanar as falhas que porventura se nos apresentem.

A dificuldade era termos em mão material abundante que facilitasse o nosso estudo. Com a entrada, porém, na secção, de maior número de amostras de produtos para exame, tivemos ocasião de poder levar avante o nosso trabalho. Empregamos em nossa experiência 4 meios de cultura diferentes, fazendo provas comparativas nas mesmas condições de temperatura, diluições, tempo de incubação, etc.

Fizemos também sementeiras comparativas em atmosfera *com* e *sem* dióxido de carbono. De acôrdo com o trabalho de Valley e Rettger⁹, todos os germes, mesmo os esporulados anaeróbios, necessitam de CO₂ para o início de seu crescimento, chegando alguns dêles a não crescer quando o ambiente de incubação e o meio de cultura são isentos de CO₂. Empregaram os autôres 82 amostras de diferentes germes. Verificaram também que alguns têm um limite ótimo de concentração de CO₂ para crescimento e que 0,3 a 1% favorece mais o crescimento em placa, para contagem, do que a quantidade geralmente presente na atmosfera (cêrca de 0,03%). Quando aumentavam a quantidade de CO₂ para 10 e 20%, êsses organismos não se desenvolviam.

Os meios por nós empregados foram: o de Sabouraud sôro de leite, o de M. R., que era preparado na secção de Meios de Cultura do Instituto e que estava dando bons resultados na prática, e os meios de fígado e de Farr, ambos aconselhados pela "Food and Drug Administration-Federal-Security Agency", e que eram recomendados como tentativas.

Trabalhamos com amostras tomadas de produtos de *Lactobacillus* expostos à venda no mercado, semeando um total de 128 placas. Todos os produtos estavam dentro do prazo de validade, marcado no respectivo rótulo, de acôrdo com a praxe.

Os produtos líquidos eram semeados do seguinte modo: a amostra, depois de bem agitada, era diluída em água destilada estéril, fazendo-se diluições seriadas desde 1/10 até 1/10.000.000. As placas eram semeadas em duplicata, com 1 ml das diluições desejadas, para cada tipo de meio-usado sendo uma série incubada a 37°C em uma atmosfera contendo dióxido de carbono, e outra sòmente a 37°C. Para ambas as séries o período de incubação era de 4 dias.

A contagem final era feita de acôrdo com o "Standard Methods of Milk Analysis". Para os produtos em tabletes, a se-

meadura era feita triturando-se 10 tabletes tomados de um número representativo de frascos de uma mesma amostra, em geral estéril, juntando-se depois 100 ml de água estéril, agitando-se até se obter uma suspensão uniforme. Essa mistura era depois examinada de acôrdo com o processo seguido para as culturas líquidas.

O meio de Farr compreende duas fases de preparação:

A — Preparação do sôro de leite.	
B — Sôro de leite preparado como em A. . .	500 ml.
Proteose peptona	5 grs.
Lactose	3 grs.
Dextrose	3 grs.
Sacarose	3 grs.
Gelatina	3 grs.
Ágar	15 grs.
Água	500 ml.

O meio assim preparado é distribuído em tubos de 20 X 200 e esterilizado, fundindo-se na ocasião de usar.

O meio de fígado é preparado do seguinte modo:

Fígado moído	500 grs.
Água destilada	1.000 ml.
Peptona	10 grs.
Ágar	20 grs.
Glicose	10 grs.
Fosfato dipotássico	1 gr.

Moer o fígado e juntar a água. Deixar em contato durante a noite na geladeira. Aquecer a vapor fluente 1 hora. Coar em pano e completar o volume para 1.000 ml. Juntar a peptona e ajustar ao pH 6.3. Juntar a glicose, o fosfato e o ágar. Fundir a 121°C, por 20 minutos. Filtrar em algodão. Distribuir 15 ml, mais ou menos, em tubos de 20 X 200. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Usar do mesmo modo que o meio de Farr.

Os resultados obtidos são fornecidos no quadro que se segue:

N.º	TEMP.	DILUIÇÕES	M E I O S				
			FARR	M. R.	FIGADO	SABOURAUD	OBSERV.
1	37°C,	1/ 100.000	Não cresceu	1 colônia	Não cresceu	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 1.000.000	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 10.000.000	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	2 colônias	1 colônia	Não cresceu	Não cresceu	Com CO2
"	"	1! 1.000.000	1 colônia	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Com CO2
"	"	1/ 10.000.000	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Com CO2
2	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 10.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 1.000.000	665 colônias	572 colônias	587 colônias	575 colônias	Sem CO2
"	"	1/ 10.000.000	70 colônias	67 colônias	45 colônias	61 colônias	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 1.000.000	710 colônias	680 colônias	620 colônias	571 colônias	Com CO2
"	"	1/ 10.000.000	93 colônias	66 colônias	44 colônias	60 colônias	Com CO2
3	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1, 10.000	300 colônias	160 colônias	221 colônias	237 colônias	Sem CO2
"	"	1, 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000	362 colônias	167 colônias	291 colônias	255 colônias	Com CO2
4	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 10.000	240 colônias	200 colônias	210 colônias	190 colônias	Sem CO2
"	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000	480 colônias	300 colônias	280 colônias	290 colônias	Com CO2
5	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 10.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 1.000.000	45 colônias	20 colônias	26 colônias	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 10.000.000	5 colônias	3 colônias	3 colônias	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 1.000.000	68 colônias	65 colônias	60 colônias	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000.000	60 colônias	12 colônias	10 colônias	Incontável	Com CO2

Das 128 placas semeadas apresentaram crescimento 106, sendo: 28 em meio de Farr, 28 em meio M.R., 26 em meio de fígado e 24 em meio de Sabouraud. O número total de colônias obtidas foi o seguinte:

Meio de Farr	{	Com CO ₂ — 1.774 colônias
		Sem CO ₂ — 1.325 colônias
Meio M.R.	{	Com CO ₂ — 1.295 colônias
		Sem CO ₂ — 1.023 colônias
Meio de Fígado	{	Com CO ₂ — 1.305 colônias
		Sem CO ₂ — 1.092 colônias
Meio de Sabouraud	{	Com CO ₂ — 1.176 colônias
		Sem CO ₂ — 1.063 colônias

Como se pode verificar pelo quadro apresentado, o número de colônias obtidas pelo crescimento em meio de Farr, em atmosfera com CO₂, é bem maior do que o obtido nos outros meios e sob condições idênticas, parecendo-nos ser um bom meio de cultura para o fim a que é aconselhado, isto é, semeadura e contagem em placa de germes do grupo *Lactobacillus*. Diante dos bons resultados obtidos, foi êsse o meio por nós empregado na verificação dos produtos acidófilos.

Conclusões: Das experiências feitas comparativamente com 4 meios diferentes de cultura, chegamos às seguintes conclusões: 1.^a) os germes pertencentes ao grupo dos *Lactobacillus* têm melhor crescimento quando incubados em atmosfera contendo dióxido de carbono. 2.^a) O meio de Farr, aconselhado pela "Food and Drug Administration-Federal Security Agency", favorece melhor o crescimento desses germes, além de apresentarem as colônias maior desenvolvimento.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — RETTGER, L. F. e col. — 1935 — "Lactobacillus acidophilus & its Therapeutic application".
- 2 — KOPELOFF, Nicholas — 1926 — "Lactobacillus acidophilus". Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1926.

- 3 — RETTGER, L. F. e col. — 1935 — “Lactobacillus acidophilus & its Therapeutic application.
- 4 — KULP, Walter L. — 1926 “The determination of viable Lactobacillus acidophilus”. *Science* 6: 304.
- 5 — KULP, Walter L. — 1927 — “Scientific Apparatus and Laboratory Methods. An agar medium for plating L. acidophilus e L. bulgaricus”. *Science* 66: 512.
- 6 — KULP, Walter L. and WHITE, Vinton — 1932 — “A modified medium for plating L. acidophilus”. *Science* 76: 17.
- 7 — BACHMANN, F. M. e FROST, W. D. — 1932 — “Vegetable Peptone Agar for quantitative Work with Lactobacillus acidophilus”. *Jour. Bact.* 23: 39.
- 8 — SABINE, David B. — 1935-36 — “A comparison of media for plating L. acidophilus”. *Jour. Lab. Clin. Med.* 21: 848.
- 9 — VALLEY, George and RETTGER, L. F. — 1926 — “Carbon Dioxide Requirements of Bacteria”. *Jour Bact.* 11: 78.

COLESTEROL — DA DETERMINAÇÃO EM OVOS E PRODUTOS QUE CONTÊM OVOS

FANNY S. TABACOW HIDAL,

Química do Instituto Adolfo Lutz.

A determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios vem sendo, desde há algum tempo, estudada. Assim, H. R. Strohecker e R. Vaubel¹, publicaram um excelente trabalho focalizando este problema, que foi também objeto de estudo de J. Tillmans, H. Riffart e A. Kuhn², L. M. Lampert³, e E. O. Haenni⁴, etc.

O primeiro método ideado para a determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios consistiu na determinação do conteúdo dos lipídios fosforados do ovo. Foi posteriormente verificado, porém, que o conteúdo dos lipídios fosforados em produtos alimentícios frequentemente diminui com o tempo, isto é, durante a armazenagem do produto, como também diminui durante o processo da sua fabricação.

J. Tillmans, H. Riffart e A. Kuhn², mostraram que o conteúdo de colesterol nos ovos é mais ou menos constante, mesmo durante a armazenagem do produto. L. M. Lampert³, que contribuiu com valiosos trabalhos para o desenvolvimento dos métodos analíticos neste campo, sugeriu a determinação do conteúdo de colesterol nos ovos e dos valores assim obtidos, calcular a quantidade de ovos nos produtos alimentícios.

Dos estudos levados a efeito então, mostrou-se: 1.º — que a quantidade quase que total de colesterol é encontrada nas gemas de ovos; 2.º — nem todo o colesterol é encontrado na forma livre. S. J. Thannhauser e H. Schaber⁵, H. Dam⁶ e K. Kusey⁷ indicam um mínimo de 10% para o colesterol em forma de ésteres.

O valor do colesterol determinado em ovos, varia segundo o método utilizado para a sua determinação.

J. Tillmans, H. Riffart e A. Kuhn² acharam uma média de 1,49% de colesterol livre em 8 amostras de gema. L. M. Lampert³ achou uma média de 1,36% de colesterol total na gema, H. Riffart

e H. Keller ⁸ acharam uma média de colesterol livre em 3 amostras de gema igual a 1,49% pelo método titrimétrico e 1,50% pelo método colorimétrico. Outros autores dão para ovos com peso médio de 50 g, correspondendo à gema 15 a 18 g, o valor de 1,70% de colesterol.

São dois os tipos de métodos mais usados para a determinação do colesterol; o primeiro, em que se aproveita o fato do colesterol ser precipitável com digitonina, o que só se dá com o colesterol livre e não com os ésteres, e depois a sua valoração gravimétrica ou colorimétrica.

O segundo método consiste na extração do colesterol por meio de solventes orgânicos com ou sem saponificação prévia, utilizando-se para a determinação métodos colorimétricos.

Os métodos que usam a digitonina dão bons resultados mas devido ao elevado preço do reativo não são muito usados na rotina. No segundo grupo de métodos, quando usamos para a determinação a reação colorimétrica de Lieberman ⁹, Burchard ¹⁰, obtemos ótimos resultados.

Têm grande importância neste método o solvente e os detalhes do procedimento da extração, bem como a saponificação prévia do produto.

Devido a esses fatores, passamos a estudá-lo e posteriormente aplicá-lo à rotina.

ESTUDO DA REAÇÃO DE LIEBERMAN-BURCHARD

A reação de Lieberman-Burchard ^{9,10}, processa-se normalmente em solução clorofórmica, quando tratamos o colesterol com anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado. Desenvolve-se uma coloração que, do azul inicial, passa para verde e cuja intensidade varia com o conteúdo de colesterol.

São muitos os fatores que influenciam decisivamente o resultado final da reação. Assim, pois, a quantidade de ácido sulfúrico deve ser exatamente medida, a reação deve desenvolver-se numa temperatura exatamente determinada, no escuro e num determinado intervalo de tempo. Além do que, o material usado deve estar rigorosamente seco.

A coloração original da reação de Lieberman⁹-Burchard¹⁰ atinge o seu máximo em 9 minutos e é de pequena duração. Shettel¹¹, estudando a reação acima, mostrou que a coloração desenvolvida torna-se estável por mais tempo quando adicionamos aos reagentes iniciais ácido acético glacial em proporção definida. Assim a coloração desenvolve-se mais lentamente, atingindo um máximo em 21 minutos, aí permanecendo durante 14 minutos para depois diminuir muito lentamente.

Assim, pois, esta reação pode ser usada para determinações quantitativas.

PARTE EXPERIMENTAL

Iniciando os nossos trabalhos experimentais efetuamos uma série de determinações do colesterol contido em ovos de galinha, adquiridos nos nossos mercados e separados segundo a classificação aí usada, isto é, ovos de 1.^a qualidade com carimbo verde, ovos de 2.^a qualidade com carimbo roxo e ovos de 3.^a qualidade com carimbo preto.

A técnica foi a seguinte: pesamos em um becker cêrca de 0,100 g de ovo total em pó, sêco a 50° e adicionamos sob agitação 10 cm³ de uma solução a 60% de hidróxido de potássio, cobrimos com um vidro de relógio, aquecemos em banho-Maria durante 3 horas e agitamos ocasionalmente até desintegrar tôda a massa.

Deixamos esfriar até 40°, adicionamos 6 cm³ de álcool etílico e agitamos até que tôda a matéria insolúvel ficasse finamente dispersa. Adicionamos 20 cm³ de éter etílico, agitamos bem e transferimos as soluções para um funil de separação de 250 cm³ de capacidade. Lavamos o becker da saponificação com 2 ou 3 pequenas porções de éter e com 10 cm³ de uma solução a 1% de hidróxido de potássio e transferimos as soluções de lavagens para o funil de separação. Agitamos bem o líquido por 10 a 15 segundos. Deixamos em repouso durante alguns minutos para permitir que as camadas se separassem e em seguida vagarosamente transferimos a camada inferior, que é a solução de sabão, para um funil de separação de 150 cm³, com o cuidado de não transferir qualquer pequena quantidade de emulsão ou matéria insolúvel que estivesse entre as duas camadas. Lavamos a extremidade inferior do funil com 5 cm³ de hidróxido de potássio a 1%, transferimos para o funil de 150 cm³

adicionamos 10 cm³ de éter e agitamos vigorosamente. Depois que as camadas separaram-se, descarregamos a camada inferior e transferimos a camada de éter do funil de 150 para o de 250 cm³ lavando o primeiro com 2 vezes 5 cm³ de éter.

Lavamos a solução de éter como anteriormente com 10 cm³ de uma solução a 1% de hidróxido de potássio, retendo qualquer matéria insolúvel ou emulsão no funil. Adicionamos à solução de éter 2 cm³ de ácido clorídrico (1+4), agitamos, adicionamos 10 cm³ de água e agitamos novamente. Descarregamos os ácidos da lavagem. Lavamos a solução de éter com 2 porções de 10 cm³ de hidróxido de potássio a 1%. A uma porção da última água de lavagem adicionamos algumas gotas de HCl (1+4), e algumas gotas de fenolftaleína. Se tal prova apresentar-se clara ou só levemente turva, damos por terminada a lavagem do éter. Caso contrário, precisaremos repetí-la.

Se a prova não apresentar turvação, lavamos a solução de éter sucessivamente com 5 cm³ de água contendo uma gota da solução de ácido clorídrico (1+4), e com duas porções de 5 cm³ de água.

Finalmente desprezamos a camada aquosa o mais completamente possível sem perder a solução de éter. Filtramos a solução etérea para um tubo de ensaio com saída lateral graduado em 5 cm³ através de 2 g de sulfato de sódio anidro, em um funil Buchner de vidro com placa porosa ligado a um pequeno aparelho de destilação, segundo nos mostra a figura n.º 1.

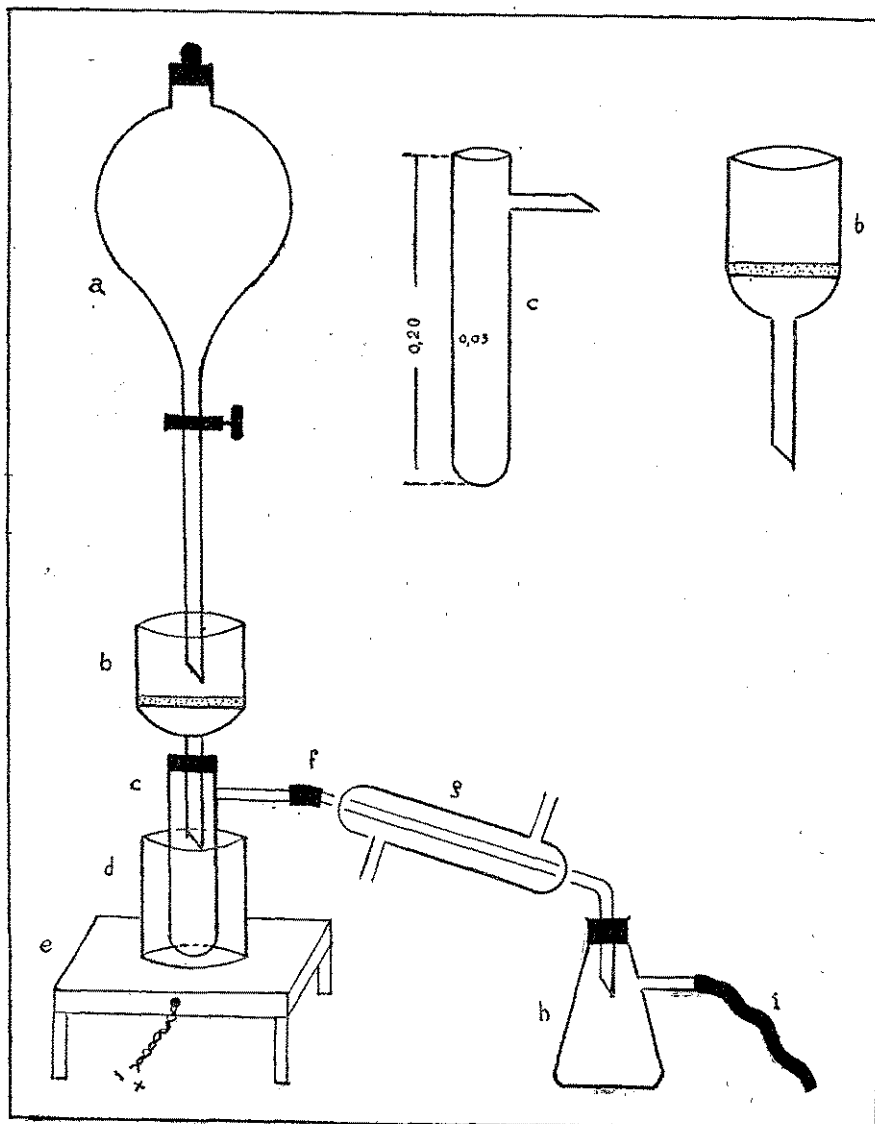
Depois da destilação total do éter colocamos o tubo em um dessecador sob ácido sulfúrico durante 12 horas para a secagem completa.

O resíduo dissolvemos em 5 cm³ de clorofórmio, adicionamos 1 cm³ de ácido acético glacial, 2 cm³ de anidrido acético e 0,2 cm³ de ácido sulfúrico exatamente medidos. Fechamos o tubo com uma rolha de borracha recoberta por celofane, agitamos bem e levamos a um banho a 23º durante 25 minutos, conservando o tubo no escuro.

A coloração verde desenvolvida foi medida num aparelho chamado "Lumetron" fabricado pela Photovolt Corporation, Modelo 400 A, que não é nada mais que um colorímetro fotoelétrico. Usamos para a leitura o filtro vermelho n.º 650, e da leitura assim efetuada, deduzimos a quantidade de colesterol da amostra. Para isso efetuamos primeiramente a construção de um gráfico padrão, partindo de quantidades conhecidas de colesterol, como passamos a descrever.

APARELHO DE FILTRAÇÃO

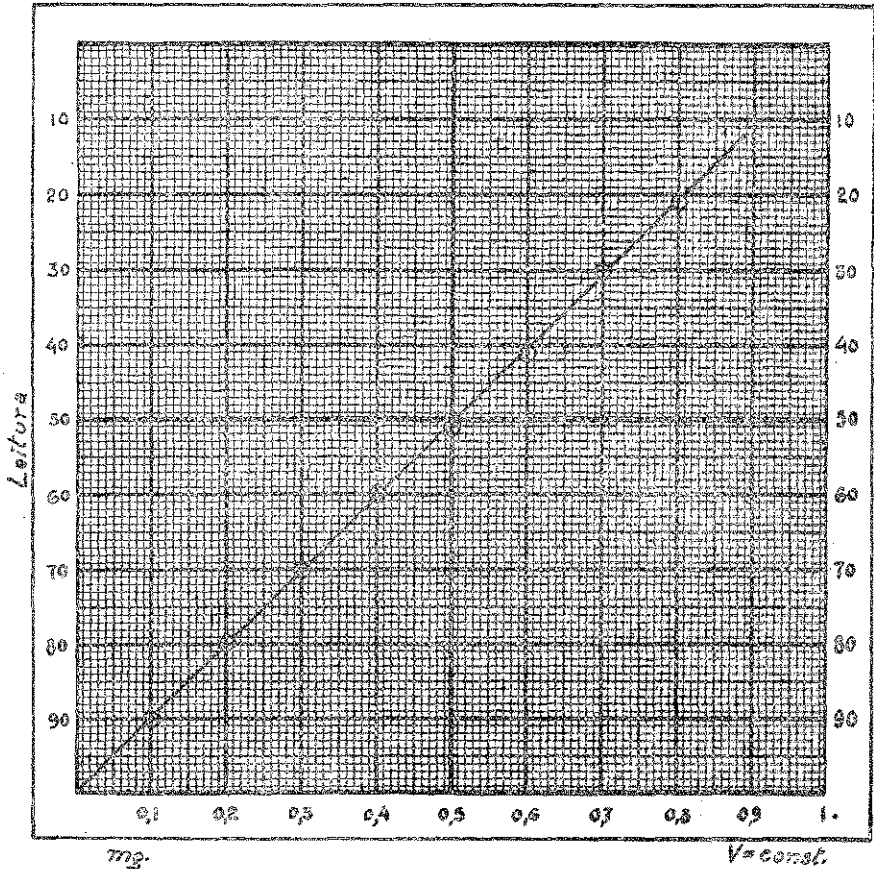
Figura N.º 1



- a — funil de separação.
 b — funil Buchner G3, de vidro com placa porosa.
 c — tubo de ensaio graduado com saída lateral.
 d — banho-maria ($\pm 50^{\circ}\text{C}$).
 e — chapa elétrica de aquecimento.
 f — ligação de borracha.
 g — refrigerante.
 h — balão com saída lateral.
 i — tubo de borracha.

GRAFICO PADRÃO

USADO na determinação do colesterol,
no Lumetron 400 A — Filtro vermelho 650



Pesamos 0,050 g de colesterol Reidel, recristalizado em álcool e seco em estufa a 50° durante 24 horas. Dissolvemos em 50 cm³ de clorofórmio recém destilado. 1 cm³ desta solução contém 0,001 g de colesterol. Tomamos 0,1 cm³, 0,2 cm³, 0,3 cm³, etc, desta solução. Elevamos a 5 cm³ com clorofórmio e efetuamos a reação de Lieberman-Burchard, modificada por Sheftel. Das leituras assim obtidas, traçamos o gráfico padrão.

$$\frac{\text{Cálculo}}{\text{S}} \frac{\text{L} \cdot 100}{\text{S}} = \text{n.º de g de colesterol por 100 g de produto.}$$

L = mg de colesterol na análise.

S = n.º de g da amostra.

Apresentamos abaixo os resultados da dosagem do colesterol em ovos de galinhas, pelo emprêgo do método que acabamos de descrever.

Conteúdo do colesterol em ovos de galinhas:

OVOS COM CARIMBO VERDE

N.º da amostra	g/ovo	g/%
1	0,235	1,85
2	0,274	2,20
3	0,238	1,76
4	0,212	1,42
5	0,164	1,18
6	0,192	1,50
7	0,174	1,31
8	0,217	1,55
9	0,279	2,00
10	0,188	1,48
11	0,264	1,84
12	0,194	1,84
pêso médio dos ovos 50 g		
média de colesterol por ovo, 0,216 g		

OVOS COM CARIMBO RÔXO

N.º da amostra	g/ovo	g/%
13	0,204	1,27
14	0,203	1,48
15	0,174	1,15
16	0,143	1,41
17	0,159	1,01
18	0,190	1,34
19	0,169	1,05
20	0,161	1,18
pêso médio dos ovos 45 g		
média de colesterol por ovo, 0,175 g		

OVOS COM CARIMBO PRETO

N.º da amostra	g/ovo	g/%
21	0,187	1,66
22	0,173	1,47
23	0,156	1,23
24	0,166	1,29
25	0,153	1,40
26	0,198	1,55
27	0,169	1,32
28	0,175	1,63
29	0,187	1,78
pêso médio dos ovos 40 g		
média de colesterol por ovo, 0,170 g		

A mesma técnica é usada para a determinação do número de ovos em macarrões, biscoitos, pães de ovos, etc., porém com uma ligeira modificação na primeira fase do processo, isto é, fazemos primeiramente uma hidrólise ácida para desintegrar a massa.

Pulverizamos a amostra, passamos por uma peneira de 20 malhas, pesamos 2 g da mesma em um becker de 100 cm³, e adicionamos, sob agitação, 10 cm³ de ácido clorídrico (1+1). Aquecemos em banho-Maria durante 30 minutos, agitando ocasionalmente para desintegrar toda a massa.

Esfriamos o frasco, adicionamos cuidadosamente com agitação 8 g de hidróxido de potássio em pastilhas, até que a média do líquido comece a ferver. (Cuidado, esta reação se dá com grande desenvolvimento de calor).

Enquanto quente colocamos o frasco no banho-Maria, cobrimos com um pequeno vidro de relógio e aquecemos 3 horas com ocasional agitação da mistura.

Esfriamos até cerca de 40°, adicionamos 6 cm³ de álcool agitamos vigorosamente por 1 minuto e transferimos a solução para um funil de separação de 250 cm³. O processo continua como ficou dito acima para ovos.

$$\text{Cálculo} \quad \frac{L}{S} \cdot 100 = \text{n.º de g de colesterol por 100 g do produto.}$$

L = mg de colesterol na análise

S = n.º de g da amostra.

Da quantidade de colesterol assim obtida podemos deduzir a quantidade de ovos empregados na fabricação do produto.

Quando tomamos para os ovos a média de 0,170 g de colesterol por ovo, então um macarrão que contém 3 ovos por quilo de massa deverá conter 0,510 g de colesterol por quilo. A quantidade mínima permitida pelo Regulamento Bromatológico do Estado de São Paulo

é 0,450 g de colesterol por quilo, para macarrões, e 0,600 g para pães com ovos.

Foram analisados por êste modo, uma série de produtos que damos a seguir:

BISCOITOS

N.º da amostra	Colesterol g/%
3.103	0,160
3.104	0,140
3.105	0,150
3.106	0,150
3.107	0,110
3.411	0,100
3.412	0,120
3.413	0,060
3.415	0,150
3.417	0,180
3.418	0,120
3.419	0,160
3.420	0,280
3.597	0,060
3.598	0,100
3.770	0,106
4.054	0,128
4.066	0,100

MACARRÕES

N.º da amostra	Colesterol g/%
1.670	0,050
1.700	0,090
2.315	0,060
2.421	0,050
2.814	0,060
3.213	0,080
3.287	0,058
3.288	0,050
3.289	0,055
67	0,050
266	0,120
343	0,070
1.471	0,100
1.472	0,054
1.839	0,044
2.053	0,054

CONTROLE DO MÉTODO

Para podermos julgar a especificidade e exatidão do método por nós usado, passamos a dosar o colesterol em massas às quais adicionamos colesterol em quantidade conhecida. Os resultados obtidos nestas análises permitem-nos declarar que a determinação do colesterol de acôrdo com a técnica descrita é de grande exatidão e especificidade. Podemos pois, aconselhar o uso dêste método nas análises de rotina, para a determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios.

RESUMO

Estudamos neste trabalho o problema da determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios. Foram feitas análises em

18 biscoitos e 16 macarrões, e os resultados obtidos permitem-nos declarar que a determinação da quantidade de ovos em produtos alimentícios de acôrdo com a técnica descrita, é de grande exatidão.

SUMMARY

We have studied in this work the problem of the determination of the amount of eggs in alimentary pastes. We have made analysis in 18 "biscoito" and 16 "macaroni" and the results in these analysis give to us the permission to say that the determination of amount of eggs in alimentary pastes in accord of the technic described is of great accuracy.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — STROHECKER, H. R. e VAUBEL, R. — 1939 — Handbuch der Lebensmittelchemie, ed. A. Juchenack, E. Baines, B. Bleyer e J. Grossfeld, Vol. V, 261, Berlin.
- 2 — TILLMANS, J., RIFFART, H., KUHN, A. — 1930 — Z. Utersuch. Lebensm., 60: 361.
- 3 — LAMPERT, L. M. — 1930 — Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 2: 159.
- 4 — HAENNI, E. O. — 1941 — J. Ass. Off. Agr. Chem., 24: 119.
- 5 — THANNHAUSER, S. J. e SCHABER, H. — 1928 — Z. Phisiol. Chem., 127: 278.
- 6 — DAM, H. — 1928 — Biochim. Z., 194: 188.
- 7 — KUSUI, K. — 1929 — Z. Phisiol. Chem., 181: 121.
- 8 — RIFFART, H. e KELLER, H. — 1934 — Z. Untersuch, Lebensm., 68: 113.
- 9 — LIEBERMAN, C. — 1885 — Ber., 18: 1803.
- 10 — BURCHARD — 1914 — Journ. Pharm. Chim., 9: 146.
- 11 — SHEFTEL, A. G. — 1944 — Journ. Lab. Clin. Med., 29: 875.

FREQUÊNCIAS DE COGUMELOS NA VAGINA E IMPORTÂNCIA DÊSSES MICROORGANISMOS COMO AGENTES DE VULVOVAGINITES. (*)

FLORIANO DE ALMEIDA

Docente livre e Assistente de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de São Paulo.

CARLOS DA SILVA LACAZ

Docente livre e Assistente de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de São Paulo.

DOMINGOS ANDREUCCI

Assistente de Histologia e Embriologia e Assistente extra-numerário da Clínica Obstétrica da Fac. Med. Univ. S. Paulo.

OLGA DE BARROS

Química do Instituto Adolfo Lutz.

PLANO GERAL DO TRABALHO

A

- I — Considerações gerais. Achados de diversos pesquisadores. Fatores que condicionam o aparecimento de leveduras na vagina. A flora vaginal nas portadoras de leveduras.
- II — Leveduras encontradas na vagina. Fontes de infecção.
- III — Significado de uma levedura no conteúdo vaginal. Possibilidades de sua patogenicidade. O quadro clínico da vulvovaginite blastomicética. Relação entre sintomas e achados micológicos.
- IV — Diagnóstico de laboratório da vulvovaginite blastomicética. Valor dos exames imuno-alérgicos.
- V — Princípios gerais de terapêutica.

B

- I — Pesquisas realizadas. Classificação das pacientes. Método de estudo.
- II — Resultados obtidos.

C

Referências bibliográficas.

(*) Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina (Secção de Micologia) e no Instituto Adolfo Lutz.

O material utilizado neste trabalho é quase todo ele proveniente dos ambulatórios da Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina de São Paulo, do Serviço de Ginecologia da Sta. Casa de Misericórdia e da Liga de Combate à Sífilis.

I — CONSIDERAÇÕES GERAIS. ACHADOS DE DIVERSOS PESQUISADORES. FATORES QUE CONDICIONAM O APARECIMENTO DE LEVEDURAS NA VAGINA. A FLORA VAGINAL NAS PORTADORAS DE LEVEDURAS.

Os estudos referentes à flora vaginal têm sido realizados de modo sistemático por numerosos pesquisadores, mas a importância etiopatogênica de muitos microorganismos do conteúdo vaginal, ainda é objeto de controvérsias e discussões as mais diversas.

Já em 1840, Wilkinson demonstrara a presença de leveduras na vagina e, no entanto, ainda hoje discute-se o papel que êsses cogumelos desempenham na gênese de vulvovaginites. Cremos que estas discussões não se justificam, quando se compreender que os dados de laboratório deverão sempre ser interpretados de acôrdo com a clínica. Se um exame micológico cuidadoso revela, repetidas vêzes, a presença de uma levedura na vagina e se o exame ginecológico atesta a presença de lesões de vulvovaginite, se a paciente conta em sua história, manifestações de prurido e corrimento, todos êstes elementos, considerados em conjunto, conduzem a crer no papel patogênico da levedura. Afastadas outras causas produtoras de vulvovaginites (pelos exames laboratoriais e clínicos), o diagnóstico de levedurose vulvo-vaginal se impõe e mais o especialista se certifica do diagnóstico estabelecido, quando a terapêutica específica oferece resultados animadores e não raro brilhantes.

Plass, Hesseltine e Borts (1931) afirmam em seu interessante trabalho "Monilia vulvovaginitis", que a literatura médica à respeito dêsse assunto é muito vasta, e até hoje não se chegou a um acôrdo entre os estudiosos, sôbre o papel desempenhado pelas leveduras como agentes causais de vulvovaginites.

Sabe-se que a prenhez é um dos grandes fatores que condicionam o aparecimento de leveduras na vagina.

Carter e Jones (1937) estudaram a flora vaginal de 114 gestantes aparentemente normais e de 100 pacientes não grávidas. Leveduras foram isoladas de 32% das 114 gestantes e 14% no segundo grupo.

Jones e Martin (1938) realizaram pesquisas sôbre a flora micótica de 52 grávidas e 16 não grávidas, encontrando as mesmas percentagens dos autôres anteriormente citados.

O trabalho de Carter e Jones (1937) é excelente e nos dá uma idéia geral a respeito da flora vaginal da "mulher normal". Afirmam êsses autôres que a concepção de flora vaginal normal é falsa e irregular, porque os achados bacteriológicos variam com uma série enorme de fatores, tais como hábitos de higiene da paciente, estação do ano, duração de prenhez, menstruação, emprêgo de banhos, duchas e antissépticos vaginais, etc.

Carter e Jones (1937) empregaram o termo "normal" às pacientes que apresentavam os seguintes requisitos:

- a) Pacientes que ao exame físico geral não apresentavam alterações metabólicas e endócrinas dignas de nota;
- b) ausência de corrimento vaginal e de lesões para o lado da vulva, vagina e cervix;
- c) ausência de manifestações de abôrto recente;
- d) ausência de gonococos e de *Trichomonas*;
- e) nenhuma das pacientes havia se submetido a qualquer forma de terapêutica vaginal, tais como duchas, tampões ou supositórios.

Êstes autôres dividiram as pacientes em três grupos, conforme o estudo dos esfregaços vaginais:

Grupo 1 — Presença exclusiva de bacilos de Döderlein, ou de bacilos de Döderlein + *Staphylococcus albus* ou leveduras.

Grupo 2 — Presença de bacilos de Döderlein em pequeno número e de outros microorganismos.

Grupo 3 — Ausência de bacilos de Döderlein.

Os resultados obtidos após o estudo dos esfregaços, divididos em 3 grupos, foram os seguintes:

	<i>Grávidas</i>		<i>Não grávidas</i>	
	N.º	%	N.º	%
Tipo I	19	16,66	15	15
Tipo II	45	39,47	15	15
Tipo III	50	43,85	70	70
Total	114		100	

Os achados bacteriológicos dos referidos autôres podem ser assim esquematizados:

	Grávidas	
	Pretas	Branças
Bacilos difteróides	74%	70%
<i>Staphylococcus albus</i>	78%	61%
<i>Streptococcus anaeróbios</i>		
<i>Streptococcus Gamma</i>	20%	21%
<i>Streptococcus alpha</i>		
<i>Escherichia coli</i>	10%	12%
Leveduras	36%	21%
Bacilos de Döderlein	49%	73%

	Não grávidas	
	Pretas	Branças
Bacilos difteróides	74%	74%
<i>Staphylococcus albus</i>	52%	48%
<i>Streptococcus anaeróbios</i>	54%	46%
<i>Streptococcus gamma</i>	32%	44%
<i>Streptococcus alpha</i>	8%	10%
<i>Escherichia coli</i>	8%	10%
Leveduras	14%	14%
Bacilos de Döderlein	22%	36%

O trabalho desses autôres é muito interessante porque eles estudaram a flora vaginal anaeróbia e microaerófila, de grávidas e de mulheres não grávidas.

Preconizam Carter e Jones o estudo cuidadoso da flora vaginal das "não gestantes" e conforme o resultado obtido, tratá-las convenientemente.

Analisando os fatores que condicionam o aparecimento dos bacilos de Döderlein no trato vaginal, Carter e Jones (1937) citam o trabalho de Weinstein, Bogin, Howard e Finklestone (1936), os quais demonstram o papel da acidez vaginal na prevenção de infecções, particularmente durante a prenhez.

Sugerem estes autôres que a estrina aumenta nas mulheres, à medida que elas alcançam o período de puberdade, assim como nas grávidas, especialmente nos últimos meses de gestação e que a estrina intensifica a acidez vaginal, favorecendo o crescimento dos bacilos de Döderlein. Assim, a administração de estrina a macacas, intensifica a acidez vaginal, com aumento dos bacilos de Döderlein.

Há uma relação muito estreita entre flora bacteriana vaginal, pH, conteúdo de glicogênio da mucosa e altura da camada das células vaginais.

O metabolismo da mucosa vaginal, difícil de se determinar, porque, ao que parece, não existe um método capaz de avaliar a quantidade daquela substância no conteúdo vaginal, está em íntima relação com a estrina. O glicogênio transforma-se em glicose na vagina e à seguir em ácido láctico. Este ácido produz, na vagina normal, um pH mais ou menos igual a 4,0, ótimo para o desenvolvimento dos bacilos de Döderlein. As leveduras vivem igualmente neste pH, preferindo todavia um pH de 5 a 5,5.

Está claro que, à medida que o pH passa a ser neutro ou alcalino, a flora torna-se mixta e esta hipoacidez cria condições especiais para a proliferação de microorganismos patogênicos que vegetam bem em pH de 6,0 — 7,6.

Vemos, pois, que uma “vagina normal” deve conter unicamente bacilos de Döderlein, pH = 3,9 — 4,3 e uma alta camada de células epiteliais.

O aumento do glicogênio durante a prenhez e a relação desse aumento com a flora acidúrica foi também estudada em 1936 por Oberst e Plass.

Um outro trabalho que merece referências especiais, nesta parte introdutória, é o de Carter, Jones e Thomas, (1940).

Estes autôres estudaram, em 200 grávidas, a incidência de leveduras na vulva e na vagina, a relação entre os sintomas apresentados pelas pacientes e os achados micológicos, a possibilidade de alguma correlação existente entre aglutininas no sôro, sensibilidade cutânea e cultivos positivos para leveduras, a incidência de *Trichomonas* em pacientes com leveduras e a relação existente entre os vários tipos de flora vaginal e leveduras e *Trichomonas*.

Estes autôres, em 200 pacientes, 83 primíparas e 117 múltiparas, obtiveram 86 cultivos de leveduras (43%), sendo que de 54 brancas isolaram, apenas 11 vezes cogumelos leveduriformes (20,4%) e de 146 pretas, 75 vezes (51,4%).

A frequência de leveduras na vagina de diabéticas tem sido assinalada repetidas vezes, mostrando êste fato a importância do fator “terreno” na implantação e proliferação das leveduras.

Arce (1940), dá ainda muita importância ao terreno congestivo-varicoso das pacientes e à insuficiência perineal como causas predisponentes à vulvovaginite blastomicética.

Hesseltine (1933), em 21 casos de mulheres diabéticas encontrou, em 18, cogumelos leveduriformes na vagina.

A frequência de leveduras na vagina está, igualmente, na dependência da higiene pessoal. Woodruff e Hesseltine (1938) verificaram por ex. que, em pacientes pretas a incidência de leveduras é maior (41%), ao passo que nas brancas era de 33%. Nas brancas de higiene mais acentuada, a incidência foi de 14%.

A flora vaginal nas portadoras de leveduras: é sempre interessante que, ao lado de cultivos do material vaginal, se pratique um esfregaço, corando-o pelo método de Gram ou por uma de suas modificações.

Vimos, linhas atrás que, segundo Carter e Jones (1937), os esfregaços vaginais podem ser divididos em três tipos:

Tipo I — Bacilos de Döderlein somente ou bacilos + leveduras.

Tipo II — Bacilos de Döderlein com outros microorganismos.

Tipo III — Ausência de bacilos de Döderlein.

Segundo as verificações de Carter, Jones e Thomas (1940), as leveduras foram mais cultivadas em mulheres com flora vaginal do tipo II.

A maioria das pacientes com *Trichomonas*, não apresentava bacilos de Döderlein, pertencendo, pois, ao tipo III.

Nas 200 mulheres estudadas por Carter, Jones e Thomas os resultados obtidos quanto aos tipos de esfregaços vaginais podem ser assim resumidos:

	TIPO I 63 PACIENTES		TIPO II 38 PACIENTES		TIPO III 99 PACIENTES	
	Trichomonas	Candida	Trichomonas	Candida	Trichomonas	Candida
N.º	9	11	13	15	59	31
%	14,3	17,5	34,2	39,5	59,5	31,3

Nos casos por nós observados, a maioria dos cogumelos isolados foi em mulheres com flora do tipo II, o que está em concordância com o trabalho de Carter, Jones e Thomas (1940).

II — LEVEDURAS ENCONTRADAS NA VAGINA. FONTES DE INFECÇÃO.

Diversas espécies de leveduras têm sido isoladas da vulva e vagina, em casos normais e de vulvovaginites.

Uma das espécies mais frequentemente encontradas no trato vaginal é a *Candida stellatoidea* (pesquisas realizadas nos Estados Unidos). Este fungo produz colônias muito características, com uma pequena zona central elevada, de onde partem “braços” radiados, de maneira irregular.

A *Candida stellatoidea* não cresce na superfície do caldo-Sabouraud. As suas colônias, em ágar-sangue, a 37°C, assemelham-se a “estrelas no céu” (Stars in the sky). Não fermentam, com a produção de ácido e gás, a glicose e a maltose.

Carter, Jones e Thomas, em 200 grávidas, isolaram de 86 (43%), cogumelos leveduriformes pertencentes aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Cryptococcus*. A maioria das amostras pertencia à espécie *stellatoidea*, vindo em segundo lugar a *C. albicans*. Vinte e sete (27) das amostras pertenciam aos gêneros *Saccharomyces* e *Cryptococcus*.

As amostras de *C. albicans* foram inoculadas em coelhos por via endovenosa (1 cm³ de suspensão salina a 1%). A morte ocorria nesses animais, dentro de 1 a 5 dias.

A *C. stellatoidea*, injetada na dose de 2 cm³ de uma suspensão a 1%, não se mostrou patogênica para coelhos, inoculados por via venosa.

Além dessas espécies, a *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, já têm sido isoladas da vagina. Leveduras pertencentes aos gêneros *Torulopsis*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* também têm sido igualmente isoladas. Os caracteres diferenciais das leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, são dados no quadro retirado do trabalho de Mackinnon e Artagaveytia (1945).

Fontes de infecção: Ainda não estão perfeitamente estabelecidas quais as fontes reais da infecção blastomicética vulvovaginal.

As leveduras, veiculadas para a vagina, aí se desenvolvem e se adaptam quando o meio lhes é favorável, conforme já vimos anteriormente.

Diversos pesquisadores acham que as fontes principais de infecção são representadas pelas leveduras encontradas nas fezes

e pequenas lesões do sulco interglúteo; devido à proximidade do anus com a vulva, elas teriam possibilidade de passar para o conteúdo vulvo-vaginal.

É possível, também, que as leveduras encontradas por alguns autôres no sulco bálano-prepucial do homem, sejam levadas, através o coito, para a vagina.

Ninõ (1938), acha que a água empregada nas lavagens vaginais pode ser veiculadora dos fungos.

III — SIGNIFICADO DE UMA LEVEDURA NO CONTEÚDO VAGINAL. POSSIBILIDADES DE SUA PATOGENICIDADE. O QUADRO CLÍNICO DA VULVOVAGINITE BLASTOMICÉTICA. RELAÇÃO ENTRE SINTOMAS E ACHADOS MICOLÓGICOS.

A nosso ver, o achado de uma levedura no conteúdo vaginal deve sempre ser analisado de acôrdo com os dados clínicos (subjetivos e objetivos).

Plass, Hesseltine e Borts (1931) citam Kerr, Fulkerson, Crossen, Graves e Frank os quais admitem a patogenicidade da levedura nas vulvovaginites.

Castellani e Taylor (1935) duvidam desta patogenicidade, porque as leveduras podem ser encontradas na vagina sem determinar o aparecimento de sintomas (portadores assintomáticos).

Stephan acredita que as leveduras não representam os agentes principais na inflamação, pois são geralmente secundários e estão associados a outros processos inflamatórios.

Não há dúvida que leveduras pertencentes ao gênero *Candida* podem estar presentes na vulva e vagina, sem determinar qualquer processo inflamatório, mas em determinadas condições, êstes mesmos cogumelos são capazes de provocar alterações para o lado da parede vaginal.

A relação entre leveduras na vagina e "sapinho bucal" dos recém-nascidos, tem sido muito investigada, achando Woodruff e Hesseltine (1938) que, uma criança de mãe infectada tem 35 vezes mais chance de desenvolver ou de adquirir o sapinho do que crianças de mães não infectadas.

Para um diagnóstico clínico seguro de vulvovaginite blastomictica, na sua forma clássica, impõe-se a presença de um corrimento esbranquiçado ou de placas vaginais, semelhantes a leite coalhado.

Frequentemente se encontra a associação de leveduras com o *Trichomonas vaginalis*, de tal modo que o quadro clínico pode se apresentar alterado.

Nas grávidas, particularmente no último trimestre da gravidez, êste dado é verdadeiro.

O quadro clínico da vulvovaginite blastomicética: Castellani divide as vaginites por leveduras em dois tipos clínicos: um, denominado membranoso, em que a mucosa vaginal fica recoberta por placas membranosas brancas (sapinho vaginal puro) e um segundo tipo — *purulento* — traduzido por um corrimento vaginal rico em cogumelos.

Winckel acha que o sintoma dominante é o prurido vulvar, às vezes acompanhado de ardor à micção e dôres pelvianas.

Entre as mulheres não grávidas, portadoras de vulvovaginite blastomicética, Plass e colaboradores (1931) afirmam que os sintomas se intensificam no período pré-menstrual, quando a acidez vaginal aumenta, em contraste com as infecções produzidas pela *Trichomonas vaginalis*.

Aquí, o desconforto é mais pronunciado durante ou depois da menstruação. Nota-se, frequentemente, nos casos de infecção, a vermelhidão da mucosa dos pequenos lábios e da vagina (1/3 inferior). O processo inflamatório pode envolver a pele da região perianal, com o desenvolvimento de um intertrigo.

Quanto ao corrimento, algumas mulheres o apresentam espesso e amarelado, ao passo que a maioria não revela êste dado.

A sinonímia da moníliase vaginal é muito grande. As expressões “vulvovaginite blastomicética”, “vulvovaginite micótica”, Soor-kolpitis”, “Muguet vulvovaginal”, “Vulvovaginal thrush”, “Vulvite aftosa”, “Micose vaginal”, “Vulvovaginite sacaromicética”, têm sido utilizadas para designar o quadro clínico do “sapinho vaginal”. La Blaye, citado por Popoff e colaboradores (1929), considera as seguintes formas anátomo-clínicas de levedurose vulvovaginal: vaginite cremosa, vulvite cremosa, vulvite ulcerativa, vulvite pseudo-leucoplásica, vulvite eczematiforme, prurido micótico da vulva ou vulvite micótica pruriginosa forma vesículo-pustulosa cutânea.

Arce (1940), descrevendo os sintomas da vulvovaginite blastomicética, distingue os subjetivos e os objetivos. No grupo dos sintomas subjetivos, assinala o *prurido* que é mais pronunciado à

noite e nos períodos que precedem à menstruação, *aumento da sensibilidade vaginal, calor local, ardor ao urinar e leucorréia.*

Entre os sintomas objetivos, nos casos típicos, a vulva está edemaciada, e nas paredes vaginais aparecem pequenos pontos brancos ou branco-amarelados ou então um processo inflamatório difuso, vulvovaginal.

Arce (1940) diz que a "monilíase vulvovaginal" constitui um assunto de grande importância diagnóstica para o médico, achando que os sintomas revelados pela paciente são, quase sempre, devidos à produção de substâncias intermediárias, resultantes do metabolismo das leveduras quando atuam sobre a glicose.

Plass e colaboradores (1931) acham que nos casos de corrimento vaginal em que se encontram leveduras associadas a *Trichomonas*, o tratamento deve ser dirigido principalmente contra o fungo, pois este é, possivelmente o agente responsável, mais provável pelos sintomas.

Relação entre sintomas e achados micológicos: Segundo Carter, Jones e Thomas (1940), o sintoma dominante no quadro da vulvovaginite blastomicética é o prurido. Os outros sintomas, tais como corrimento, ardor, etc, muitas vezes só aparecem quando as lesões já são antigas ou em manifestações agudas de vulvovaginite.

Ao que parece, cogumelos pertencentes aos gêneros *Torulopsis* e *Saccharomyces* não possuem um grande significado do ponto de vista médico. Os *Saccharomyces* pertencem ao grupo das leveduras de interesse comercial e a micoterapia com tais fungos foi mesmo utilizada para a manutenção de uma flora vaginal acidúrica.

Daí a importância do micologista identificar perfeitamente os cogumelos isolados, pois leveduras filamentosas anascógenas, pertencentes ao gênero *Candida*, possuem maior valor do ponto de vista médico.

Segundo Carter, Jones e Thomas (1940), o prurido vaginal nos casos de vulvovaginite blastomicética, é devido, principalmente, a três espécies de *Candida*: *albicans*, *stellatoidea* e *tropicalis*.

Segundo Neuberg e col., certos produtos intermediários da fermentação da glicose, tais como o ácido pirúvico e o acetaldeído, são os responsáveis por alguns sintomas apresentados pelas pacientes, principalmente o prurido.

Nas pacientes em que fungos dos gêneros *Saccharomyces* ou *Cryptococcus* foram isolados, nenhum sintoma foi observado pelos autores acima referidos.

IV — DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO DA VULVOVAGINITE BLASTOMICÉTICA. VALOR DOS EXAMES IMUNO-ALÉRGICOS.

a) *Exame microscópico.* — O material da vulva ou da vagina deverá ser colhido com o auxílio de um estilete em cuja extremidade se coloca um tampão de algodão esterilizado.

Obtido o material, devemos em primeiro lugar praticar um esfregaço, para depois sementeamos em Sabouraud-glicose (placas).

O esfregaço, corado pelo método de Gram ou uma de suas variantes, deverá ser cuidadosamente examinado, anotando o analista a presença dos bacilos de Döderlein, micélios, flora Gram negativa, piócitos, células vaginais, etc.

Como vimos linhas atrás, Carter e Jones (1937) classificam a flora vaginal em três tipos, numa ligeira modificação da velha classificação de Schröder (1921).

Leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, segundo Carter, Jones e Thomas (1940), são frequentemente isoladas de pacientes com o tipo II da flora, ao passo que as *Trichomonas* são observadas comumente nas mulheres com flora tipo III.

Achamos conveniente que, ao lado do esfregaço para a pesquisa de cogumelos, o analista realize um exame a fresco para a procura de *Trichomonas*.

Em alguns casos, apesar do exame microscópico cuidadoso, não se revelam cogumelos e no entanto, as culturas se mostram positivas, mostrando êste fato que o cultivo em meios seletivos constitui um método mais eficiente para o diagnóstico.

Convém que se anote, ao exame microscópico, a presença de filamentos ou de células gemulantes e a quantidade de leveduras encontradas.

Nos casos por nós observados, as leveduras foram, quase sempre encontradas em mulheres com flora I e II, sendo a reação do conteúdo vaginal, ácida.

b) *Culturas.* — O “tampão” vaginal deverá ser imediatamente semeado em placas de Sabouraud-glicose, mantidas a 24-28°C. ou a 37°C. Quando o material não puder ser semeado diretamente, devemos colocar o tampão em um tubo de ensaio contendo caldo-Sabouraud ou solução de ácido cítrico a 10%.

Agita-se depois o meio e passa-se para Sabouraud-glicose. O ágar-mostura e o ágar-mel constituem, igualmente, ótimos meios para o isolamento de leveduras.

c) *Identificação*. — Isoladas as colônias suspeitas de leveduras, pode-se praticar um exame microscópico para confirmar o diagnóstico e, em seguida, à custa dos dados culturais, micromorfológicos e bioquímicos, identificamos a amostra isolada, com relativa facilidade. Para tal, tratando-se de leveduras do gênero *Candida*, seguimos a orientação de Mackinnon e Atagaveytia (1945) ou a de Martin, Jones, Yao e Lee Jr. (1937).

d) *Provas sorológicas*. — Entre as reações que podem ser praticadas no sôro das pacientes, devemos citar a sôro-aglutinação e a reação de fixação do complemento. Para as provas de sôro-aglutinação, Carter, Jones e Thomas (1940) prepararam um antígeno partindo de 5 amostras de *Candida*, isoladas da vagina. Culturas obtidas em Sabouraud-glicose (24 horas), foram suspensas em solução fisiológica, seguindo-se a centrifugação.

Diluição do antígeno a 1:1.000 era realizada.

Sôro diluído e antígeno eram agitados 30 minutos em um agitador mecânico; depois, colocavam-se os tubos em geladeira, durante a noite, voltando-se a agitar no dia seguinte, durante 30 minutos. Seguia-se a leitura da reação.

Os resultados das provas de sôro-aglutinação, obtidos por Carter, Jones e Thomas (1940), foram os seguintes:

De 100 pacientes cujo sôro foi verificado, 35 mostraram possuir aglutininas para as seguintes espécies de *Candida*, ensaiadas: *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* (*M. candida*), *C. krusei*, *C. parapsilosis*.

Os títulos de aglutininas encontrados variavam de 1:80 a 1:5, respectivamente.

Das 35 pacientes em cujos sôros se demonstraram aglutininas, cultivos positivos para *Candida* foram obtidos em 12 (34,4%).

Das 65 pacientes sem aglutinas no sôro, 22 (33,8%) revelaram cultivos vaginais positivos.

Os autôres chegaram à conclusão de que o fato da presença ou ausência de aglutininas no sôro das pacientes não deve ser empregado como índice de infecção vaginal.

A nosso ver, a reação de fixação do complemento, quando bem interpretada de acôrdo com os dados clínicos e quando realizada com antígenos bem sensíveis, poderá prestar maiores subsídios ao diagnóstico e ao contrôle de cura das vulvovaginites blastomicéticas.

e) *Reações intradérmicas*. — Carter, Jones e Thomas, preparando um antígeno de modo análogo ao utilizado para as provas

de sôro-aglutinação, tendo apenas o cuidado de destruir as leveduras por aquecimento, adicionando como preservativo 0,35% de tricresol, verificaram que em 100 mulheres estudadas, 49 mostraram alguma reação aos cinco antígenos ensaiados.

Das 49 pacientes com reações positivas, 15 (30,6%) revelaram cultivos positivos para *Candida*, sendo que em 12 delas, a positividade da reação correspondia ao antígeno idêntico à amostra isolada da vagina. Na maioria das pacientes, contudo, as reações positivas foram obtidas com outras espécies de *Candida*.

Das 51 pacientes com reações negativas, leveduras pertencentes ao gênero *Candida* foram isoladas em 19 (37,3%).

A percentagem de pacientes com leveduras na vagina foi mais elevada no grupo das que apresentavam reações intradérmicas negativas.

f) *Inoculação da levedura em animais sensíveis.* — Plass e colaboradores (1932) citam as experiências realizadas por Winckel no sentido de inocular vaginas de coelhas com leveduras isoladas de casos humanos de vulvovaginite, a fim de tentar reproduzir um quadro de “sapinho”; conseguiu, porém, a produção de uma ligeira vermelhidão da mucosa, enquanto Colpe, utilizando as mesmas espécies, verificou uma congestão difusa, assim como secreção serosa, que apareceu no segundo dia, desaparecendo ao fim de 10 a 12 dias.

Hausmann, citado por Plass e colaboradores (1931), inoculou por via vaginal uma mulher grávida, observando 9 a 10 dias depois, prurido e queimação vaginal.

O coelho é um animal muito sensível à inoculação venosa da *Candida albicans*.

V — PRINCÍPIOS GERAIS DE TERAPÊUTICA.

Está praticamente estabelecido que o melhor tratamento da vulvovaginite blastomicética reside na aplicação local da violeta de genciana, em solução aquosa a 1 ou 2%.

Segundo Lewis e Hopper (1943), a violeta de genciana constitui a terapêutica mais indicada em todos os casos de leveduroses cutâneas ou mucosas.

Plass e colaboradores (1931), acham, igualmente, que a violeta de genciana representa a terapêutica ideal da vulvovaginite por leveduras (monilíase vaginal). Afirmam textualmente êsses autores: “Gencian violet, in 1 per cent aqueous solution appears to be an

almost specific therapeutic agent. Frequently, two or three applications are sufficient to relieve the itching, although longer treatment is probably necessary to irradicate the organism, completely."

A violeta de genciana é um corante à base da trifenilmetana, possuindo em sua estrutura química 5 ou 6 grupos metílicos.

Ao lado da aplicação local da violeta de genciana, podemos indicar lavagens com borato ou bicarbonato de sódio, permanganato de potássio, etc.

Hesseltine (1937) acha que o iodo é o elemento de mais alto poder fungicida, sendo todavia irritante. Recomenda êste Autor, o emprêgo de supositórios vaginais, compostos de iodeto e iodato de potássio na proporção de 6,2 para 1. Desta mistura se originaria Iodo livre, em contacto com o meio ácido vaginal. Alguns Autôres recomendam o emprêgo do picrato de prata em supositórios vaginais.

A vacinoterapia não é muito indicada, pois a micose é benigna, não requerendo, portanto, medidas imunobiológicas de tratamento.

Alguns Autôres indicam a ingestão de cabornato de magnésio e de cálcio em doses elevadas, assim como dieta isenta de cereais, batata, pão e amiláceos. Em certas formas de vulvovaginite, rebeldes ao tratamento pela violeta de genciana, alguns autôres recomendam o mercúrio crômo.

— B —

I — PESQUISAS REALIZADAS. CLASSIFICAÇÃO DAS PACIENTES. MÉTODOS DE ESTUDO.

Tôdas as pacientes por nós estudadas eram primariamente divididas em dois grupos: o das gestantes e o das não gestantes.

Uma observação cuidadosa era feita, preenchendo-se os dados constantes de uma ficha padrão, na qual se anotavam o nome da paciente, côr, estado civil, profissão, idade da prenhez, número de partos, número de abortos, dados sôbre corrimento, na infância, quando solteira ou casada, e neste caso por ocasião da gravidez, cuidados higiênicos, etc.

A côr, consistência, aspecto, quantidade, cheiro e periodicidade do corrimento eram anotados. O prurido, a influência da menstruação sôbre o corrimento, a presença de "assadura" eram também suficientemente anotados, ao lado de exame dos órgãos genitais externos e internos (exame das paredes vaginais e do colo).

Feito o exame clínico cuidadoso e preenchida a ficha, o material era colhido com o auxílio de um estilete montado com algodão, em uma das extremidades, tudo esterilizado e imediatamente enviado ao laboratório.

Sistemáticamente fazíamos um esfregaço corado pelo método de Gram, para o estudo da flora vaginal.

As culturas eram praticadas em meios de Sabourau-glicose, dispostos em placas de Petri, assim como em ágar-glicosado e acidificado pelo ácido tartárico a 1%, colocados à temperatura de 37°C.

A identificação dos cogumelos leveduriformes pertencentes ao gênero *Candida*, foi realizada segundo a orientação de Martin e colaboradores (1937). Recorremos sempre, nos casos de dúvida, ao método do auxanograma em fontes azotadas e hidrocarbonadas, diferenciando as leveduras do gênero *Candida* de acôrdo com os dados colhidos no recente trabalho de Mackinnon e Artagaveytia (1945).

Os resultados obtidos estão adiante expostos.

A identificação das leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, segundo Martin e colaboradores (1937), se faz do seguinte modo:

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS PERTENCENTES AO GÊNERO *CANDIDA*

Segundo Martin, Jones, Yao e Lee Jr.

1 — Isolar o fungo em ágar-Sabouraud.

Glicose Bacto	40 g.
Peptona Fairchild	10 g.
Ágar	25 g.
Água destilada	1.000 cm ³ .

Misturar no autoclave, filtrar através algodão. Distribuir e esterilizar. Não há necessidade de determinação do pH.

2 — Transplantar para Sabouraud-líquido e incubar a 37°, durante 48 horas.

Para o Sabouraud-líquido, usar a mesma fórmula que a anterior, menos o ágar. Não há necessidade de filtração, nem de determinação do pH. Preparar, distribuir e esterilizar.

3 — Depois de se anotar o tipo de crescimento em Sabouraud líquido, o sedimento é agitado e semeado em placas de ágar-sangue (pH igual a 7,4) e incubado a 37°C, durante 10 dias. Anotar o tipo de colônia e passar uma delas para um tubo de Sabouraud-glicose sólido.

Preparar em primeiro lugar o ágar-simples.	
Extrato de carne Difco	3 g.
NaCl	5 g.
Peptona Difco	10 g.
Ágar	25 g.
Água destilada	1.000 cm ³ .

Misturar no autoclave, pH igual a 7,6. Filtrar. Distribuir. Autoclavar.

O ágar-sangue será preparado com 10% de sangue estéril, citratado, de carneiro.

4 — Estudada a colônia em ágar-sangue, transplantar uma colônia para Sabouraud-glicose, incubando-a a 37°C, durante 24-48 horas. Passar depois para um tubo com cenoura, deixada à temperatura ambiente, para pesquisa de ascosporos. O restante do material passa-se para ágar-simples (pH igual a 7,4).

5 — Prepara-se uma suspensão da levedura (1 a 2 cm³ de uma suspensão espessa) e 4 tubos com caldo, contendo os seguintes açúcares: glicose, sacarose, lactose e maltose. Incubar 10 dias a 37°C.

Adiciona-se em cada tubo um pouco de uma mistura de vaselina-parafina.

<i>Caldo + H. C.</i>	
Extrato de carne	3 g.
NaCl	5 g.
Peptona Difco	10 g.
Água destilada	900 cm ³ .

Aquecer até ferver e titular exatamente o pH à 7,2. Adicionar 100 cm³ da solução indicadora. Filtrar. Distribuir quantidades de 10 cm³. Autoclavar 15 minutos. Adicionar 0,5 cm³ de uma solução a 20% do H.C., esterilizado por filtração em Seitz. O caldo não deverá ser conservado mais de 2 a 3 semanas, devido à mudança no seu pH.

Para a obtenção rápida de ascos, utilizamos geralmente uma água de fécula de batata.

Solução indicadora:

Bromotimol azul	0,04 g.
Água destilada	100 cm ³ .

Adicionar uma pequena quantidade de NaOH N para tornar a solução alcalina.

6 — Preparar lâminas em “corn meal ágar”.

62,5 g. de “corn meal” em 1.500 cm³ de água. Aquecer a 60°C. durante 1 hora. Filtrar através papel. Perfazer um volume de 1.500 cm³. Adicionar 19 g. de ágar. Esterilizar. Filtrar em algodão. Distribuir. Esterilizar. Não há necessidade de ajustar o pH. Fundir e distribuir em camada fina sobre lâminas esterilizadas, e semear a cultura. Semeado o material, deixa-se incubado à temperatura ambiente, durante vários dias.

Desidratar a lâmina, deixando-a à temperatura ambiente durante 36 a 48 horas. Corar 15 minutos com Lacto-fenol-azul-algodão.

Cristais de fenol	20 g.
Ácido láctico	20 cm ³ .
Glicerina	40 cm ³ .
Água destilada	20 cm ³ .

Dissolver em fogo brando (banho maria). Adicionar 1 g. de azul algodão.

Descarregar o corante e imergir em álcool a 70% durante 10 minutos (até que o ágar seja completamente descorado). Passar a lâmina em álcool a 95%, acetona, mistura em partes iguais de acetona e xilol e finalmente xilol. Tirar do xilol e montar imediatamente em bálsamo neutro.

7 — Pesquisar ascosporos em cenoura.

Nas pesquisas que empreendemos, por falta do “corn meal”, utilizamos para o preparo das lâminas o meio de Rivalier que é um ágar-mole, a 0,5%.

Após a semeadura, o material era deixado na ante-câmara da estufa (temperatura de 24-28°C), durante 3 a 4 dias. Secar em estufa a 37°C.

Em alguns casos torna-se um pouco difícil a determinação de certas espécies de leveduras e outras provas são necessárias, tais

como o método do auxanograma em fontes azotadas e de hidratos de carbono.

Não chegamos a identificar até espécie, leveduras pertencentes aos gêneros *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Saccharomyces*, pois achamos que tais fungos precisam sofrer um estudo crítico, de revisão, das espécies conhecidas, adotando-se então uma chave de classificação que atenda aos interesses práticos e científicos.

Na Secção de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, adotamos o seguinte plano geral na identificação das leveduras de interesse médico:

1 — *Isolamento da levedura*: Meios de Sabouraud-glicose, Gelese glicosada e acidificada pelo ácido tartárico a 1-2%, Ágar-mel e Sabouraud-mel. Quando o material está muito contaminado, semeamos primeiramente em Sabouraud-líquido ou em solução de ácido cítrico a 10%. Após 12 a 24 horas em temperatura ambiente ou na ante-câmara da estufa, passamos para os meios acima assinalados, incubando-os durante 24-48 horas na estufa a 37°C ou em ante câmara da estufa (24-28°C).

2 — *Identificação*

2a. Verificar a temperatura ótima de crescimento (temperatura ambiente, ante-câmara de estufa e estufa a 37°C).

2b. Estudar os caracteres macromorfológicos da levedura em Sabouraud-glicose, Mosto-líquido e Caldo-Sabouraud. No caso do Caldo-Sabouraud, fazer a leitura após 48 horas de incubação a 37°C. Anotar a formação da película, com ou sem bolhas de gás na superfície do meio, crescimento em profundidade, ausência de crescimento na superfície, etc.

2c. Estudar os caracteres micromorfológicos em água de fécula de batata (24-48 horas, a 37°C), para observar a filamentação ou não da levedura e formação de ascos, em ágar-mel e em Sabouraud-glicose. Praticar cultivos em lâminas, usando o meio de Rivalier. Este processo é de grande vantagem para a identificação das espécies pertencentes ao gênero *Candida*.

2d. Pesquisar os ascosporos, semeando a amostra isolada em cenoura, ágar-mel, água de fécula de batata e bloco de gesso com água corrente ou água manitada a 2% + fosfato de dipotássico a 5%.

2e. Estudar os caracteres bioquímicos da levedura: Estudar a fermentação dos carboidratos (Dextrose, Sacarose, Maltose e

Lactose), tendo o cuidado de empregar soluções a 20% dos referidos açúcares. Usar como indicadores o indicador Andrade ou o azul de bromotimol. Uma vez semeados os tubos, deixar correr pelas paredes do tubo, mescla fundida de parafina e vaselina.

Verificar a ação da levedura sôbre o mosto-gelatinado.

2f. Verificar a utilização de diferentes fontes de C e Az por parte da levedura (auxanograma dos H.C. e Auxanograma do Az). Fazer a leitura após 24-48 horas e 6 dias. Como fontes de H.C., empregar: Dextrose, Rafinose, Maltose, Lactose, Sacarose e Inulina.

Como fontes de Az, empregar: Asparagina, Peptona, Sulfato de amônio, Uréia e Nitrato de potássio. Incubar na ante-câmara da estufa (24-28°C).

2g. Inoculação da amostra em animais sensíveis, principalmente o coelho, por via endovenosa.

II — RESULTADOS OBTIDOS

Foram examinadas 150 gestantes, brancas, pretas e mulatas. Dêsses exames, 37 foram positivos para leveduras (2 *Saccharomyces*, 4 *Candida tropicalis*, 22 *Candida albicans*, 2 *Candida krusei* e 7 *Torulopsis*). A incidência de cogumelos foi portanto, de 24,6%.

Foram examinadas 190 mulheres não grávidas, tendo sido isodas 28 amostras de fungos, bastante diferentes entre sí e bem diversos daqueles encontrados e isolados do conteúdo vaginal das gestantes.

Assim, isolamos 9 amostras de *Candida albicans*, 1 *Rhodotorula*, 3 *Actinomyces*, 7 *Torulopsis*, 2 *Saccharomyces*, 4 *Candida krusei*, 1 *Candida sp.* e 1 levedura esporulada não identificada. Incidência percentual de 14,7. Dêsse modo, verifica-se que nas grávidas a incidência de leveduras foi maior, fato êste que está em concordância com os resultados dos demais autôres.

Em trabalho que publicaremos posteriormente, analisaremos a relação entre os achados micológicos e os principais dados clínicos obtidos.

Êste nosso primeiro trabalho é de casuística e de generalidades sôbre tão interessante assunto. Em outros, ventilaremos a parte clínica e estudaremos os sintomas e os sinais colhidos nas pacientes investigadas.

GESTANTES

<i>Caso</i>	<i>Identificação</i>
1	Saccharomyces
2	Candida tropicalis
8	Candida albicans
12	Candida albicans
13	Candida albicans
14	Candida albicans
27	Candida albicans
32	Candida krusei
34	Candida albicans
37	Candida albicans
45	Candida krusei
46	Candida albicans
49	Candida tropicalis
51	Candida tropicalis
52	Torulopsis
54	Candida tropicalis
56	Candida albicans
57	Candida albicans
71	Candida albicans
72	Candida albicans
75	Candida albicans
77	Candida albicans
80	Candida albicans
85	Saccharomyces
94	Candida albicans
98	Candida albicans
108	Candida albicans
113	Candida albicans
118	Candida albicans
119	Candida albicans
121	Torulopsis
125	Candida albicans
129	Torulopsis
139	Torulopsis
141	Torulopsis
146	Torulopsis
148	Torulopsis

NÃO GESTANTES

<i>Caso</i>	<i>Identificação</i>
1	<i>Candida albicans</i>
9a	<i>Candida albicans</i>
9b	<i>Rhodotorula</i>
22	<i>Candida albicans</i>
36	<i>Actinomyces</i>
39	<i>Torulopsis</i>
40	<i>Saccharomyces</i>
42	<i>Torulopsis</i>
58	<i>Candida albicans</i>
76	<i>Candida krusei</i>
84	<i>Candida krusei</i>
98	<i>Torulopsis</i>
99	<i>Candida krusei</i>
101	<i>Actinomyces</i>
104	<i>Actinomyces</i>
107	<i>Candida krusei</i>
108	<i>Saccharomyces</i>
116	<i>Candida albicans</i>
117	<i>Candida albicans</i>
119	<i>Candida sp.</i>
145	<i>Torulopsis</i>
147	Levedura esporulada não identificada
147	Levedura esporulada não identificada.
161	<i>Candida albicans</i>
172	<i>Torulopsis</i>
177	<i>Torulopsis</i>
180	<i>Candida albicans</i>
181	<i>Torulopsis</i>
186	<i>Candida albicans</i>

CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS
DO
Gênero *CANDIDA* (seg. Martin, Jones, Yao e Lee Jr.)

Candida	Sab. líquido — 48 hs. (37°C)	Agar-sangue (10 dias — 37°C)	Açúcares (37°C — 10 dias)				Microscopia em "corn-meal agar"	Relação de algumas espécies sinônimas
			Dextrose	Sacarose	Maltose	Lactose		
<i>albicans</i>	Ausência de crescimento na superfície do meio.	Colônias típicas, uniformes, redondas, acinzentadas.	Ag	A	Ag	—	Micélio ramificado, com clamidosporos.	<i>C. psilosis</i> , <i>C. triadis</i> , <i>C. ovalis</i> , <i>C. pinoy</i> , <i>C. metalondinensis</i> , <i>C. altoi</i> .
<i>stellatoidea</i>	Ausência de crescimento na superfície do meio.	As colônias aparecem como estrelas no céu (Star in the sky).	Ag	—	Ag	—	Grupos de esporos semelhantes à bolas.	—
<i>paraKrusel</i> (<i>parapsilosis</i>)	Ausência de crescimento na superfície do meio.	Colônias pequenas, redondas, brilhantes, brancas e salientes.	Ag ou A	—	—	—	Micélio formado com dificuldade. Ausência de clamidosporos.	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. brumpti</i> , <i>C. lodderi</i> , <i>C. flaveri</i> , <i>C. chalmersi</i> .
<i>Krusel</i>	Ampla "film" ou camada na superfície do meio.	Colônias pequenas, irregulares, planas ou salientes.	Ag	—	—	—	Micélio típico, em "crossed sticks". Ausência de clamidosporos.	<i>Geotrichoides Krusei</i> , <i>C. Krusei</i> , <i>C. chevalieri</i> .
<i>tropicalis</i>	Estreita camada ou "film", na superfície do meio, com bolhas.	Colônias acinzentadas, com bordas frangeadas.	Ag	Ag	Ag	—	Micélio ramificado, com confídios. Ausência de clamidosporos.	<i>M. candida</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. kefyi</i> , <i>Mycotorula trimorpha</i> , <i>C. intermedia</i> .
<i>pseudotropicalis</i> (<i>mortifera</i>)	Ausência de crescimento.	Pequenas colônias irregulares e não características.	Ag	Ag	—	Ag	Micélio ramificado, sem clamidosporos e que se forma com dificuldade.	<i>C. mortifera</i> .

QUADRO RETIRADO DO TRABALHO DE MACKINNON E ARTAGAVEYTIA (1945)

	Zimograma				Auxanograma dos H. C.							Auxanograma dos compostos Az.					Outras propriedades		
	D	S	L	Mse	D	S	L	M	Gal.	Raf.	Inulina	Urcia	KNO ₃	Sulfato amônico	Asparagina	Peptona	ótimo temp.	G.-virulência coelhos	Utilização álcool e tñico
<i>C. albicans</i>	G	—	—	G	+	+	—	+	+	—		—	—	+	+	+	30-37°	1.º	—
<i>C. stellatordea</i>	G	—	—	G	+	—	—	+	+	—		—	—	+	+	+	30-37°	—	—
<i>C. tropicalis</i>	G	G	—	G	+	+	—	+	+	—		—	—	+	+	+	30-37°	2.º	—
<i>C. intermedia</i>	G	G	—	G	+	+	+	+	+	—		—	—	+	+	+	20-37°	—	+
<i>C. pelliculosa</i>	G	G	—	G	+	+	—	+	+	—		—	—		+	+	30-37°	—	—
<i>C. Krusei</i> *	G	—	—	—	+	—	—	±	±	—		+	—	+	+	+	30-37°	—	+
<i>C. paraKrusei</i>	G	—	—	—	+	+	—	+	+	—		—	—	+	+	+	30-37°	—	—
<i>C. guilliermondi</i>	G	G	—	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	30-37°	—	—
<i>C. chalmersi</i>	G	G	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	30-37°	—	—
<i>C. macedoniensis</i>	G	G	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	30-37°	—	—
<i>C. pseudotropicalis</i>	G	G	G	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	30-37°	—	—
<i>C. brumpti</i>	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—		—	—	+	+	+	20-30°	—	+
<i>C. flaveri</i> †	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+		±	—	+	+	+	20-30°	—	—
<i>C. suaveolens</i>	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—		+	—	+	+	+	30-37°	—	+
<i>C. deformans</i> ‡	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—		+	—	+	+	+		—	+
<i>C. ceylanoides</i> ‡	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—		—	—	—	—	+		—	—

* O auxanograma dos açúcares foi estudado no meio de Laurent.

† O auxanograma da uréia é + ou —, dependendo do extrato de levedura juntado ao meio.

‡ Estas amostras não foram estudadas por Mackinnon e Artaganeytia. Os dados são obtidos de Langeron e Guerra.

C. — BIBLIOGRAFIA

- ARCE, FRANCISCO RUIZ — 1940 — Moniliasis vulvovaginal. *An. Brasil Gin.* 9: 483.
- BLAND, P. B., RAKOFF, A. E. and PINCUS, I. J. — 1937 — Experimental vaginal and cutaneous moniliasis. *Arch. Dermat. and Syphil.* 36: 760.
- CARTER, B. and JONES, C. P. — 1937 — A study of the vaginal flora in the normal female. *Southern Med. Journ.*, 30: 294.
- CARTER, B., JONES, CLAUDIUS P. and THOMAS, WALTER L. — 1940 — Vulvovaginal mycoses in pregnancy, with the relation of symptoms to genera and species of fungi. *Amer. Jour. Obst. Gynec.*, 39: 213.
- CASTELLANI, A. and TAYLOR, F. E. — 1925 — Vaginal monilias and vaginal moniliasis. *Journ. Obst. Gynec. Brit. Empire*, 32: 69.
- HESELTINE, H. C. — 1933 — Diabetic or mycotic vulvovaginitis. *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 100: 177.
- JONES, CLAUDIUS P. and MARTIN, DONALD S. — 1938 — Identification of yeastlike organisms isolated from the vaginal tracts of pregnant and nonpregnant women. *Amer. Jour. Obst. Gynec.*, 35: 98. ,
- LEWIS, G. and HOPPER, M. E. — 1943 — An introduction to medical mycology. Second Edition. The Year Book Publishers, Inc. Chicago.
- LODDER, J. — 1934 — Die Anaskosporogenen Hefen. Amsterdam.
- MACKINNON, JUAN E. y ARTAGAVEYTIA, ALLENDE, RICARDO G. — 1945 — The so-called genus *Candida* Berkhout, 1923. *Journ. Bact.*, 49: 317.
- MARTIN, D. S., JONES, C. P., YAO, K. F. and LEE JR., L. E. — 1937 — A practical classification of the Monilias. *Jour. Bact.* 34: 99.
- MARTIN, D. S. and JONES, C. P. — 1940 — Further studies on the practical classification of the Monilias. *Jour. Bact.*, 39: 609.
- NEGRONI, P. — 1935 — Flora micologica vaginal de mujeres no embarazadas. *Folia Biologica.* 52, 53, 54, 55: 238.
- NINÓ, FLAVIO L. — 1938 — Contribución al estudio de las blastomicosis en la Republica Argentina. *Bol. Inst. Clin. Quirúrgica*, Julio.
- OBERST, F. W. and PLASS, E. D. — 1936 — The hydrogen ion concentration of human vaginal discharge. *Amer. Jour. Obst. Gynec.*, 32: 22.
- PLASS, E. D., HESSELTINE, H. C. and BORTS, I. A. — 1931 — Monilia vulvovaginitis. *Amer. Journ. Obst. Gynec.*, 21: 320.
- POPOFF, W. W., FORD, FRANCIS and CADMUS, W. H. — 1929 — Mycotic vulvovaginitis. *Amer. Journ. Obst. Gynec.*, 18: 315.
- STELLING DEKKER, N. M. — 1931 — Die Sporogenen Hefen. Amsterdam.
- WEIHSTEIN, LOUIS et al. — 1936 — A survey of the vaginal flora at various stages, with special reference to the Döderlein bacillus. *Amer. Jour. Obst. Gynec.*, 32: 211.
- WOODRUFF, P. W. and HESSELTINE, H. C. — 1938 — Relationship of oral thrush to vaginal mycosis and the incidence of each. *Amer. Jour. Obst. Gynec.*, 36: 467.

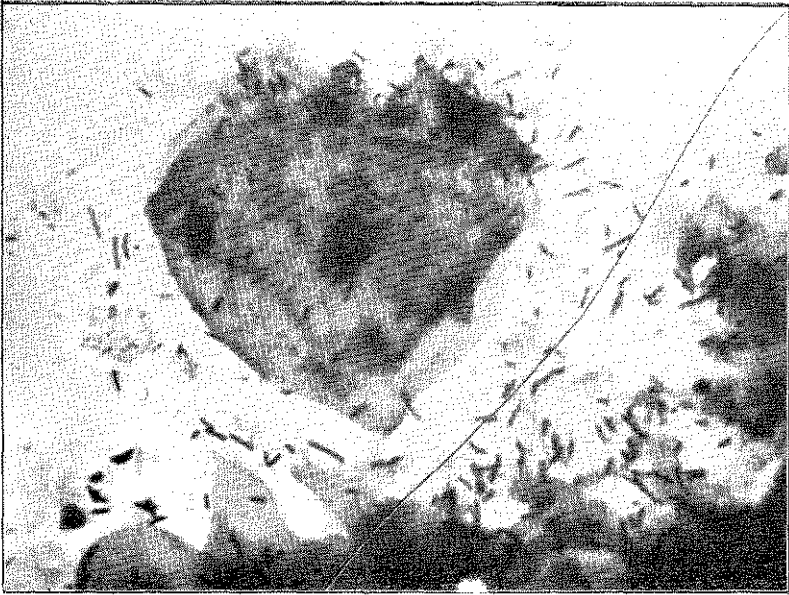


FIG. N.º 1 — Esfregaço vaginal. Grande número de bacilos de Döderlein.

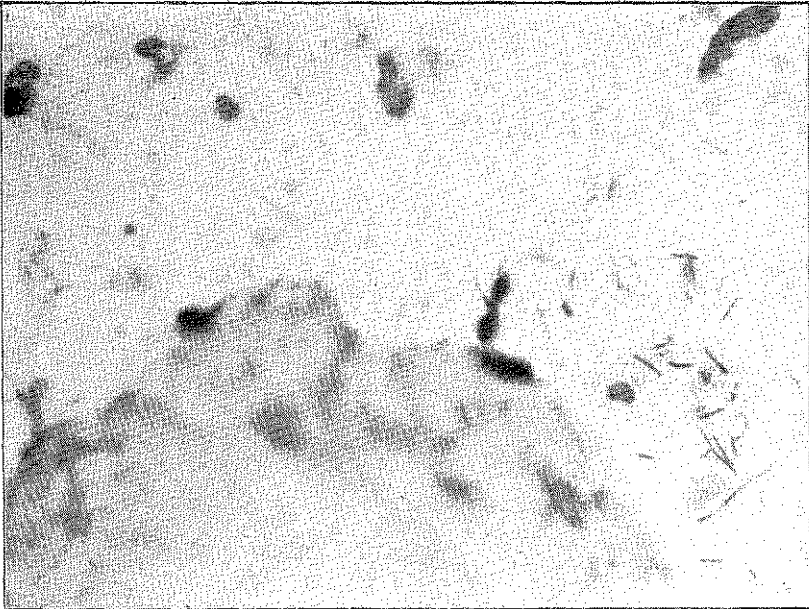


FIG. N.º 2 — Esfregaço vaginal. Leveduras (formas gemulantes) e bacilos de Döderlein.

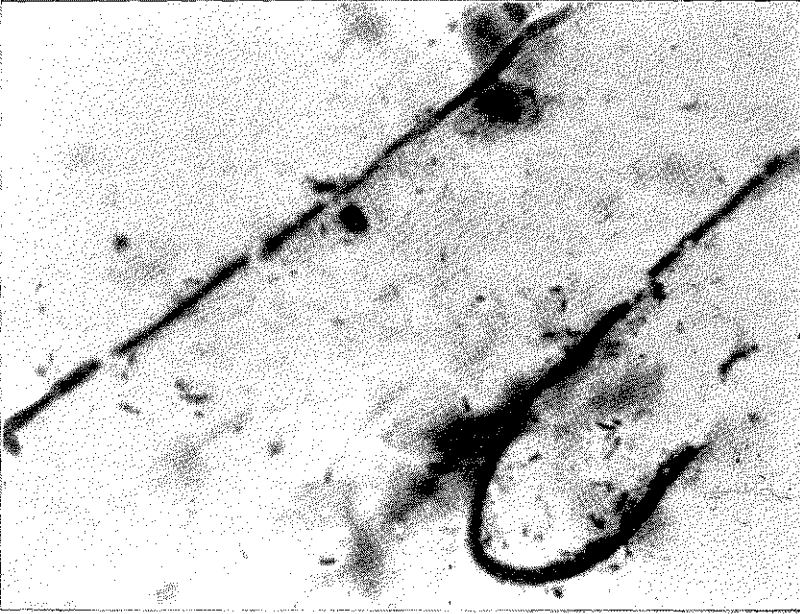


FIG. N.º 3 — Formas filamentosas de leveduras. Esfregação vaginal.

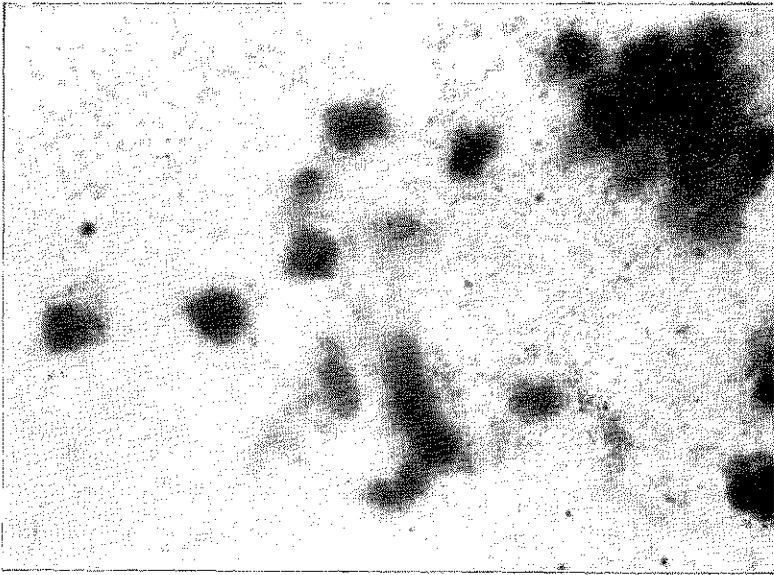


FIG. N.º 4 — Esfregago vaginal. Flora bacteriana mixta, predominantemente Gram-negativa.

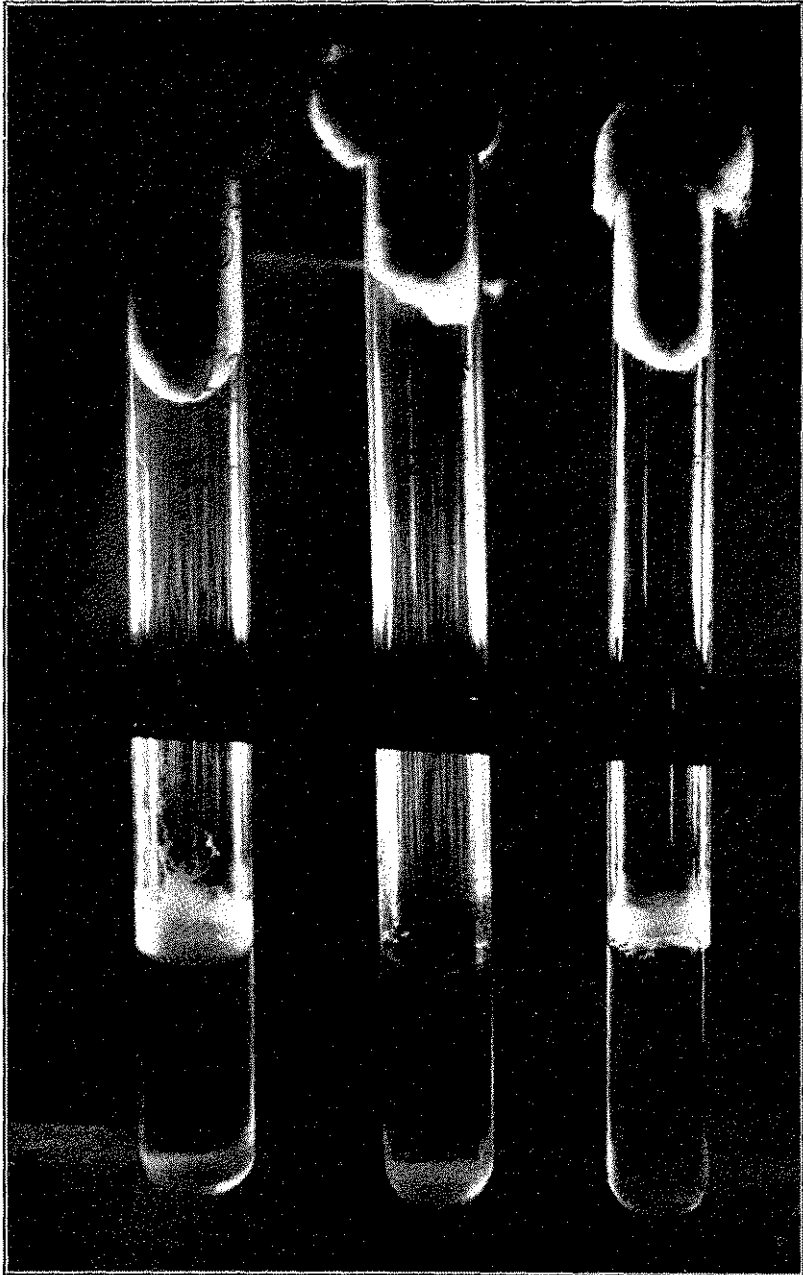


FIG. N.º 5 — Crescimento em Sabouraud-líquido, de algumas leveduras isoladas de vagina. Notar o crescimento superficial, em película, a ausência de desenvolvimento na superfície e o crescimento em manguito periférico, com numerosas bolhas de gás.

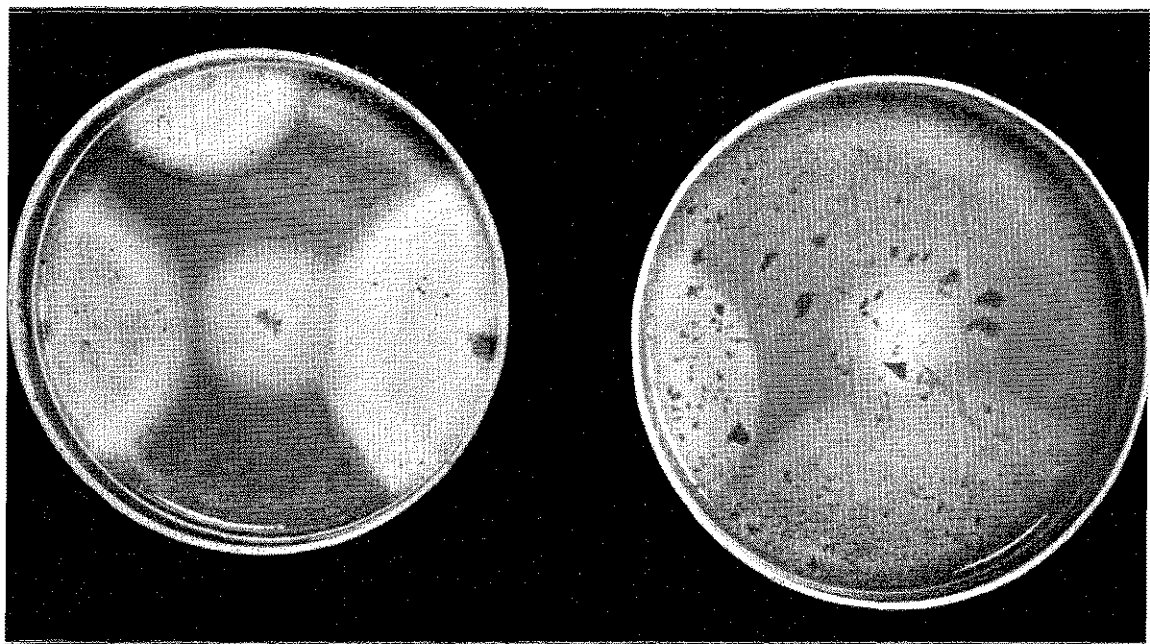


FIG. N.º 6 — Aspecto de auxanogramas em fontes azotadas. Notar o crescimento característico, em tórno da fonte nitrogenada.

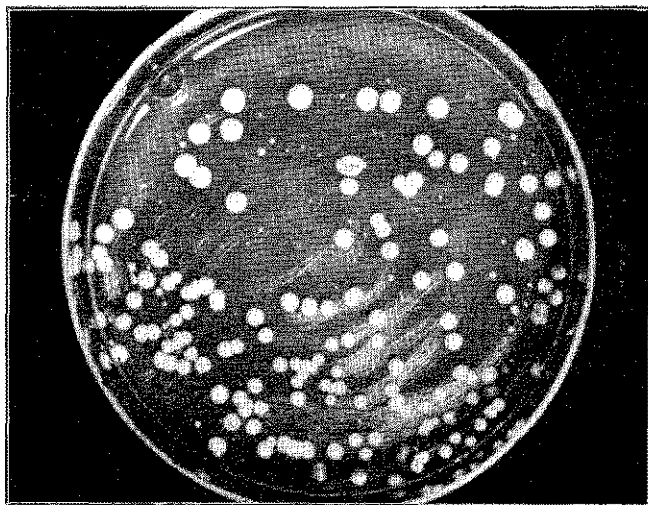


FIG. N.º 7 — Numerosas colónias de leveduras isoladas da vagina. Meio de Sabouraud-glicose.

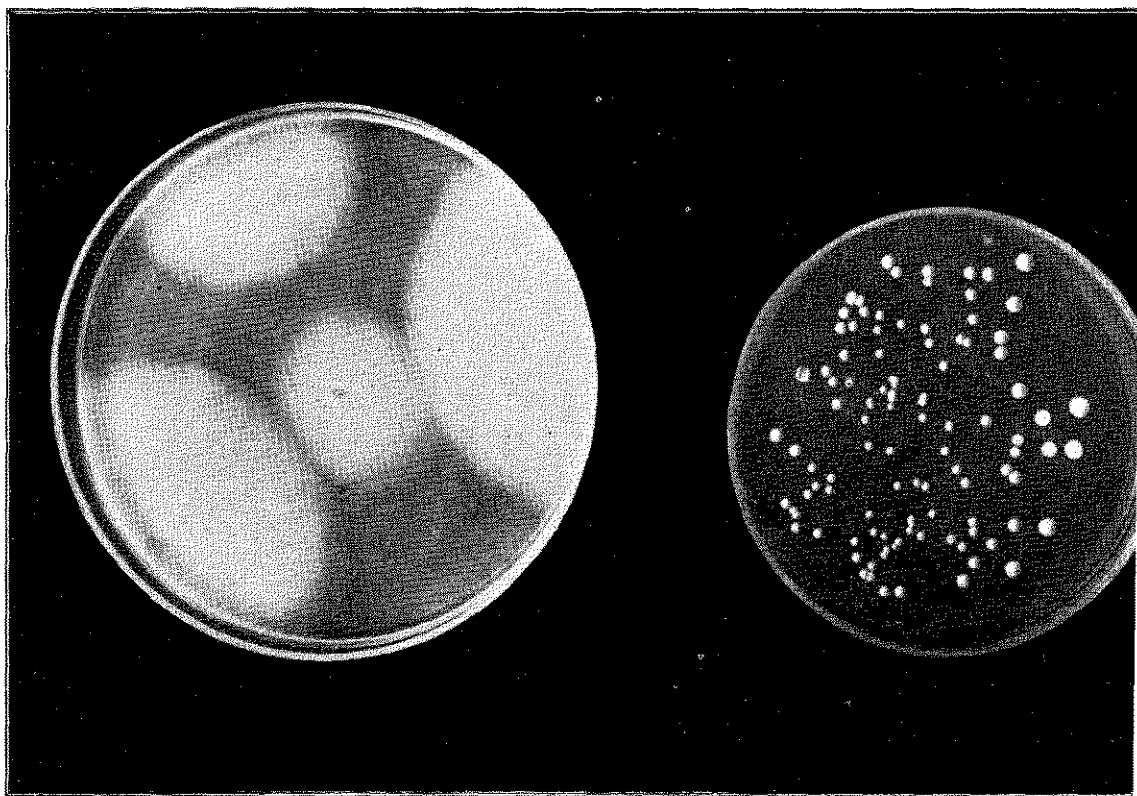


FIG. N.º 8 — Aspecto de um auxanograma e cultivo de material da vagina em placa de Sabouraud-glicose.

INVESTIGAÇÕES SÔBRE ALTERAÇÕES DA ESTRUTURA VEGETAL PELA AÇÃO DO CALOR

J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR,

Químico do Instituto Adolfo Lutz.

A razão de ser destas notas nasceu de curiosas observações surgidas no decorrer dos trabalhos de rotina da Subsecção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

Conquanto tais observações não apresentem motivo de interesse coletivo, não deixam de ser uma curiosidade científica, aliás muito pouco divulgada.

Quem quer que inicie estudos sôbre microscopia de alimentos, encontra logo aos primeiros passos, inúmeros obstáculos, no campo da Botânica, ainda mesmo que o candidato em questão possuía conhecimentos gerais da matéria ou traga bagagem literária especializada no assunto.

A dificuldade existente não é apresentada nem pela Sistemática, com a sua diversidade de formas, espécies, gêneros, famílias, ordens e classes, nem pela Fisiologia, com as mais intrincadas leis que regem a vida vegetal, mas pela Morfologia, disciplina que trata da organização externa e da histologia da planta.

Diz Felix Rawitscher: "O estudo da Botânica só poderá ser útil se for acompanhado de observações e demonstrações feitas no objeto vivo."

Se os estudos que todos nós fizemos desta ciência não preencheram *in totum* esta justa asserção, foram pelo menos bem orientados por ilustrações clássicas, representando cortes procedentes de plantas vivas.

No entretanto, êstes cortes deixam de apresentar os seus característicos histológicos típicos, quando o vegetal vem de sofrer a ação do calor, em qualquer de suas modalidades: cozimento, decocção, fritura, assamento e outras.

Estas modificações que, em Bromatologia, são de um valor inestimável na identificação microscópica dos alimentos, não são citadas pelas autoridades na matéria, faltando quaisquer referências nos compêndios que comumente se costuma consultar.

Tendo em mente estas circunstâncias, resolvemos trazer, com a presente nota, alguma contribuição ao assunto. Falaremos de passagem, para maior clareza, sobre cortes anatômicos, exames de superfície e de lupa, para depois tratarmos das alterações morfológicas dos tecidos.

Cortes histológicos. — São porções do material a examinar que, devido a sua espessura muito delgada, permitem, por transparência, o exame microscópico de sua estrutura.

São conseguidos por meio de aparelhos especiais denominados micrótomos. Nestes aparelhos os cortes são obtidos em série, saem uniformes e podem apresentar a espessura que se desejar. Essa espessura é determinada em milésimos de milímetro (micra) e representada pela letra grega μ .

Conforme a natureza do material, os cortes são obtidos por congelção, parafina ou à mão, podendo ser ainda, em certos casos, corados pela hematoxilina, safranina, eosina, etc.

O material deve ser previamente fixado em líquidos especiais. Quando se trata de peças de origem animal, os fixadores são os usados em anatomopatologia: líquido de Zenker, de Helly, formol a 10%, seguindo-se os métodos usuais, escala de desidratação, etc. Para os vegetais, usa-se o fixador para vegetais, cuja composição é a seguinte:

FIXADOR PARA VEGETAIS

Ácido acético	35 cc.
Álcool absoluto	25 cc.
Solução saturada de sublimado corrosivo ...	25 cc.

Nem sempre se torna necessário o uso de cortes nos exames microscópicos de alimentos. Usámo-lo sempre que deparamos com caso suspeito de fraude em que a identificação se torna difícil pelo simples exame de superfície.

Exame de superfície. — É o que se procede quando o material apresenta condições propícias para ser observado microscòpicamente por incidência direta. A maior parte dos exames se faz por este processo, que além de prático é eficiente.

Cada caso, porém, requer um tratamento especial.

Casos há em que se torna necessário lavar o material repetidas vezes, com água, para desembaraçá-lo de certas substâncias, como o açúcar, o sal, etc., que prejudicam a sua observação. Outras vezes é

preciso tratá-lo previamente com álcool, éter, acetona, clorofórmio e solventes especiais; submetê-lo à ação descolorante do hipoclorito de sódio, do cloral, do cloro nascente, da potassa, da soda, ou ainda do bálsamo do Canadá e da glicerina, como diafanizantes, e dos óleos, para casos particulares. Na investigação microscópica das substâncias ricas em reserva amilífera, usa-se o lugol, cuja fórmula é a seguinte:

LUGOL

(Solução de iôdo iodetada)

Iôdo metalóidico	1,0
Iodeto de potássio	2,0
Água destilada	200 cc.

Quando o material a examinar é cozido e apresenta fragmentos muito pequenos e moles que dificultam a obtenção de cortes, colhem-se alguns, passam-se para uma lâmina, onde são esmagados ou amassados com o auxílio de um bisturi. Em seguida junta-se uma gôta de água, cobre-se com uma lamínula, sôbre a qual se faz pequena pressão afim de distender o material em camada bem tênue para ser examinado por transparência.

Conseguem-se ótimas preparações raspando-se a superfície da substância a examinar e procedendo como ficou dito acima quando o material é duro e não se deseja fazer cortes.

Exame de lupa. — Denomina-se lupa tôda lente ou combinação de lentes com a qual se vê um objeto mediante uma imagem virtual, direta e ampliada.

A lupa montada, que é um microscópio simples, para fracos aumentos, presta inestimáveis serviços ao analista. Com tal aparelho é possível distinguir sem dificuldade, tôda e qualquer substância, quer a sêco, quer dissociada em um líquido apropriado.

O microscópio-lupa-binocular moderno, apresenta os aperfeiçoamentos e requisitos necessários para ser considerado um aparelho de reconhecido valor e indispensável em um laboratório de análises microscópicas. A observação pode ser feita à luz refletida ou por transparência, desde que se empregue um dispositivo adicional.

Com o seu auxílio podemos selecionar tôdas as partes que nos interessam numa determinada mistura alimentícia. Tratando-se de uma fraude, torna-se mais fácil a identificação dos elementos estranhos, pescando-os por intermédio de um estilete ou de uma agulha de platina. O lugol facilita grandemente a pesquisa, quando os ele-

mentos suspeitos procedem de substâncias ricas em amido, como a banana, a abóbora, o chuchú, a pera, o marmelo, a batata, etc.

Suponhamos uma goiabada — caso muitíssimo vulgar — adulterada com banana. Para a identificação procede-se da seguinte forma: em um copo graduado de 250 cc. juntam-se 10 g do produto que, com um pouco d'água, é amassado e transformado em pasta com o auxílio de uma espátula, e em seguida lavado várias vezes com água afim de ser desembaraçado do açúcar que mascara a reação, principalmente quando a quantidade de amido é pequena; passa-se o sedimento para uma ou várias placas de Petri com um pouco d'água, juntam-se algumas gotas de lugol, agita-se e leva-se à lupa. Colhem-se os elementos suspeitos, corados em azul violáceo e que se apresentam sob a forma de células avulsas, blocos de células amilíferas e dutos típicos com células de tanino, todos pertencentes à banana. Os demais elementos que, ao em vez de se corarem em azul, tomam a coloração amarelo-parda, são da goiaba.

Quando se examina um produto alimentício, entre as várias operações preliminares, devemos nos certificar se êle é:

- 1.º — constituído por massa, pó ou pasta;
- 2.º — homogêneo ou não;
- 3.º — simples ou composto;
- 4.º — líquido denso ou fluido;
- 5.º — constituído por fragmentos ou pequenos pedaços.

Com auxílio da lupa, colhem-se os fragmentos e demais elementos, suspeitos ou não, que interessam ao exame, fazendo-se cortes, se necessário, aplicando-se os métodos e as técnicas recomendadas para cada caso. Tratando-se de substância líquida, deve ser centrifugada e, previamente dissolvida na proporção de 1 parte para 2 de água destilada estéril se for muito densa (xarope, mel, etc.). Com o sedimento são preparadas lâminas que serão examinadas ao microscópio com pequeno e grande aumentos (100x e 400x).

Alterações morfológicas dos tecidos. — O calor é um agente-modificador por excelência. Presta reais serviços em todos os setores da atividade humana, desde a leve temperatura das estufas de laboratório até à dos grandes fornos das indústrias. O tecido vegetal, delicado na sua contextura, formado de células de composição complexa, é tanto mais sensível à ação do calor, quanto mais elevada for a temperatura e maior o tempo de duração do aquecimento.

As substâncias alimentícias, tais como doces em massa, conservas, condimentos, biscoitos, geléias, etc., sendo submetidas ao aquecimento durante sua elaboração, apresentam-se ao microscópio completamente modificadas.

Verifica-se primeiramente a desagregação das células e depois a alteração do seu conteúdo, aumento de volume e mudança de cor.

Admite-se que a região mediana ou lâmina média que se interpõe entre as paredes de duas células contíguas, seja constituída de pectato de cálcio, formando uma espécie de cimento inter-celular. Pelo aquecimento essa substância pectica se dissolve e a desagregação das células se processa.

O conteúdo celular, quando constituído quase que exclusivamente de amido, é transformado em goma e a célula apresenta então um volume muito maior que o primitivo.

Devido aos inúmeros derivados do protoplasma, a célula vegetal, após aquecimento, demonstra uma leve mudança de cor e o aparecimento de granulações, massas e filamentos, geralmente amarelados que se tornam mais intensos, passando para uma tonalidade parda quando sob a ação do lugol.

Estes compostos de origem orgânica são os seguintes: *eritrodextrina*, *glicogênio*, *pectinas*, *mucilagens*, *lipídios*, *cerídeos*, *tanóides*, *essências*, *resinas*, *glicósides azotadas*, *proteínas*, *diástases*, *quitino* e ainda os pigmentos naturais e o latex de composição variadíssima.

Dentre as inúmeras alterações que o calor pode provocar nos vegetais, citaremos as que se passam com os grãos de amido e com as substâncias ricas em reserva amilífera como a batatinha, a batata doce, a mandioca, a banana, o chuchú e o feijão, nas quais o aspecto morfológico se transforma sensivelmente.

Apresentaremos microfotos do amido e ilustrações de cada uma das espécies citadas, mostrando os seus parênquimas antes e depois de sofrerem a ação do calor.

Amido. — É a substância nutritiva de reserva mais comum e espalhada entre os vegetais. É encontrada em quase tôdas as partes da planta: raízes, tubérculos, bulbos, caules, frutos e sementes.

Dá-se o nome de *amido* à matéria amilácea extraída dos cereais e o de *fécula* à que é encontrada nos órgãos subterrâneos.

Apresenta-se sob a forma de pequenos grãos com dimensões e conformação variáveis. Podem ser ovais, riniformes, piriformes, polédricos, elípticos, esféricos, truncados e possuir tamanhos que vão de 0,002 a 0,180 μ .

São constituídos por estrias mais ou menos acentuadas, formando camadas concêntricas ou excêntricas ao redor de um hilo que pode ser pontuado, estrelado, linear, etc.

Quando sêco, tem por fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Densidade média 1,5.

Não é solúvel no álcool, no éter, nem sensivelmente na água. Entretanto o licor proveniente da filtração de uma mistura de amido e água fria, toma a cor azul em presença do iodo.

Em água fervente o amido aumenta de volume, hidrata-se, podendo chegar a ter 30 vezes o seu tamanho primitivo, formando finalmente a goma que é uma substância semi-sólida, translúcida e de aspecto gelatinoso. Cora em azul pelo lugol. Esta cor característica desaparece na temperatura de 90°C, reaparecendo pelo resfriamento.

Segundo Maquenne e Roux a fécula é constituída de 80% de amilocelulose e 20% de amilopectina. A primeira é momentaneamente solúvel em água morna (40°C), mas separa-se sob a forma de pequenos grãos insolúveis, algum tempo depois. A segunda — amilopectina — matéria de natureza pectiforme, é que dá à goma o aspecto de geléia.

Aquecido a 200° o amido transforma-se em dextrina.

Os álcalis transformam-no em goma.

Sob a ação do ácido sulfúrico diluído passa primeiramente a dextrina e depois à glicose.

É digerido pelos fermentos.

A amilase o transforma em açúcar.

De todos os componentes do vegetal, o amido parece ser o que sente mais de perto a ação modificadora do calor, motivo por que os tecidos ricos desta reserva nutritiva sólida são os que apresentam maiores alterações morfológicas e estruturais.

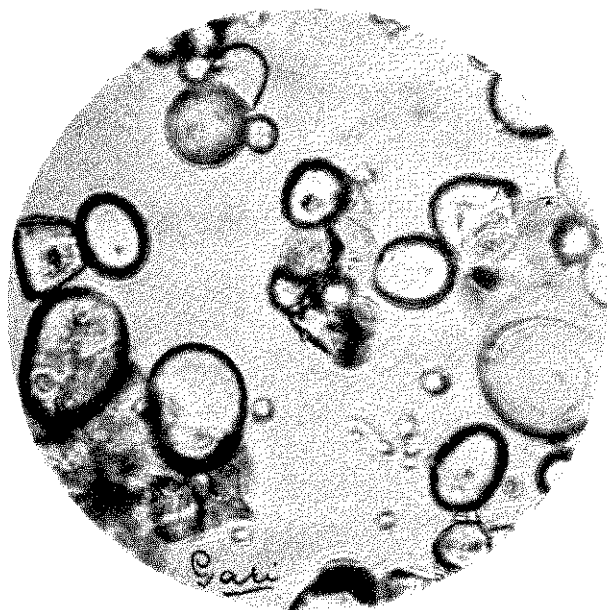
A microfoto n.º 1 nos mostra diversos grãos de amido e de fécula (batata, milho, feijão, trigo e mandioca) numa preparação à fresco e com o aumento de 400 vezes.

Na microfoto n.º 2 vemos os mesmos elementos, logo após sofrerem a ação de ligeiro aquecimento. Notamos que todos êles estão deformados, grandemente aumentados, apresentando-se alguns já partidos pelo excesso de volume.

Neste estado o amido não pode ser identificado ao microscópio.



Microfoto n.º 2



Microfoto n.º 1

BATATINHA — *Batata inglesa* — (*Solanum tuberosum*) (Fig. I)

O parênquima consiste de células arredondadas, grandes, isodiamétricas, com pequenos espaços intercelulares nos ângulos e ricas em amido.

As células da região medular não se apresentam em alas radiais.

O amido tem formas as mais diversas, sendo mais comum a ovóide, a piriforme e a elíptica. O hilo planta-se sempre na extremidade redonda e mais estreita do grão, é punctiforme e bem visível. Em redor dele estão em série, as camadas excêntricas das estrias, alternativamente claras e escuras.

Quando aquecidas (Fig. II), as células tornam-se mais volumosas e apresentam uma reticulação de malhas irregulares, pouco pronunciadas, semelhante à de vidro fantasia (vidro ártico) de armários e vitrais, devido ao entumescimento dos grãos de amido. Com o aumento de 100 x estas malhas são mais nítidas.

Notam-se filamentos estrangulados e granulações de cor amarela, procedentes de substâncias albuminóides contidas na célula e precipitadas pela ação do calor.

BATATA DOCE — (*Ipomoea batatas*) (Fig. III)

As células de que se compõem os tecidos são muito semelhantes às da batatinha, são menores, havendo muitas retangulares e apresentam espaços intercelulares. As células de latex contêm uma substância de natureza resinosa que se torna amarela pelo lugol.

Os grãos de amido são muito irregulares e de tamanho muito variado (de 2 a 30 μ), são esféricos, poliédricos, ovóides, truncados e em forma de dedal. O hilo é punctiforme ou estrelado e as estrias são pouco numerosas.

Pelo aquecimento (Fig. IV) as células sofrem as mesmas alterações que as da batatinha. Quando dissociadas aparecem quase sempre agrupadas em dois, três ou mais elementos e apresentam as granulações e filamentos amarelos, bem como a reticulação típica semelhante à dos vitrais, verificados nas células amilíferas da batata inglesa. Apresentam grande analogia com as células da banana (variedade *Musa paradisíaca*), como veremos.

MANDIOCA — (*Manihot utilissima*) (Fig. V)

As células do parênquima, ricas em amido, são isodiamétricas, notando-se maior número das alongadas, mais ou menos quadrilaterais.

O amido tem várias formas e tamanhos. Os menores são esféricos, medem 8μ de diâmetro; os mais comuns medem 20μ , têm forma de dedal, de capacete ou de esfera truncada por uma ou mais facetas poliédricas e apresentam hilo punctiforme ou estrelado. São mais ou menos semelhantes aos da batata doce e estão por vèzes agrupados em número de dois, três ou quatro elementos. Submetidos à ação do calor (Fig. IV), as células se tornam maiores, de contornos lisos, brancas, opacas, com aspecto característico que as torna facilmente identificáveis. Nas células assim alteradas raramente se encontram granulações amarelas, devido talvez à quantidade relativamente pequena de latex existente na raiz.

BANANA — (*Musa* sp.) (Fig. VII)

O parênquima do mesocarpo é constituído por células de paredes finas, mais ou menos arredondadas, enquanto as do endocarpo apresentam células poligonais ou alongadas. Estas células podem estar cheias de grãos de amido ou se apresentarem quase ou completamente vazias, denotando o grau de amadurecimento do fruto. O amido é maior no endocarpo onde atinge 85μ de comprimento e vai diminuindo de tamanho à proporção que alcança o mesocarpo externo.

O amido tem a forma de pera, de salsicha, de bastonetes cilíndricos, ovóide, elítico e apresenta estrias concêntricas numerosas e bem visíveis. O hilo está sempre situado numa das extremidades do grão e é punctiforme.

Quanto mais verde for o fruto, tanto mais ricas em amido são as células. Estas, depois de aquecidas (Fig. VIII), nos mostram modificações interessantes, observáveis com maior facilidade quando sob a ação do lugol.

As células provenientes da variedade "Musa Cavendish" (banana nanica), são mais alongadas e de paredes mais finas que as da variedade "M. paradisiaca" (banana da terra), que são arredondadas e de paredes grossas. O aspecto morfológico dessas últimas, muito se aproxima do da batata-doce, característica facilmente reconhecível devido às células da batata doce serem quadrilaterais e de membrana envoltória mais delicada que a da banana. A presença dos vasos, que são diferentes, estabelece rapidamente a identidade de cada uma destas células, no caso de haver alguma dúvida.



FIG. I
BATATINHA — crúa — (400 X)
Parênquima amilífero — Córte transversal



FIG. II
BATATINHA — cozida — (400 X)
Células amilíferas alternadas pelo calor

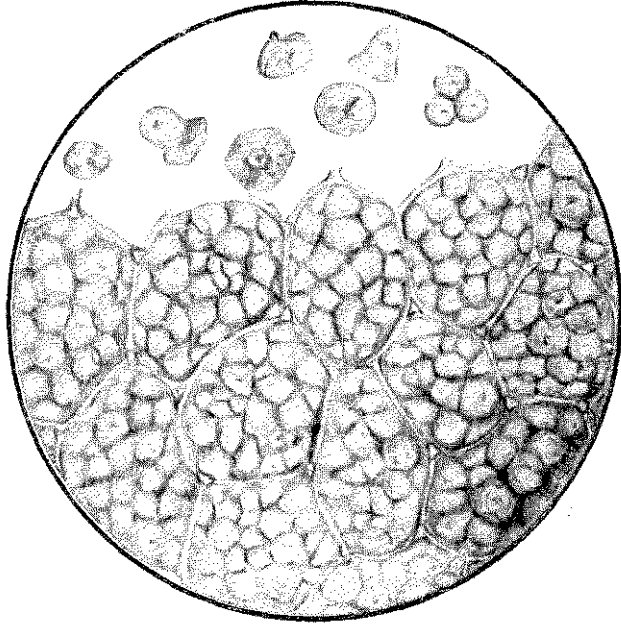


FIG. III
BATATA DOCE — crua — (400 X)
Parênquima amilífero — Corte transversal



FIG. IV
BATATA DOCE — cozida — (400 X)
Células amilíferas alternadas pelo calor

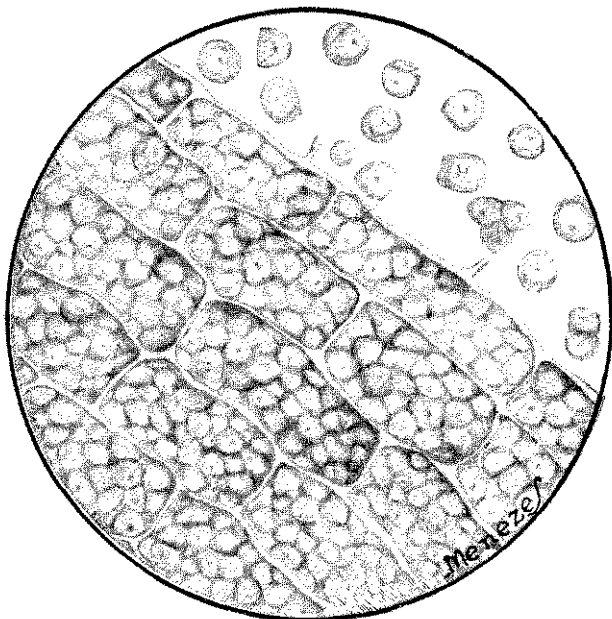


FIG. V
MANDIÓCA — crúa — (400 X)
Parênquima amilífero — Córte transversal

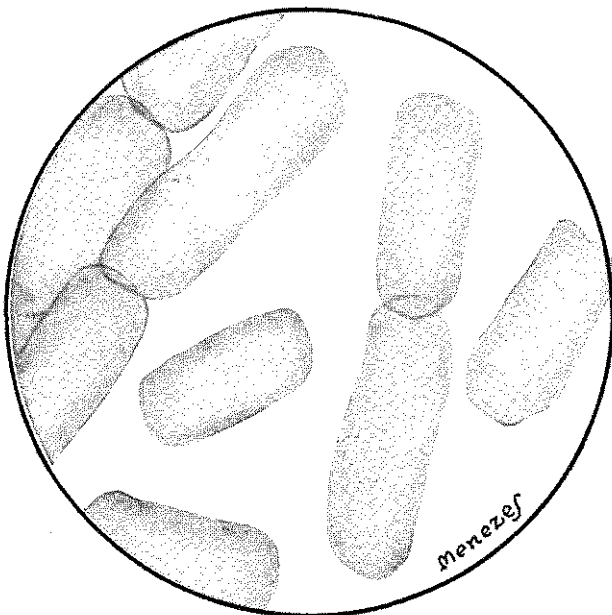


FIG. VI
MANDIÓCA — cozida — (400 X)
Células amilíferas alternadas pelo calor

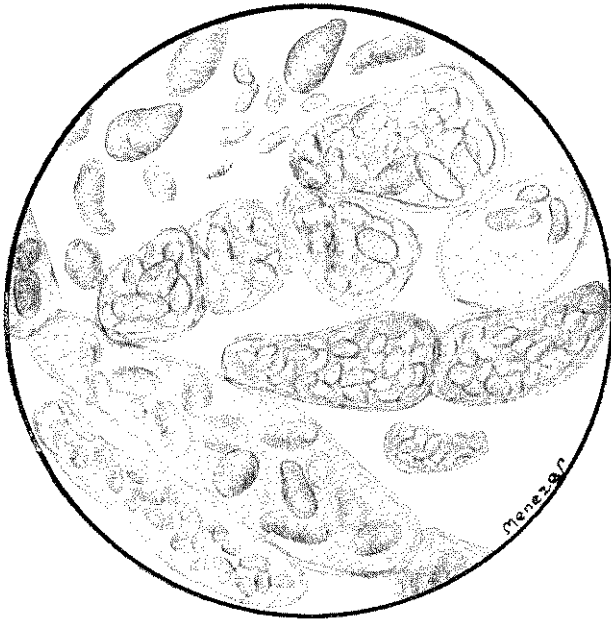


FIG. VII
BANANA crua — (400 X)
Células amilíferas diversas

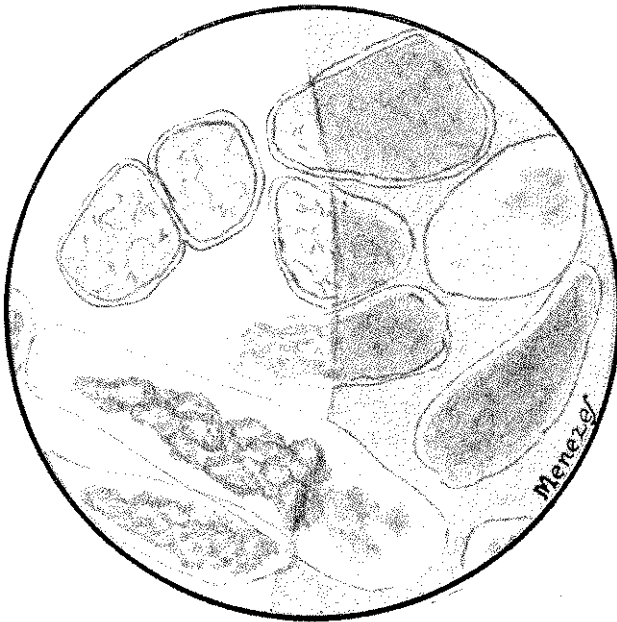


FIG. VIII
BANANA — cozida — (400 X)
Células amilíferas, alteradas e sob a ação do iodo

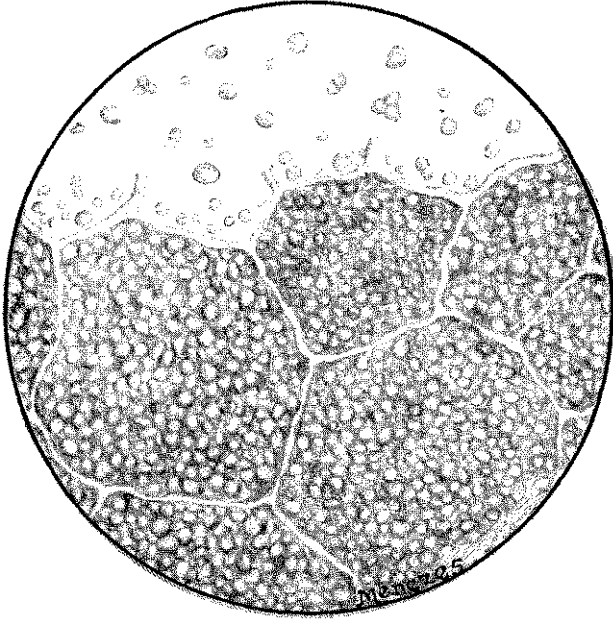


FIG. IX
CHU-CHÚ — crú — (400 X)
Parênquima amilífero — Córte transversal

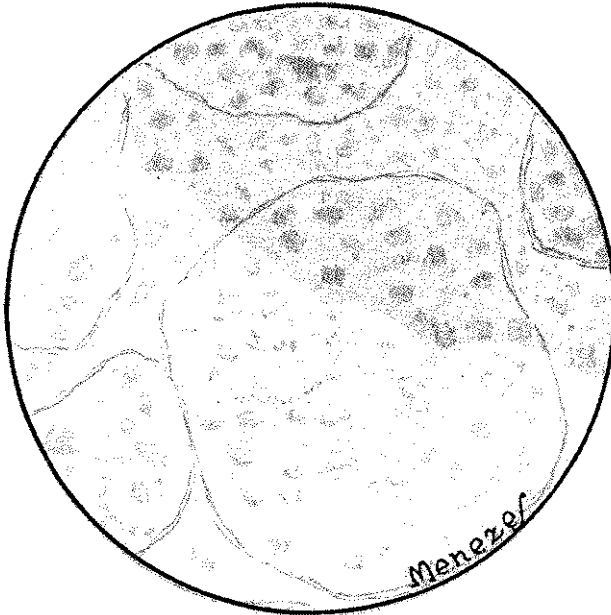


FIG. X
CHU-CHÚ — cosido — (400 X)
Células amilíferas, alteradas e sob a ação do iodo

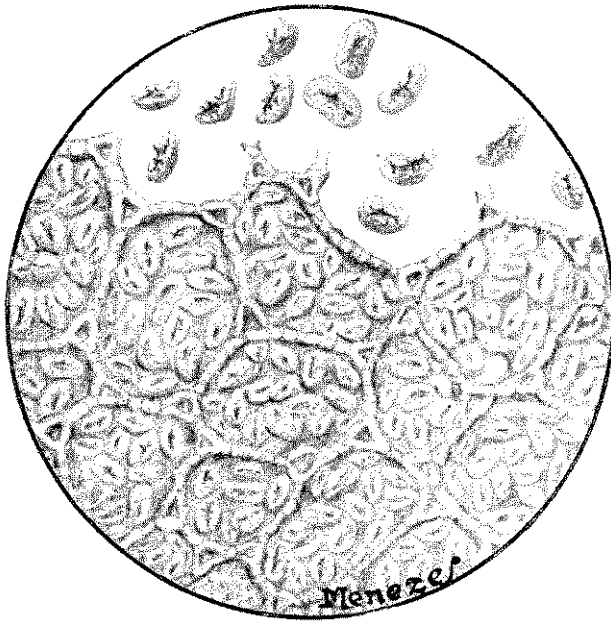


FIG. XI
FEIJÃO — crú — (400 X)
Parênquima amilífero — Corte transversal

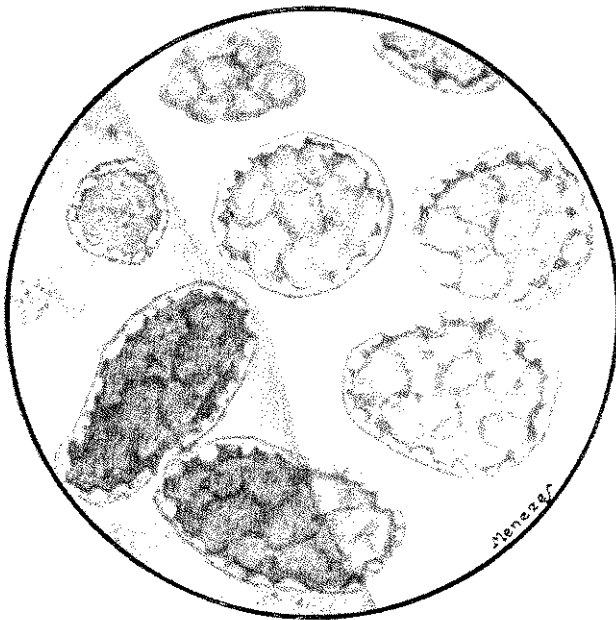


FIG. XII
FEIJÃO — cozido — (400 X)
Células amilíferas, alteradas e sob a ação do iodo

CHUCHU — (*Sechium edule*) (Fig. IX).

As células do mesocarpo são arredondadas e de paredes finas, repletas de grãos de amido pequenos, redondos, ovais ou truncados. O parênquima amilífero do endocarpo é constituído por células menores que as precedentes.

Aquecidas (Fig. X), as células tornam-se maiores e os grãos de amido abrem-se tomando a forma de pequenas esponjas, que são encontradas também espalhadas no campo microscópico e provenientes de células partidas.

FEIJÃO — (*Phaseolus vulgaris*) (Fig. XI).

Os cotilédones são constituídos de células isodiamétricas, de paredes grossas e porosas. As da epiderme são pequenas e não porosas. Os grãos de amido são elíticos, ovais, riniformes, triangulares, irregularmente cilíndricos e mostram uma estrição bem perceptível. O hilo, sempre presente, é linear, ocupa quase que o comprimento do grão e dele partem pequenos raios.

Pelo aquecimento (Fig. XII), as células do parênquima se desprendem, aumentam de volume, tomam coloração amarelada e adquirem aspecto de ovo de parasito. A membrana celular apresenta contornos mais vivos e os espaços constituídos pelos poros formam verdadeiros canaliculos, tornando as células semelhantes à esclérulas, nas quais os espaços vazios foram preenchidos pelos grãos de amido e substância protéica (faseolina), alterados pelo calor. É, de tôdas as alterações, a mais interessante e original.

Tratando-se de um estudo comparativo, adotamos um só aumento para todos os desenhos apresentados neste trabalho. Preferimos o forte aumento de 400 vêzes, por tornar mais minuciosos os detalhes estruturais das substâncias estudadas.

As plantas escolhidas para estas demonstrações são tôdas elas, ricas em reserva amilífera.

Procuramos citar os pontos mais interessantes do parênquima de cada uma delas e ilustrar, com a clareza que nos foi possível, os característicos essenciais que acabamos de expor.

Não nos referimos aos demais elementos histológicos de cada um dos vegetais citados, tais como vasos condutores de seiva, de latex, feixes fibro-vasculares, células pétreas, de óleo resina, fibras, etc., porque somente alguns deles apresentam ligeiras modificações pela ação do calor, conservando, os restantes, seus caracteres anteriores.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — DECOURT, Paulo — *Botânica Geral*, 2.^a ed.
- 2 — HAGER-MEZ — 1922 — *El microscopio y sus aplicaciones*.
- 3 — MACÉ, E. — 1891 — *Les substances alimentaires*.
- 4 — RAWITSCHER, Felix — *Elementos de Botânica*.
- 5 — WINTON — 1932 — *The structure and composition of foods*.
- 6 — GAUTIER, Armand — 1906 — *Química Orgânica*, 280.
- 7 — TROOST — *Química Orgânica*, 350.
- 8 — PIZON, A. — 1915 — *Precis d'Histoire Naturelle*, 4.^a ed.
- 9 — BONNIER, Gaston — 1893 — *Anatomie & Physiologie Vegetables*, 221.

NOTAS SÔBRE O CULTIVO DO MENINGOCOCO

I — Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono. (*)

JOSÉ CARLOS RIBAS

Biologista do Departamento de Produção Animal.

MANOEL DE BRITTO E SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

HISTÓRICO

Depois que Bang e Stribolt² em 1897, descreveram o agente causal do abôrto epizoótico da vaca e verificaram que o mesmo germinava melhor em uma atmosfera parcialmente isenta de oxigênio, tal particularidade tem sido objeto de estudo por parte de inúmeros pesquisadores.

Para os germes que necessitam de relativa anaerobiose foi criado por Chudjkow¹¹ em 1896 a denominação de “microaerófilo”.

A técnica original de Bang, consistia na semeadura do material suspeito em ágar-sôro-gelatina. O desenvolvimento das colônias começava de uma certa distância da superfície do meio para o fundo do tubo, enquanto que na superfície do mesmo, o crescimento era mínimo ou nulo. A técnica de Bang como era de esperar-se, nem sempre fornecia bons resultados devido às constantes contaminações, por germes estranhos.

Em 1908, Nowak¹⁹ estuda a biologia da *Brucella abortus*, concluindo pela exigência para seu desenvolvimento de uma pressão de oxigênio nem muito forte, nem muito fraca e por isso introduz uma nova técnica para o seu cultivo.

O método sugerido por Nowak consistia em semear o material a examinar em vários tubos ou placas, contendo meios especiais, que conjuntamente com outros tubos de ágar-simples prèviamente semeados com *Bacillus subtilis*, eram colocados em um frasco hermeticamente fechado; devido à rarefação do oxigênio provocada

(*) Trabalho apresentado na 2.^a Reunião Quinzenal do Instituto Adolfo Lutz, em 20 de Fevereiro de 1946.

pela ativa germinação do citado bacilo, obtinha-se uma atmosfera propícia ao desenvolvimento da *Brucella abortus*.

Wherry e Olivier³² em 1916, foram os primeiros a empregar a rudimentar técnica de Nowak no isolamento de uma Neisseria, conseguindo isolar a *Neisseria gonorrhoea* de três casos difíceis: de um menino de 4 anos, uma menina de 11 anos e de um homem de 26 anos.

Chapin⁷ que, em 1918, sugeriu a cultura inicial do gonococo em meios contendo proteínas não aquecidas incubando-os em atmosfera de dióxido de carbono, usou um processo simples, mas não muito preciso, que consistia em colocarem-se os tubos ou placas em uma jarra e dentro dela um pedaço de vela, acesa. Esta técnica que dá somente 3% de CO₂, foi recomendada por Parker e Hudson²¹ ainda em 1926.

Ruediger²³ em 1919, demonstra a vantagem da exclusão do ar nas culturas do gonococo.

Em 1919, Kohman¹⁷ trabalhando somente com duas amostras de meningococos, estuda a importância da reação dos meios de cultura em relação à atmosfera de dióxido de carbono, demonstrando que o crescimento se realiza em diversos pontos da escala de Sørensen nos incubados em CO₂, não se dando o mesmo apenas a 37°C.

Swartz²⁷ em 1920, descreve um método para reduzir a tensão de oxigênio.

Cohen e Markle⁸ 1916, Cohen⁹ 1918, e Cohen e Fleming¹⁰ 1918, publicaram uma série de artigos demonstrando a vantagem do emprêgo da redução da tensão de oxigênio no isolamento do meningococo. No primeiro recomendam a técnica do *B. subtiles* por êles modificada. Aham que o meningococo é um microaerófilo, necessitando para seu desenvolvimento de uma atmosfera composta aproximadamente de 10% de CO₂, e 90% de ar.

Com relação à *Brucella abortus* outro germe microaerófilo, esta peculiaridade cultural foi perfeitamente estudada por Huddleson¹⁶ em 1921 e por Theobald Smith²⁶ em 1924, que demonstraram ser a concentração de dióxido de carbono um importante fator de estímulo no crescimento daquela bactéria.

Este ponto de vista foi amplamente confirmado por Vallery e Rettger³⁰ em 1927, Walker³¹ em 1932 e mais recentemente por Gladstone, Fildes e Richardson¹⁵ em 1935.

Últimamente, novos trabalhos se sucedem, tendo Thompson²³ em 1935, descrito um método para obtenção de dióxido de carbono; Nye e Lamb²⁰ 1936, proposto a denominação de "mephitibic" para as bactérias microaerófilas; Carpenter²⁰ e outros 1941, estudado processos para o isolamento das mesmas; Folley¹⁴ 1941, descrito uma maneira de cultivá-las em placa de Petri; Rose²² 1942, apresentado uma estufa especial destinada exclusivamente ao seu cultivo; Sharzman e Bierman²⁵ 1942, aconselhado a agitação constante das culturas; Levine e Liedentopf¹⁸ 1942, ideado um aparelho para nelas introduzir quantidades certas de gás carbônico e Brewer⁵ 1942, descrito uma técnica de cultivo em placas.

Opiniões valiosas, no entanto, como as de Torrey e Buckell²⁹ 1921, Cook & Sttafford¹² 1921, Erickson & Albert¹³ 1922 e entre nós Arlindo de Assis 1925, negam a influência da atmosfera de dióxido de carbono como fator de crescimento nas Neisserias.

Em 1940 e 1941 Sara Brahan⁴ publicou duas monografias sobre meningococos e não tocou no assunto em questão.

Schanb & Foley²⁴ (1943) acham desnecessária a redução da tensão do oxigênio para o isolamento original do meningococo, mas aconselham para a manutenção da coleção de culturas, a incubação nas jarras com CO₂.

MATERIAL E TÉCNICA

Tendo havido, nesta capital um considerável surto de meningite célebro-espinhal epidêmica, no decorrer do ano de 1945 e princípios de 1946, procuramos aproveitar o abundante material enviado ao Instituto Adolfo Lutz pelo Hospital Emílio Ribas para exame bacteriológico, material êsse colhido em ótimas condições e semeados quase sempre poucas horas após. (*)

Sabemos que entre as várias bactérias que podem provocar a inflamação das meninges, o meningococo (*Neisseria intracellularis*) é sem dúvida a de maior importância.

(*) Posteriormente tivemos oportunidade de estudar casos do interior do Estado: um líquido remetido pelo Centro de Saúde de Sorocaba e outro pelo de Moçoca. Em ambos, apesar da distância e número de horas de viagem conseguimos isolar e identificar a *Neisseria intracellularis*, graças ao emprêgo da atmosfera de dióxido de carbono, não se havendo verificado vegetação pelo processo comum. Em casos anteriores, os líquidos enviados do interior, semeados somente a 37°C, quase sempre forneciam resultados negativos.

E por ser o meningococo bastante exigente em relação à cultura, não vegetando em meios pobres de proteínas nativas e em alguns casos não vegetando de modo algum, apesar do exame direto revelar inúmeros diplococos Gram negativos, procuramos verificar o seu desenvolvimento semeando os líquidos céfalo-raquidianos, em meios apropriados, que eram sempre incubados, comparativamente, em estufa a 37°C e em jarras contendo aproximadamente 10% de dióxido de carbono, igualmente colocados a 37°C.

Sobre a influência da atmosfera de CO₂, como fator de estímulo no crescimento das *Neisserias*, como já frisamos, na parte histórica, as opiniões se dividem, sendo algumas favoráveis, outras contrárias, havendo até contraditórias.

As semeaduras foram sempre realizadas em meio de ágar-ovo, por nós escolhido pelo seu ótimo comportamento na rotina.

A fim de obter uma atmosfera de dióxido de carbono, em lugar de usar recipientes apropriados de elevado custo, adotamos com bons resultados, jarras de vidro, com capacidade de dois litros, fabricadas nos Estados Unidos, da marca "Ideal All Glass Jar", empregadas usualmente para conservas e compotas de frutas.

Simplificando a técnica de Wadsworth²³, colocávamos em um dos ângulos do fundo da referida jarra, meia grama de carbonato de sódio, depositávamos com todo cuidado os tubos já semeados e inclinávamos ligeiramente a jarra, de modo que o carbonato ficasse em situação um pouco mais elevada e com uma pipeta Pasteur, deixávamos cair suavemente cerca de 10 cm³ de ácido sulfúrico a 10%. Fechávamos herméticamente a jarra, tendo o cuidado de untar com vaselina a rolha de borracha. Voltada novamente a jarra, a sua posição normal o ácido punha-se em contacto com o carbonato, havendo desprendimento de gás carbônico e evitando-se, dêsse modo, o incômodo emprêgo do tubinho para o ácido.

Em cada caso, o líquido céfalo-raquidiano era semeado em dois tubos de meio, em quantidades iguais, em média dez gotas para cada um, usando-se a mesma pipeta Pasteur, sendo um dêles colocado na jarra em atmosfera de dióxido de carbono à 37°C e outro testemunha sômente a 37°C.

É importante notar que nunca semeamos pela segunda vez o líquido do mesmo doente, nem utilizamos outro meio de cultura, o que viria dificultar e mesmo alterar nossas conclusões.

Observávamos sempre o crescimento até 72 horas e anotávamos os casos em que havia maior ou igual vegetação nos meios colocados em atmosfera de dióxido de carbono ou vantagem em tempo isto é, antecedência de 24 ou 48 horas sôbre o crescimento simplesmente a 37°C.

Os quadros a seguir nos dão uma idéia bastante clara. O primeiro resume nos 248 casos ou líquidos estudados, os resultados proporcionais entre os exames diretos — positivos e negativos — e os resultados das culturas — positivas e negativas. O segundo quadro resume o resultado comparativo das culturas positivas incubadas em atmosfera de dióxido de carbono e pelo processo comum, isto é, na estufa à 37°C.

RESULTADO GERAL DOS CASOS OU LÍQUIDOS ESTUDADOS. RESULTADOS DAS DIVERSAS PROPORÇÕES ENTRE OS EXAMES DIREITOS: POSITIVOS E NEGATIVOS E AS CULTURAS: POSITIVAS E NEGATIVAS

	<i>Exame Direto Positivo</i>	<i>Exame Direto Negativo</i>	<i>Total</i>
Cultura positiva	[76,99] 87 (66,41)	[32,59] 44 (33,59)	[52,82] 131 (100,00)
Cultura negativa	[23,01] 26 (22,22)	[67,41] 91 (77,78)	[47,18] 117 (100,00)
Total	[100,00] 113 (45,56)	[100,00] 135 (54,44)	[100,00] 248 (100,00)

As quantidades entre parêntesis representam percentagem sôbre o total das linhas correspondentes.

As quantidades entre colchetes representam percentagem sôbre o total das colunas correspondentes.

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE CULTURAS INCUBADAS EM ATMOSFERA DE CO₂ E PELO PROCESSO COMUM, NOS CASOS POSITIVOS.

<i>Comparação</i>	<i>N.º de Casos</i>	<i>Percentagem sobre o total de casos</i>
Exclusividade de crescimento em atmosfera de CO ₂	15	11,36
Antecedência de 48 horas na vegetação em atmosfera de CO ₂	12	9,09
Antecedência de 24 horas na vegetação em atmosfera de CO ₂	56	42,42
Concomitância de crescimento	49	37,12
Antecedência ou exclusividade de cresc. pelo processo comum.	0	0,00
Total	132	99,99

CONCLUSÕES

1 — Trabalhando com líquidos céfalo-raquidianos correspondentes a 248 doentes, usando como meio de cultura ágar-ovo, incubado a 37°C e em atmosfera de mais ou menos 10% de CO₂, também a 37°C, foi possível, conseguir-se, como demonstram os quadros anexos, exclusividade de vegetação do meningococo em atmosfera de CO₂ em 15 casos (11,36%); antecedência de 48 horas em 12 casos (9,09%); antecedência de 24 horas em 56 casos (42,42%); bem assim como concomitância de crescimento em 49 casos (37,12). Em nenhum caso houve antecedência ou exclusividade de crescimento pelo processo comum, estufa a 37°C (0,00%).

Somados todos os casos, obtivemos uma vantagem global de 62,87 por cento, com o emprêgo da atmosfera de CO₂, o que não é nada desprezível.

2 — Como consequência destas verificações, parece-nos de grande utilidade o uso corrente da atmosfera de CO₂, no isolamento inicial do meningococo, e das restantes *Neisserias*, nos laboratórios incumbidos de tais exames.

RESUMO

Com a finalidade de obter culturas do meningococo de um modo mais constante e precoce, partindo do líquido céfalo-raquidiano de doentes de meningite cérebro-espinhal epidêmica incubaram-se os meios de cultura semeados, — ágar-ovo — em atmosfera de mais ou menos 10% de dióxido de carbono a 37°C.

Todos os casos experimentados foram testemunhados por tubos contendo o mesmo meio de cultura, semeados de modo idêntico e colocados a 37°C.

Dos 248 casos estudados, 131 resultaram culturas positivas e 117 negativas.

Entre os 131 positivos, houve vantagem para os incubados em atmosfera de CO₂ de 62,87%.

Tendo-se em vista o resultado acima, preconiza-se a incubação em atmosfera de dióxido de carbono no isolamento inicial do meningococo.

SUMMARY

The AA. incubated culture media at an atmosphere of approximately 10% CO₂, for the quick isolation of meningococcus from spinal fluid of patients suspected of cerebrospinal-meningitis.

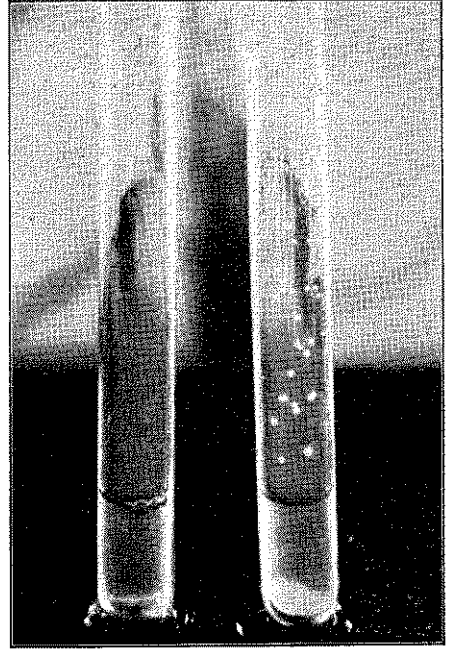
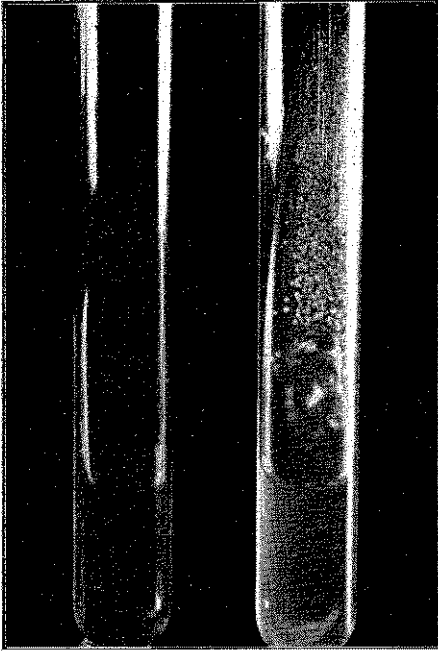
All culture media so incubated were controlled by similar media incubated at 37°C. Positive cultures were obtained in 131 of 248 cases.

The incubation at an atmosphere of 10% CO₂ offered an advantage of 62,87 per cent.

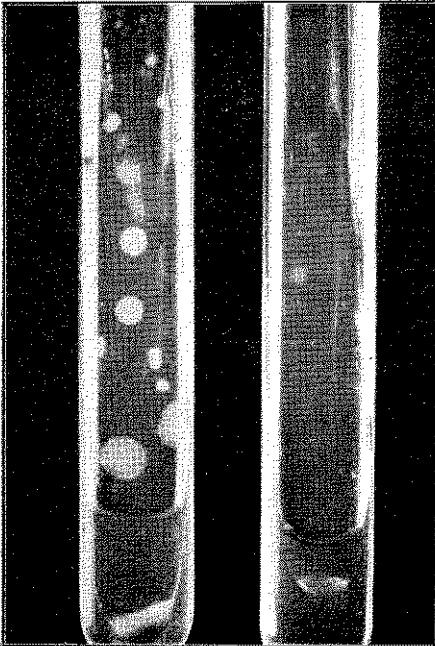
Considering these results the AA. advise the incubation at an atmosphere of 10% CO₂ for the initial isolation of meningococcus.

BIBLIOGRAFIA

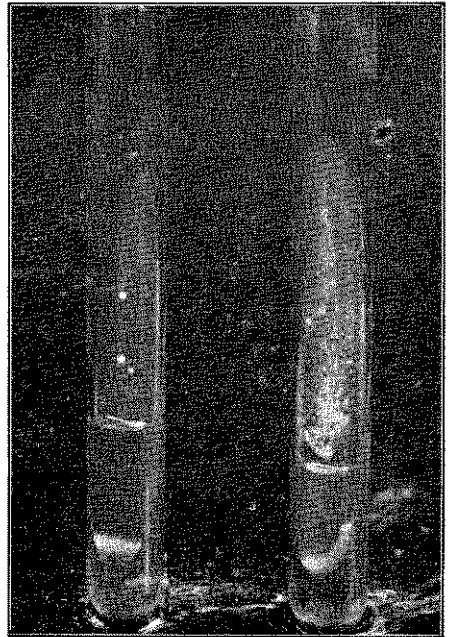
- 1 — ASSIS, A. de — 1925 — Observações sobre o cultivo dos gonococos. *Arch. do Inst. Vital Brasil*, III, fa. 2: 133.
- 2 — BANG — 1897 — Weitere Utersuuchungen über das Ververfeu — *Zeit f. Thiermed.* I, 241.
- 3 — BRAHAN, S. — 1940 — The meningococcus (*Neisseria intracellularis*) — *Bacteriological Reviews*, n.º 2, 59.
- 4 — BRAHAN, S. — 1941 — The meningococcus — Diagnostic Procedures and reagents. — *Am. Publ. Health Ass.* — New-York, 60.
- 5 — BREWEN, J. H. — 1942 — A new Petri dish cover and technique for use in the cultivation of anaerobes and microaerophiles. — *Science*, 95: 587.
- 6 — CARPENTER, C. M. — 1941 — Diagnostic procedures and reagents. — *Am. Pub. Health Ass.* — New-York.
- 7 — CHAPIN, C. W. — 1918 — Carbon dioxid in the primary cultivation of the gonococcus. — *J. infect. Dis.* 23: 342.
- 8 — COHEN, M. B. e MARKLE, B. S. — 1916 — A method which greatly facilitates the culture of the meningococcus. — *Journ. Am. Med. Ass.* 67: 1302.
- 9 — COHEN, M. B. — 1918 — Cultivation of the meningococcus under partial oxygen tension. — *Journ. Am. Med. Ass.* 70: 1999.
- 10 — COHEN, M. B. e FLEMING, G. S. — 1918 — The diagnosis of epidemie meningitis and the control of its treatment by rapid Bacteriologic and sorologic methods. — *J. infect. Dis.* 23: 337.
- 11 — CHUDJKOW — 1898 — Sur Lehre von der Anaerdiiose — Teil I, Moshow, 1896; Ref. *Centralbl f. Bact. Abt II* 339.
- 12 — COOK, M. W. e STAFFORD, D. D. — 1921 — A study of the Gonococcus and gonococcal infections. — *Journ. Infec. Dis.* 29: 561.
- 13 — ERICKSON, M. e ALBERT, H. — 1922 — Cultivation of the gonococcus. — *Journ. infect. Dis.* 30: 268.
- 14 — FOLEY, J. E. — 1942 — A method for exposing cultures to carbon dioxide or anaerobic atmosfere in petri dishes. — *The J. of Lab. e Clin. Med.* 27: 1431.
- 15 — GLADSTONE, G. P., FILDES, P. e RICHARDSON, G. M. — 1935 — Carbon dioxide as an assential factor in the growth of bacteria. — *Br. J. Exp. Path.* 16: 335.
- 16 — HUDDLESON, I. F. — 1920-21 — Studies in infections abortion. — *J. Am. Vet. Med. Ass.* 58: 524.
- 17 — KOHMAN, E. F. — 1919 — The so-called reduced oxygen teusion for growing of the meningococcus. — *Jour. Bacteriol.* 4: 571.
- 18 — LEVINE, M. e SIEDENTOPF, H. — 1942 — An apparatus to deliver a measured amount of CO₂ for blood cultures. — *Science*, 95: 130.
- 19 — NOWAK, J. — 1908 — Le bacille de Bang et sa biologie. *Am. de l'Inst. Pasteur*, 22: 541.



Dois casos de exclusividade de crescimento em atmosfera de CO_2 , fotografias de 24 horas.



Caso de exclusividade de crescimento em atmosfera de CO_2 , mostrando o tamanho enorme das colônias em 48 horas.



Caso de vantagem de 24 horas na vegetação.

- 20 — NYE, R. M. e SAMB, M. E. — 1936 — Sucreased carbon dioxide tension as an aid in the isolation of certain (mephitibic) pathogenic bacteria. *J. Am. Med. Ass.* 106: 1075.
- 21 — PARKER, F. Jr., e HUDSON, N. P. — 1926 — The Etiology of Haverhill Fever (Erythema Arthriticum Epidemicum) *Am. J. Path.* 2: 357.
- 22 — ROSE, S. B. — 1942 — Importance of carbon dioxide in diagnostic bacteriology with observations on carbon dioxide (Capneic) incubator. *Am. J. Clin. Path.* 12: 424.
- 23 — RUEDIGER, E. H. — 1919 — Exclusion of air in the cultivation of the gonococcus. *J. infect. Dis.* 24: 377.
- 24 — SCHAUB, J. G. e FOLEY, M. K. — 1943 — Methods for dignostic bacteriology. — *The C. Mosby Comp. St. Louis*, 151.
- 25 — SHWARTZMAN, G. e BIERMAU, W. — 1942 — A tecnica for the even distribution of cases through bacterial cultures. — *The J. Lab. e Clin. Med.* 28: 102.
- 26 — SMITH, THEOBALD — 1924 — Some culturel characteristics of bacillus abortus (Bang) with special reference to carbon dioxide requirements. — *J. Exp. Med.*, 40: 219.
- 27 — SWARTZ, E. O. — 1920 — A new culture method for the gonococcus. — *Jour. Urology*, 4: 325,
- 28 — THOMPSON, L. — 1935 — A simple Method of Supplying Carbon Dioxide in Jars for Bacteriologic Culture. — *Am. J. Clin. Path.* 5: 313.
- 29 — TORREY, J. C. e BUCKELL, G. T. — 1922 — Cultural Methods for the Gonococcus. — *J. infect. Dis.* 31: 125.
- 30 — VALLEY, G. e RETTGER, L. F. — 1927 — The influence of carbon dioxide on bacteria. — *J. Bact.* 14: 101.
- 31 — WALKER, H. H. — 1932 — Carbon dioxide as a factor affecting laug in bacterial growth. — *Science*, 76: 602.
- 32 — WHERRY, B. e OLIVIER, W. — 1916 — Adaptation to certain tensions of oxygen as shown by gonococcus and the parasitic and saprophytic bacteria. — *J. infect. Dis.* 19: 288.
- 33 — WADSWORTN, A. B. — 1939 — Standard Methods of the Division of Laboratories and Research — Baltimore. pag. 7.

VARIAÇÕES NAS FÓRMULAS LEUCOCITÁRIAS

JOSÉ LOPES NETO

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

Uma vez que nas fórmulas leucocitárias empregam-se, ao lado da observação qualitativa da amostra sanguínea considerada, números na expressão quantitativa dos resultados, há, com relação a elas, uma, até certo ponto falsa, noção de acuracidade. Já pelo fato de na sua execução ser examinada uma amostra, e bem pequena, dum humor tão complexo e variável como o sangue, verifica-se a relatividade da acuracidade de tais exames. Além disso, ao determiná-las, defronta-se o analista com uma série de fatores que determinam o aparecimento de erros nos resultados obtidos.

Há da parte de alguns, a convicção de que é mais importante a análise qualitativa do sangue, com a verificação de alterações degenerativas, anormalidade e imaturidade dos elementos sanguíneos, etc, que a observação quantitativa das porcentagens dos diferentes grupos leucocitários, sendo desnecessária, por tal razão, uma grande acuracidade da fórmula leucocitária. Tal, porém, não se dá. Os aspectos, quantitativo e qualitativo, das fórmulas leucocitárias têm importância idêntica e é da avaliação conjunta de ambos que se obtém as mais exatas informações para o diagnóstico clínico. Particularmente, os dados quantitativos são de grande importância no diagnóstico, prognóstico e na observação da evolução das moléstias, principalmente das infecciosas, quer expostos como habitualmente no hemograma de Schilling, quer sob a forma de índices tais como os de Medlar, Houghton, Crawford, etc.

Desta maneira, ao lado da cuidadosa observação qualitativa, deve a expressão quantitativa da fórmula leucocitária ser rigorosa quanto possível, pelo emprêgo de medidas que reduzam o erro a que está sujeita.

Tais erros podem ser reunidos em dois grupos:

I — erros de ordem técnica;

II — erros de ordem distribucional.

Os primeiros que reúnem toda uma série de erros técnicos tais como execução defeituosa dos esfregaços, coloração deficiente, erros:

na classificação dos leucócitos, etc, podem ser reduzidos pelo aprimoramento da técnica empregada e dos conhecimentos do examinador. Não serão por nós considerados.

Os segundos, independentes do examinador, decorrem da desigual distribuição dos diferentes leucócitos no esfregaço, pela variação da probabilidade de localização dos mesmos. No caso particular dos esfregaços feitos em lâmina a distribuição é ainda modificada pelo fato de tenderem os leucócitos de maior tamanho a se coletar nos bordos, e os de menor tamanho no centro. O emprêgo de esfregaços em lamínulas evita esta última causa de êrro, mas o método da lâmina, mais prático, embora menos acurado, é mais frequentemente empregado, sendo o êrro grandemente reduzido pelo emprêgo de um método de contagem que leve em conta a marginação e centralização leucocitárias, como seja o "Método de Contagem em Zig-zag nos Quatro Cantos", de Schilling, no qual conta-se em cada canto do esfregaço um quarto do número total de elementos que se pretende considerar, e de tal maneira que sejam percorridos campos quer do bordo, quer do centro da preparação.

Preenchidos os requisitos citados, a acuracidade das fórmulas leucocitárias passa a ser função do número total de leucócitos contados. De fato, decorrendo as variações da amostra sanguínea distendida na lâmina, da desigual distribuição dos diferentes leucócitos na mesma, quanto maior o número de leucócitos contado, tanto menores os desvios em relação ao valor real.

É objetivo do presente trabalho:

1.º — verificar as variações das fórmulas leucocitárias correspondentes a diferentes números totais de leucócitos enumerados.

2.º — julgar da aplicação prática dos resultados obtidos.

Para tal procedeu-se à verificação dos desvios das porcentagens dos diferentes grupos leucocitários, obtidas pelas contagens de 100, 200 e 400 leucócitos comparando-as com as em que 500 foram enumerados.

Os dados referentes a 500 leucócitos foram escolhidos para valores base pelas seguintes razões:

1.º — o número de 500 leucócitos é suficientemente grande para não determinar variações de grande amplitude;

2.º — é praticamente o máximo empregado nos exames hematólogicos, sendo só muito raramente utilizados maiores valores.

3.º — a contagem de 500 elementos não demandando muito tempo para sua realização pode ser utilizada na prática diária.

Não empregamos as médias dos valores encontrados como valores-base, pela razão já citada, dos desvios serem reduzidos pelo aumento do número de leucócitos contado, o que faz com que elas sejam menos exatas que os dados referentes a 500 leucócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esfregações de sangues normais e patológicos, em lâminas, corados pelos métodos de Leishman e May-Gruenwald-Giemsa.

Para enumeração dos leucócitos foi empregado o método de contagem em zig-zag nos quatro cantos.

Foram examinadas 50 lâminas selecionadas, de cada uma estabelecendo-se as fórmulas leucocitárias correspondentes a 100, 200, 400 e 500 leucócitos.

Em cada caso foram calculadas as variações absolutas dos diferentes grupos de leucócitos das fórmulas leucocitárias correspondentes a 100, 200 e 400 elementos. Estes resultados foram agrupados em tabelas para cada grupo leucocitário, ou seja: eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos.

Com referência a cada um dos grupos acima foram calculadas:

1.º — a média das porcentagens correspondentes a 500 leucócitos:

$$M_{500}$$

2.º — as médias das variações absolutas referentes às contagens de 100, 200 e 400 leucócitos:

$$MV_{100}$$

$$MV_{200}$$

$$MV_{400}$$

3.º — as variações médias relativas, parciais, correspondentes:

$$VMR_{100} = \frac{MV_{100}}{M_{500}}$$

$$VMR_{200} = \frac{MV_{200}}{M_{500}}$$

$$VMR_{400} = \frac{MV_{400}}{M_{500}}$$

4.º — as variações médias relativas globais.

Os resultados encontrados estão expressos nas tabelas seguintes:

Casos	Porcentagens em 500 leucócitos (valores-base)	VARIACÃO ABSOLUTA DOS EOSINÓFILOS		
		Número de leucócitos contados		
		100	200	400
1	0,6	0,4	0,1	0,1
2	2,4	0,4	0,6	0,15
3	25,0	2,0	4,0	0,25
4	6,6	0,6	1,1	0,35
5	1,6	0,6	1,1	0,15
6	21,6	5,4	3,9	1,15
7	3,0	1,0	0,5	0,25
8	3,4	1,6	0,4	0,1
9	1,0	3,6	0,1	0,35
10	1,8	0	0,5	0,25
11	33,0	1,2	0,7	0,45
12	24,6	3,0	3,0	1,0
13	7,0	3,0	1,5	0,5
14	2,0	2,0	1,5	0,5
15	8,6	4,6	0,1	0,15
16	1,4	0,4	0,4	0,1
17	7,4	0,4	0,9	0,9
18	4,6	0,4	1,6	0,15
19	9,4	0,6	1,1	0,35
20	1,8	0,2	0,2	0,65
21	0,2	0,8	0,3	0,65
22	1,2	0,8	0,8	0,3
23	5,0	2,0	0,5	0,5
24	18,2	4,2	3,7	0,7
25	5,0	0	1,5	0,5
26	8,4	0,4	0,1	0,4
27	11,4	2,4	0,1	0,5
28	2,4	1,6	0,6	0,4
29	0	0	0	0
30	3,6	1,4	0,1	0,4
31	0,6	0,4	0,1	0,1
32	3,2	1,2	0,2	0,2
33	5,6	4,4	1,4	0,4
34	4,4	1,4	0,6	0,4
35	24,8	8,8	3,8	0,55
36	1,0	1,0	0	0,25
37	1,4	1,6	0,6	0,15
38	2,6	1,4	0,1	0,4
39	0	0	0	0
40	12,2	5,2	3,2	0,95
41	6,2	1,8	0,2	0,05
42	3,6	2,6	0,1	0,1
43	0,6	0,6	0,1	0,15
44	7,2	0,8	1,8	0,7
45	24,6	1,4	1,9	0,9
46	6,2	0,8	0,3	0,45
47	3,2	0,8	0,8	0,3
48	21,4	2,4	1,9	0,6
49	5,0	0	0,5	0,25
50	3,0	1,0	0,5	0,25

Características estatísticas

M = 7,19
500

MV = 1,65
100

MV = 0,98
200

MV = 0,34
400

VMR = 22,94 %
100

VMR = 13,62 %
200

VMR = 4,72 %
400

Casos	Porcentagens em 500 leucócitos (valores-base)	VARIACÃO ABSOLUTA DOS BASÓFILOS		
		Número de leucócitos contados		
		100	200	400
1	0	0	0	0
2	1,2	1,2	0,3	0,3
3	0,8	0,8	0,8	0,3
4	0,4	0,6	0,6	0,1
5	0,2	0,8	0,8	0,3
6	2,8	0,2	0,7	0,2
7	0	0	0	0
8	2,0	1,0	0,5	0,25
9	1,0	0	0,5	0,25
10	0,2	0,2	0,2	0,05
11	0	0	0	0
12	1,2	1,2	1,2	0,45
13	0,6	0,4	0,4	0,1
14	1,0	0	0	0,5
15	0	0	0	0
16	0,4	0,4	0,1	0,15
17	0,4	0,4	0,4	0,1
18	0,4	0,6	0,1	0,1
19	0,4	0,6	0,1	0,15
20	0,4	0,4	0,4	0,4
21	0	0	0	0
22	0,4	0,6	0,6	0,1
23	0,4	0,6	0,1	0,1
24	1,0	0	0,5	0,5
25	0,8	0,8	0,3	0,05
26	0,2	0,2	0,2	0,05
27	0,8	1,2	0,7	0,2
28	0,6	0,4	0,4	0,1
29	0	0	0	0
30	0,4	0,4	0,4	0,4
31	0,8	1,2	0,2	0,05
32	0,4	0,4	0,4	0,1
33	1,6	1,6	0,4	0,6
34	0,4	0,6	0,1	0,15
35	0,4	0,4	0,6	0,1
36	0	0	0	0
37	0,8	0,2	0,2	0,2
38	0,4	0,4	0,4	0,1
39	1,0	1,0	0,5	0,25
40	0,6	0,4	0,1	0,15
41	0,6	0,4	0,1	0,15
42	0,2	0,2	0,3	0,05
43	0,4	0	0,1	0,15
44	0,6	0,4	0,1	0,35
45	0,2	0,2	0,3	0,05
46	1,0	0	0,5	0
47	0,2	0,2	0,2	0,2
48	0,8	0,8	0,5	0,2
49	0,2	0,2	0,2	0,2
50	0,2	0,8	0,3	0,05

<i>Características estatísticas</i>	
M = 0,61	VMR = 72,13 %
500	100
MV = 0,44	VMR = 50,81 %
100	200
MV = 0,31	VMR = 26,22 %
200	400
MV = 0,16	
400	

Casos	Porcentagens em 500 leucócitos (valores-base)	VARIAÇÃO ABSOLUTA DOS NEUTRÓFILOS		
		Número de leucócitos contados		
		100	200	400
1	83,8	0,8	0,7	1,2
2	34,0	0	1,5	0,75
3	44,8	5,8	3,8	1,05
4	25,6	1,4	0,1	0,4
5	69,2	3,2	1,7	0,3
6	41,8	4,8	3,3	1,3
7	62,0	8,0	5,5	0,25
8	45,4	0,4	3,4	0,85
9	49,8	1,2	1,3	0,3
10	56,0	0	1,5	0,75
11	67,6	4,6	2,6	1,6
12	40,2	5,2	1,7	2,2
13	58,2	7,2	5,7	1,7
14	69,2	3,2	2,2	0,3
15	67,6	3,4	0,4	0,6
16	63,6	0,4	6,6	0,1
17	47,4	1,4	3,1	0,15
18	63,6	7,6	4,1	0,35
19	54,8	0,2	1,3	0,55
20	67,4	1,6	1,1	0,15
21	35,4	0,6	2,4	0,1
22	55,2	4,2	3,7	0,95
23	55,6	1,6	2,1	2,1
24	56,4	5,6	8,6	3,6
25	64,0	0	2,0	1,25
26	44,0	10,0	2,0	1,0
27	59,2	3,2	0,8	0,45
28	62,0	2,0	1,0	1,0
29	93,0	1,0	0,5	0,75
30	64,4	1,4	0,9	0,1
31	66,4	4,6	0,8	2,1
32	54,0	6,0	4,0	1,0
33	46,0	10,0	10,0	0,5
34	69,8	2,8	0,3	1,05
35	46,2	9,8	4,8	0,55
36	67,4	5,6	3,6	1,1
37	49,8	7,8	4,3	0,05
38	60,8	0,2	2,7	0,7
39	63,8	5,2	1,8	0,7
40	63,4	4,6	5,1	1,1
41	66,0	0	3,5	0,25
42	47,0	5,0	0,5	0,5
43	63,6	1,6	0,1	0,35
44	60,8	5,8	2,3	0,7
45	45,4	5,4	4,4	1,15
46	69,4	1,4	1,1	1,35
47	69,0	4,0	2,5	0,25
48	48,2	9,8	7,3	1,3
49	70,8	3,8	2,8	0,8
50	67,2	1,8	0,7	2,45

Características estatísticas

M = 57,9	VMR = 5,99 %
500	100
MV = 3,34	VMR = 4,86 %
100	200
MV = 2,72	VMR = 1,57 %
200	400
MV = 0,88	
400	

Casos	Porcentagens em 500 leucócitos (valores-base)	VARIACÃO ABSOLUTA DOS LINFÓCITOS		
		Número de leucócitos contados		
		100	200	400
1	12,8	0,2	1,3	0,8
2	59,4	1,6	2,1	0,6
3	26,4	3,6	0,6	1,1
4	61,2	1,2	1,8	0,45
5	21,2	2,8	0,2	0,05
6	30,0	4,0	3,5	0,25
7	32,8	8,2	5,2	0,2
8	44,4	1,4	0,1	0,15
9	22,0	2,0	2,0	1,5
10	37,4	2,6	3,6	0,65
11	26,0	3,0	1,5	0,25
12	22,4	1,4	1,9	0,85
13	29,8	3,2	1,2	0,95
14	23,4	4,6	3,1	1,15
15	16,4	2,4	1,4	0,35
16	21,0	3,0	8,5	0,75
17	33,8	0,2	2,8	0,7
18	25,2	4,8	3,8	0,55
19	27,4	1,4	0,1	0,85
20	28,6	0,4	0,1	0,9
21	63,6	0,6	2,4	0,15
22	39,2	4,8	2,8	0,55
23	33,8	2,8	1,2	1,75
24	17,2	0,2	3,7	2,2
25	25,0	2,0	1,5	1,75
26	36,8	7,8	3,3	0,7
27	25,4	0,6	2,4	0,9
28	30,0	7,0	1,0	0,5
29	6,6	1,6	1,6	0,6
30	29,0	0	0,5	0,5
31	30,0	6,0	0,5	2,0
32	38,8	5,2	3,2	1,2
33	43,6	11,6	11,6	0,6
34	22,8	4,8	0,3	1,45
35	21,8	1,8	0,3	0,55
36	28,0	4,0	2,0	0,75
37	43,0	5,0	2,0	0,75
38	29,6	0,4	1,1	0,1
39	30,0	2,9	1,0	0,75
40	20,2	0,2	0,7	0,45
41	24,2	1,2	3,2	0,65
42	47,4	2,4	0,1	0,4
43	33,2	1,8	0,7	0,2
44	27,6	3,4	0,4	0,65
45	24,0	4,0	2,5	0
46	15,0	0,4	1,6	0,6
47	25,6	4,6	2,6	0,6
48	18,0	3,6	3,6	2,85
49	20,6	3,4	3,9	0,4
50	26,8	1,0	0,7	2,7

*Características estatísticas*M = 29,75
500VM = 2,92
100VM = 2,13
200VM = 0,79
400VMR = 9,81 %
100VMR = 7,15 %
200VMR = 2,65 %
400

Casos	Porcentagens em 500 leucócitos (valores-base)	VARIAÇÃO ABSOLUTA DOS MONÓCITOS		
		Número de leucócitos contados		
		100	200	400
1	2,6	0,4	0,4	0,35
2	2,8	0,2	0,2	0,05
3	2,8	1,2	0,2	0,05
4	5,8	0,2	0,8	0,2
5	7,6	0,4	2,4	0,6
6	3,6	3,4	1,0	0,15
7	2,0	1,0	0,5	0,25
8	4,6	1,4	1,6	0,6
9	2,6	0,4	0,1	0,1
10	5,4	2,4	1,4	0,4
11	4,6	0,4	0,1	0,4
12	5,2	2,8	0,2	0,8
13	3,8	1,2	2,2	0,05
14	4,4	0,6	0,6	0,85
15	7,4	0,4	1,1	0,1
16	13,6	2,6	1,6	0,6
17	6,0	2,0	1,0	0,25
18	6,0	2,0	1,5	0,5
19	8,0	0	0	0,5
20	1,8	1,8	0,8	0,3
21	0,8	0,8	0,3	0,3
22	4,0	2,0	0,5	0
23	4,4	1,6	0,6	0,35
24	7,2	1,2	0,7	0,3
25	4,0	1,0	1,5	0
26	10,0	1,2	1,3	0,55
27	3,2	4,2	0,8	0,3
28	5,0	3,0	1,0	0
29	0,4	9,6	0,1	0,15
30	2,6	0,4	0,9	0,4
31	2,2	0,2	0,2	0,05
32	3,2	0,8	0,2	0,2
33	3,2	0,8	0,2	0,3
34	2,6	0,4	0,1	0,15
35	6,8	1,2	0,3	0,45
36	2,6	1,6	0,9	0,4
37	5,0	1,0	1,5	0,75
38	6,6	1,6	1,1	1,1
39	4,0	1,0	2,0	0,75
40	3,4	0,6	0,9	0,15
41	3,0	1,0	0	0
42	1,8	0,2	0,2	0,05
43	2,2	0,8	0,8	0,55
44	3,8	1,2	0,2	0,3
45	5,8	0,2	0,3	0,2
46	8,6	1,4	0,4	0,35
47	2,0	0	0,5	0,25
48	8,0	3,0	1,5	0,75
49	3,2	0,2	0,2	0,05
50	2,8	0,2	0,8	0,75

Características estatísticas

M = 4,06
500

MV = 1,16
100

MV = 0,76
200

MV = 0,33
400

VMR = 28,57 %
100

VMR = 18,71 %
200

VMR = 8,12 %
400

Casos	Porcentagens em 500 leucócitos (valores-base)	VARIACÃO ABSOLUTA DOS PLASMÓCITOS		
		Número de leucócitos contados		
		100	200	400
1	0,2	0,2	0,3	0,05
2	0,2	0,2	0,2	0,05
3	0,2	0,2	0,2	0,05
4	0,4	0,4	0,4	0,1
5	0	0	0	0
6	0,2	0,2	0,3	0,05
7	1,0	1,0	0,5	0,75
8	0,2	0,2	0,2	0,05
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0,6	0,6	0,4	0,4
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0,2	0,2	0,3	0,05
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0,8	0,2	0,3	0,2
24	0	0	0	0
25	1,2	0,2	0,8	0,05
26	0,4	0,4	0,1	0,1
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
31	0	0	0	0
32	0,4	1,6	0,6	0,1
33	0	0	0	0
34	0	0	0	0
35	0	0	0	0
36	0	0	0	0
37	0	0	0	0
38	0	0	0	0
39	1,2	1,2	0,7	0,55
40	0,2	0,2	0,2	0,3
41	0	0	0	0
42	0	0	0	0
43	0	0	0	0
44	0	0	0	0
45	0	0	0	0
46	0,2	0,2	0,3	0,05
47	0	0	0	0
48	0	0	0	0
49	0,2	0,2	0,2	0,05
50	0	0	0	0

*Características estatísticas*M = 0,15
500MV = 0,14
100MV = 0,12
200MV = 0,05
400VMR = 93,33 %
100VMR = 80 %
200VMR = 33,33 %
400

<i>Leucócitos</i>	RELATIVAS PARCIAIS VARIAÇÕES MÉDIAS		
	<i>Número de leucócitos contado</i>		
	100	200	400
Eosinófilos	22,94 %	13,62 %	4,72 %
Basófilos	72,13 %	50,81 %	26,22 %
Neutrófilos	5,99 %	4,86 %	1,57 %
Linfócitos	9,81 %	7,15 %	2,65 %
Monócitos	28,57 %	18,71 %	8,12 %
Plasmócitos	93,33 %	80 %	33,33 %

Número de leucócitos	VARIAÇÃO MÉDIA GLOBAL
100	54,79 %
200	30,52 %
400	12,26 %

RESULTADOS

Foram os seguintes os resultados encontrados:

1.º — as contagens de 100 leucócitos mostram variação relativa máxima de 93,33% e mínima de 5,99%, com um valor médio de 54,79%;

2.º — nas fórmulas leucocitárias em que foram contados 200 leucócitos houve uma variação relativa máxima de 80%, sendo a mínima 4,86% e a média 30,52%;

3.º — as contagens de 400 leucócitos apresentam 33,33% como valor máximo da variação relativa, sendo a mínima 1,57% e a média 12,26%.

CONCLUSÕES

Dos dados verificados conclue-se:

1.º — A comparação dos valôres das variações das contagens de, respectivamente, 100, 200 e 400 leucócitos em relação às porcentagens referentes a 500 elementos mostra um nítido decréscimo quanto maior o número contado.

2.º — Devem ser preferidas as contagens de 400 ou 500 elementos uma vez que as variações para tal número não são de grande monta.

3.º — As fórmulas leucocitárias com 200 elementos podem ser toleradas nos casos de urgência, como medida de emergência, devendo neste caso, ser confirmadas posteriormente pela contagem de 400 ou 500 leucócitos.

4.º — As contagens de 100 leucócitos não devem ser utilizadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — WINTROBE, M. M. — 1942 — Clinica Hematology, 1st ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
- 2 — SCHILLING, V. — 1936 — El cuadro hematico y su interpretacion clinica, 3.ª edição, Editorial Labor, Barcelona.
- 3 — SCHILLING, V. e GRADWOHL, R. B. H. — The Blood Picture, 7.ª ed. The C. V. Mosby Co, St. Louis.
- 4 — KRACKE, R. — 1943 — Doenças do Sangue e Atlas de Hematologia. Trad. 2.ª ed. americana, Editorial Guanabara, Rio de Janeiro.
- 5 — LESER, W. S. P. — 1933 — Contribuição para o estudo dos métodos estatísticos aplicáveis à medicina e à higiene. Tese de doutoramento p/ Faculdade de Medicina de São Paulo.
- 6 — DOWNEY, H. — 1938 — Handbook of Hematology, 1st. ed., Paul B. Hoeber, New York.
- 7 — KOLMER, J. A. e BOERNER, F. — 1941 — Approved Laboratory Technic — 3st. ed., D. Appleton-Century Company Inc. New York.
- 8 — GINI, Conrado — 1935 — Curso de estadística — Editorial Labor, Barcelona.

CONSIDERAÇÕES SÔBRE ANÁLISES DE WHISKIES

LEÃO TIKER,

Químico do Instituto Adolfo Lutz.

Para a fabricação de bebidas alcoólicas existem as mais variadas matérias primas, como podemos ver no seguinte quadro:

<i>Matéria Prima</i>	<i>Sem destilação</i>	<i>Com destilação</i>
<p>a) <i>Subst. açucaradas:</i></p> <p>1) Uvas</p> <p>2) Frutas</p> <p>3) Groselhas</p> <p>4) Melaço de aç. de cana</p> <p>5) Cerejas</p> <p>6) Ameixas</p> <p>7) Bagas de Zimbros ...</p> <p>8) Cana</p> <p>9) Resíduos da obtenção de vinhos</p>	<p>Vinhos</p>	<p style="text-align: center;">Conhaques</p> <p>4) Rum</p> <p>5) Kirsch</p> <p>6) Sliwowitz</p> <p>7) Genebra, Gim</p> <p>8) Caninha</p> <p>9) Bagaceira</p>
<p>b) <i>Produtos feculentos:</i></p> <p>1) Cevada</p> <p>2) Trigo</p> <p>3) Centeio</p> <p>4) Batata</p> <p>5) Milho</p>	<p>Cervejas</p>	<p>1) Wodka-Whisky</p> <p>2) Wodka</p> <p>3) Whisky (Rye)</p> <p>4) Wodka</p> <p>5) Whisky (Bour- bon)</p>
<p>6) Arroz</p>	<p>Saké</p>	<p>6) Arrak</p>

Interessam-nos aqui, alguns comentários sôbre a bebida *whisky*, de origem inglesa e norte americana, a qual, conforme a nossa legislação, deve satisfazer os seguintes requisitos:

“Ser um destilado alcoólico de um mosto de cereais fermentado e envelhecido em recipientes apropriados.”

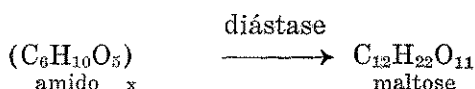
Como podemos ver na tabela, temos dois tipos principais de whiskies:

- 1) Rye, com um mosto contendo em média 50% de centeio;
- 2) Bourbon, com um mosto contendo 60 a 80% de milho.

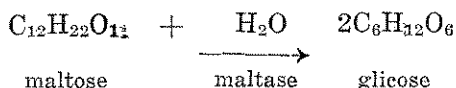
Para podermos compreender melhor o critério que tomamos para analisar um whisky, vejamos as fases que temos que passar para a sua fabricação.

1.º) *Germinação do grão.* Em condições e ambiente apropriados para germinação, faz-se com que a semente germine, sendo depois seca e triturada.

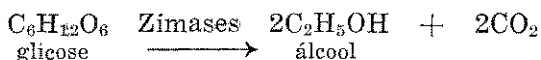
2.º) *Sacarificação.* As substâncias amiláceas que constituem o grão germinado são desdobradas por intermédio da diástase, que já existe no próprio meio, originando o di-sacarido maltose, conforme a seguinte reação:



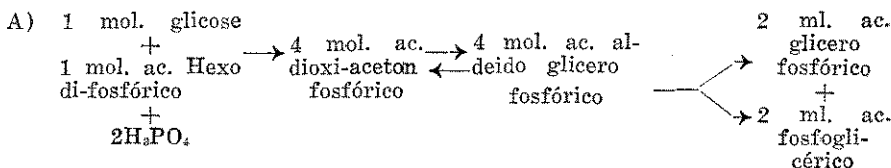
Esta por sua vez, por meio da maltase (fermento que se desenvolve na levedura da cerveja) desdobra-se em duas moléculas de glicose.



3.º) *Fermentação.* A glicose formada por meio de fermentos ou zimases se transforma em álcool conforme a seguinte reação:



No decorrer desta reação formam-se diversos produtos intermediários como podemos ver pela série de reações seguintes:



Analisando diversos whiskies das mais diversas procedências e comparando tabelas das mais diversas análises procedidas, chegamos em média, aos seguintes fatores, avaliados em grama litro do produto:

<i>Componentes secundários</i>	<i>Tipo escocês</i>	<i>Tipo americano</i>	<i>Tipo cortado</i>	<i>Tipo nacional</i>
Acidez	0,230	0,180	0,090	0,030
Ésteres	1,660	0,600	0,500	0,200
Aldeídos	0,205	0,180	0,090	0,040
Furfurol	0,032	0,020	0,004	0,000
Álcoois superiores	2,400	1,200	0,800	0,270
Total	4,527	2,180	1,484	0,540

Como vemos, o tipo escocês puro possui entre 4 e 5 de componentes. O tipo americano que em geral é manipulado (blended), pois cortam-se porções escolhidas do destilado com álcool de cereais, já possui componentes que oscilam em redor de 2.500. O tipo cortado representa um whisky americano ou escocês diluído em álcool, processo este muito usado por certos importadores do produto que o vendem como produto nacional. Finalmente, o tipo que muitos fabricantes colocam no mercado como sendo produto nacional é quase isento de componentes. Este é feito com álcool aromatizado com as chamadas essências de whisky, das quais damos uma para exemplo.

Óleo de fusel de batatas	0,946 litros
Essência de fusel "Rye"	8,516 litros
Éter de Rum	9,463 litros
Essências de amêndoas amargas	74 cc.
Álcool	23,65 litros
Vanilina	7,3 cc.
Heliotropina	14,7 cc.
Tintura de bálsamo de Perú	3,6 cc.

Dissolver 29 cc. da mistura destes produtos em 27½ litros de álcool, juntando-se 29 litros de água. Misturar, filtrar e colorir com caramelo.

Ao lado desta, existem outras mais simples, como o chamado "Beading Oil", constituído de amêndoas doces com ácido sulfúrico neutralizado com amônia e álcool, destilando-se depois a mistura.

Naturalmente um álcool aromatizado com uma destas essências não pode dar um total de componentes secundários como um whisky puro escocês.

Além de levarmos em consideração os dados analíticos, devemos tomar muito em conta os caracteres organoléticos da bebida, como sejam o aspecto, a côr, o gôsto e o cheiro. Notamos, porém, que todos êstes característicos coincidem perfeitamente com os resultados analíticos, pois, em geral, os produtos de componentes baixos apresentam um gôsto que se aproxima mais ao do álcool de cereais retificado.

Têm aparecido para contrôlo, produtos falsificados, isto é, produtos manipulados clandestinamente e acondicionados em vasilhames rotulados de produtos de renome. Êstes produtos, porém, são facilmente identificáveis, quer pelos caracteres organoléticos alterados, isto é, não genuínos do produto, quer pelos resultados analíticos acusando componentes secundários reduzidos.

Em vista disto, concluimos que o artigo da nossa legislação que admite que as bebidas retificadas do "tipo gin", o total de componentes de 1 gr. por litro, viria beneficiar alguns contraventores, que ao declararem no rótulo o termo *retificado*, poderiam usar um produto artificial ou mesmo diluïrem um bom whisky, ao extremo de reduzirem à quarta parte os seus componentes secundários.

Pelos resultados verificados no decorrer desta contribuição, a única conclusão a que poderíamos chegar, seria a de admitirmos whiskies com valores acima de 1,500 gms. por litro, de componentes secundários, e com caracteres organoléticos próprios do produto. Assim sendo, poderíamos evitar uma exploração de produtos constituídos exclusivamente de álcoois de cereais simplesmente aromatizados ou de whiskies importados excessivamente cortados.

Estendendo estas considerações a outros tipos de bebidas, queríamos admitir os dizeres do parágrafo único do artigo 479 da Legislação em vigor para o gin. Quanto às restantes mencionadas, genebra, run, kirsch e korn, careceriam de um estudo, para que pudéssemos estabelecer uma média de componentes para tais produtos, afim de termos uma medida padrão.

RESUMO

1 — Produtos fermentados com destilação e sem destilação: materias primas.

2 — Tipos de whiskies.

3 — Processo de fabricação.

4 — Considerações sobre os componentes secundários.

5 — Fórmulas para falsificação.

6 — Conclusão.

a) Caracteres organoléticos próprios.

b) Componentes com o mínimo de 1,500 gramas por litro para os considerados retificados.

NOTAS SÔBRE O CULTIVO DO MENINGOCOCO

II — Emprêgo do ácido paraminobenzóico.

MANOEL DE BRITTO E SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

JOSÉ CARLOS RIBAS

Biologista do Departamento de Produção Animal.

As exigências para cultivo do Meningococo, em relação aos meios de cultura empregados para tal fim, são conhecidas desde 1887, quando então Weichselbaum conseguiu isolá-lo em cultura pura, de seis casos de meningite cerebrospinal¹. São elas facilmente compreensíveis, bastando para isso passarem-se em revista os inúmeros meios propostos, com essa finalidade.

Com o aparecimento das sulfamidas e seus compostos, com o seu emprêgo corrente e precoce na terapêutica das doenças infecciosas, ultimamente temos tido sérias dificuldades para obter culturas positivas de meningococo, em pacientes sob tratamento. Do ponto de vista bacteriológico, êste fato nos priva da única base segura para o diagnóstico etiológico da infecção, que seria o isolamento e identificação do germe. Do ponto de vista clínico, impede o facultativo de tomar as medidas terapêuticas e profiláticas necessárias para cada caso.

Investigações de alguns pesquisadores põem em evidência que “as culturas negativas” em certos casos em que *compostos* sulfonâmicos foram empregados, são “falsos resultados”². Por outro lado, trabalhos relativamente recentes de Stamp³ e Green⁴ na Inglaterra, de MacLoad⁵ e de Woods⁶ nos Estados Unidos da América, mostraram que existem certas substâncias inibidoras, capazes de nulificar a ação bacteriostática das sulfamidas.

(*) Trabalho apresentado na 2.^a Reunião Quinzenal do Instituto Adolfo Lutz, realizada em 20 de Fevereiro de 1946.

Uma dessas substâncias, que hoje está perfeitamente identificada, é o ácido paraminobenzóico, droga relativamente de baixo custo e fácil obtenção.

Segundo Harris e Thimann⁸ deve-se a Woods a descoberta da ação anti-sulfonamida do ácido paraminobenzóico; êle demonstrou que um fator inerente às leveduras e com propriedades químicas semelhantes às do ácido paraminobenzóico é que impede a ação bacteriostática da sulfanilamida e da sulfapiridina.

Esta observação estendeu-se posteriormente "in vitro"^{3,4,5} e "in vivo"^{6,7} a todos os tipos de sulfonamidas.

Em vista destes trabalhos e dos resultados satisfatórios encontrados nos estudos de Charles Janeway, é que nos propusemos a experimentar a adição dessa substância num dos meios de cultura empregados na rotina da secção de Meningite deste Instituto, substância esta tida por vários autôres como inibidora das sulfamidas, podendo, além disso, agir como um *fator de crescimento*⁹ das culturas.

O autor acima citado usou sangue retirado de dois pacientes com endocardite bacteriana subaguda, os quais estiveram sob tratamento com sulfapiridina por mais de um mês. Semeou-os em meios de cultura com e sem ácido paraminobenzóico, verificando o crescimento mais rápido e abundante nos primeiros, isto é, nos meios que continham o ácido-paraminobenzóico. O germe cultivado foi isolado e identificado como *Streptococcus viridans*.

MATERIAL E TÉCNICA

Trabalhamos exclusivamente com líquidos cefalorraquidianos provenientes de pacientes do Hospital Emílio Ribas e, dentre êles, só com os suspeitos de meningite cerebrospinal epidêmica. Passávamos, então, por uma fase de uma das maiores epidemias desta entidade mórbida, registradas nestes últimos tempos, segundo nos declarou o Dr. Luiz Pereira Barreto Neto, ilustre facultativo daquele Hospital de Isolamento. Ainda, segundo o mesmo, os doentes em geral chegavam ao Hospital já sob a terapêutica das sulfonamidas. Nos "líquors" estudados, infelizmente não nos foi possível dosar as

sulfonamidas possivelmente presente em taxas relativamente altas. Tratando-se de pleno surto epidêmico, foi-nos fácil conseguir 185 amostras de líquidos no decorrer dos meses de agosto a dezembro de 1945, provenientes de 185 doentes, daquele Hospital, e tentar com os mesmos obter culturas positivas nos meios em estudo contendo ácido paraminobenzóico. Procedemos dessa maneira mesmo nos casos em que os exames bacterioscôpicos deram resultado negativo, após a coloração de *Gram* e de *Gabbett*, a fim de afastar outras possíveis meningites bacterianas então fora de nosso estudo.

O meio de cultura escolhido foi o ágar-ôvo inclinado pois tem sido o que nos tem dado melhores resultados nos trabalhos de rotina deste laboratório.

Usamos o que passamos a chamar de *ágar-ôvo simples* e o *ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico* entrando essa substância na concentração, tida como ótima, de 5mg. por 100 cc de meio.

A técnica de preparo foi a seguinte: ágar com albumina de ovo 500,0 cm³; amido solúvel, 1,6 grs; solução a 0,5% de ácido paraminobenzóico 5,0 cm³. Dissolvido o amido em 20 cm³ de água, aquecer em banho-maria. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

À parte, esterilizar a solução de ácido paraminobenzóico. Juntar as duas soluções no ágar fundido. Distribuir em tubos de 16x160. Inclinare depois de solidificado, controlar a esterilidade.

Tôdas as amostras de "líquor" foram semeadas nestes dois meios com a mesma pipeta na quantidade de mais ou menos 0,5 c.c. e postas na estufa a 37°C., permanecendo aí em observação por 72 horas. Quando ausentes de qualquer crescimento eram dados como casos negativos. Nos casos em que verificamos crescimento em ambos os meios observando que, em geral êsse crescimento era mais abundante no meio que continha ácido paraminobenzóico. Em outros casos verificamos que em 24 horas havia vegetação no meio com o referido ácido e não no de ágar ôvo simples, onde a vegetação só vinha a positivar-se dentro de 48 horas de estufa. Em outros, ainda, notamos que, havendo vegetação entre 24-48 horas no meio com ácido, só a observávamos no ágar ôvo simples após 72 horas de estufa, e, o que é mais importante realçar, houve casos em que só obtivemos culturas positivas no ágar ôvo com ácido paraminobenzóico, restando negativas as culturas no ágar ôvo simples, após as 72 horas de estufa. Estas últimas verificações vinham provar a existência de sulfa-

midas no "líquor", em concentrações tais que impediam a vegetação total ou parcial do meningococo nos meios comumente usados na rotina.

Os quadros abaixo dão idéia mais nítida dos nossos resultados. No quadro número I mostramos um estudo dos resultados e proporções entre os exames bacterioscópicos ou diretos e as culturas. No quadro número II, temos a comparação dos resultados das culturas positivas nos meios de ágar-ôvo simples e ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico.

QUADRO I

CASOS EXPERIMENTADOS: 185. ESTUDO DOS RESULTADOS E PROPORÇÕES ENTRE OS EXAMES DIREITOS E CULTURAS.

	Exames diretos positivos	Total	Exames diretos negativos
Culturas positivas	[77,11] 64 (75,30)	[45,95] 85 (100,00)	[20,59] 21 (24,71)
Culturas negativas	[22,89] 19 (19,00)	[54,05] 100 (100,00)	[79,41] 81 (71,00)
Total	[100,00] 83 (44,86)	[100,00] 185 (100,00)	[100,00] 102 (55,14)

Os números entre parentesis representam a percentagem sôbre o total das linhas correspondentes; e os entre colchetes representam a percentagem sôbre o total das colunas correspondentes.

QUADRO II

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE CULTURAS EM ÁGAR-ÔVOS COM ÁCIDO PARAMINOBENZÓICO E ÁGAR-ÔVO SEM ÁCIDO PARAMINOBENZÓICO NOS 85 CASOS POSITIVOS

<i>Comparação</i>	<i>N.º de Casos</i>	<i>Porcentagem sobre o total dos Casos</i>
Exclusividade de crescimento em ágar-ôvo com ac. paraminobenzóico	18	21,18
Antecedência de crescimento de 48 hs. em ágar-ôvo com ac. paraminobenzóico	2	2,35
Antecedência de crescimento de 48 hs. em ágar-ôvo c/ ac. paraminobenzóico	10	11,76
Comcomitância de crescimento	54	63,53
Exclusividade de crescimento no ágar-ôvo simples	1	1,18
Total	85	100,00

CONCLUSÕES

1. Pelos resultados expostos nos quadros acima, verificamos o seguinte: o ágar ôvo com ácido paraminobenzóico foi-nos francamente favorável na obtenção de culturas positivas para os meningococos em 18 casos, dando-nos, portanto, uma percentagem de

positividade superior ao seu testemunha, de 21,18%; em 2 casos obtivemos culturas positivas com antecedência de 48 horas, o que nos dá vantagem, quanto ao diagnóstico precoce, de 1,35%; em 10 casos tivemos antecedência de crescimento de 24 horas, isto é, 11,76% de vantagem do meio com ácido sobre o de ágar-ôvo simples; apenas em 1 caso verificamos o crescimento da cultura no ágar-ôvo simples, ao lado de resultado negativo no ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico.

Vemos assim, que somados os casos em que obtivemos exclusividade e antecedência de crescimento de 24-48 horas no meio de ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico, obtivemos vantagem global deste meio sobre o ágar ôvo simples de 35,29%, o que não é nada desprezível.

2. Como consequência dessas verificações, parece-nos de utilidade o emprêgo do ácido paraminobenzóico nos meios de cultura de rotina, e particularmente aconselhável quando se trata de material de doentes supostos estarem sob quimioterapia sulfonamídica.

RESUMO

Os A.A. com a finalidade de obter cultura de meningococo nos líquidos cefalorraquidíanos de doentes suspeitos de meningite cerebrospinal epidêmica, sob tratamento pelas sulfonamidas, experimentaram o emprêgo do ácido paraminobenzóico num dos meios de cultura habitualmente empregados usando como testemunha o mesmo meio sem o referido ácido.

Dos 185 casos estudados, 100 resultaram culturas negativas.

Entre os 85 positivos encontraram vantagem de 35,29% do meio adicionado de ácido paraminobenzóico sobre o meio testemunha.

Em vista desses resultados, preconizam o emprêgo dessa substância — tida por muitos como um “fator de crescimento” — nos meios de cultura de rotina para os casos sob tratamento pelas sulfonamidas.

SUMMARY

The A.A. aiming the cultivation of Meningococci from cerebro-spinal meningitis and under treatment by the sulfonamides tried para-aminobenzoic acid in one of culture media employed, while a control, without the acid was employed.

Out of 185 cases investigated, 100 were negative for bacterial growth.

Amongst the 85 positive cases there was an advantage of 35,29% in favour of the media containing para-aminobenzoic acid, over the control.

In view of such results the A.A. advise the use of that substance, considered by many as growth factor, in the routine culture media, in cases of suspected meningococcal cerebrospinal meningitis likely to be under treatment by the sulfamids.

REFERÊNCIAS

- 1 — WEICHELBAUM, A. — 1887 — *Fort. d. Med.*, 5: 373, 620.
- 2 — JANEWAY, C. A., — Method for obtaining rapid bacterial growth in cultures from patients under treatment with sulfonamides;
J. Am. Med. Assoc. — March, 8, 1941 — 116: 941.
- 3 — STAMP, T. C. — Bacteriostatic Action of Sulfanilamid in vitro: Influence of fractions isolated from Hemolytic Streptococci.
Lancet — July 1, 1939 — 2: 10 — 17.
- 4 — GREEN, H. N. — The mode of action of Sulfanilamide with Special Reference to a Bacterial Growth Stimulating Factor (P factor) obtain from *Brucella Abortus* and other Bacteria.
Brit. J. Exper. Path. — Feb., 1940 — 21: 38 — 64.
- 5 — MAC JOAD, C. M. — The inhibition of the Bacteriostatic Action of Sulfonamide Drugs by Substances of Animal and Bacterial Origins.
J. Exper. Med. — Sept., 1940 — 72: 217 — 232.
- 6 — WOODS, D. D. — The relation of p. Aminobenzoic acid to the mechanism of the Action of Sulfanilamide.
Brit. J. Exper. Path. — April, 1940 — 21: 74 — 90.
- 7 — SELBIE, F. R. — The inhibition of Action of Sulfanilamide in mice by p. Aminobenzoic Acid.
Ibid, April, 1940 — 21: 90 — 93.
- 8 — HARRIS, R. S. AND THIMANN, R. V. — *Vitamins and Hormones*, 1944, 2: 215.
- 9 — KOLMER, J. A. — *Clinical diag. by laboratory examination*, 1943, pg. 433.

REDUTASE E EMPREGO DE RESAZURIN NOS EXAMES DE LEITE (*)

THEODÓSIO M. P. DA SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

A prova da redutase nos leites, é empregada com o fim de se obter aproximadamente o teor de germes vivos no produto em exame.

Foi estudada e posta em prática por Barthel e Orla Jensen. Atualmente é empregada principalmente nas análises bacteriológicas de leite. Com o auxílio desta prova é possível a obtenção de valiosos esclarecimentos sobre a riqueza em germes vivos presentes no produto em análise.

Essa prova consiste no descoramento, mais ou menos rápido, experimentado por uma solução de azul de metileno a 0,005 %. O descoramento mantém íntima interdependência com o número de germes vivos contidos no leite, ou no produto em análise. Quanto maior o número de bactérias e células vivas, menor o tempo gasto para o descoramento do reativo, isso porque um número maior de microorganismos vivos consome maior quantidade de oxigênio, à custa da redução do corante.

Como a prova da redutase é muito demorada, sendo necessário aguardar além de sete horas afim de comprovar as condições higiênicas do leite, procurou-se substituir o azul de metileno na prova da redutase, empregando o Resazurin por fornecer resultados muito mais rápidos. Os dados fornecidos com o emprego do Resazurin esclarecem a qualidade do leite em exame, tão bem quanto a prova com o azul metileno, sendo que, na Inglaterra, essa prova recebeu aprovação oficial. A redutase feita com o Resazurin, como foi verificado por nós, tem a vantagem de fornecer ao analista, em prazo de 60 minutos, os mesmos informes que se obtém com a solução de azul de metileno em 7 horas.

O Resazurin é sinônimo do Diazoresorcinol e tem como fórmula bruta $C_{12}H_7O_4N$.

(*) Trabalho aprovado pela Primeira Jornada Brasileira de Bromatologia, que recomendou a sua publicação.

Os vários autôres abaixo discriminados estudaram o valor da prova do Resazurin e pela leitura das conclusões dêstes trabalhos, é possível formar uma idéia do valor dessa prova, na classificação rápida da qualidade do leite em análise.

Assim, A. Ramsdell, Johnson¹, chegaram às seguintes conclusões: 1.º — É necessária sòmente 1 hora para completar a prova do Resazurin, enquanto a prova do azul de metileno requer um período de tempo acima de 5 horas. 2.º — Os leites podem ser classificados em 4 grupos, conforme a sua condição sanitária. 3.º — Leites de úberes doentes (mastites) e leites de vacas fisiològicamente anormais, tem efeito significativo na redução do Resazurin, e assim essa prova é de valor para esta verificação. 4.º — É possível obter consideráveis esclarecimentos sôbre a flora presente, observando as variações cromáticas que ocorrem durante o período de incubação na mistura leite-Resazurin.

Barret, Rutan e Keenan² observaram que: 1.º — Podem ser obtidos esclarecimentos sôbre a qualidade sanitária do leite, no período de 1 hora, com a prova do Resazurin, os quais são comparaveis aos obtidos em 7 horas, usando a prova do azul de metileno. 2.º — A prova do Resazurin tem grande valor, quando associada ao diagnóstico microscópico, diminuindo o tempo dispendido na determinação dos leites bons e permitindo desta maneira que se possam descobrir mais prontamente as causas de dúvida ou de dificuldade com relação aos leites ruins. 3.º — A prova do Resazurin é superior a do azul de metileno, porque é extremamente sensível nos leites anormais fisiològicamente ou patològicamente.

Warner³ verificou que a prova do Resazurin não oferece vantagens sôbre a prova azul do metileno, quando se toma como fim da reação o ponto branco, isto é, a redução completa.

Johns⁴ assim termina: quando a incubação a 37°C no leite resazurinado continúa até a côr rosa, a exatidão da prova compara-se muito favoravelmente à da prova feita com o azul de metileno.

Johns e Howson⁵ são de opinião que: o Resazurin é mais útil que o azul de metileno na determinação de leites contendo grande número de microorganismos, fracamente redutores.

Shacht e Nichols⁶, em seu relatório preliminar sôbre a prova do Resazurin, acham que: na rejeição dos rebanhos, em condições impróprias nas fazendas, a exatidão da prova Resazurin + coalho foi muito maior do que a obtida com as outras 4 provas usadas.

Golding e Jorgensen⁷ demonstraram que: 1.^o — Há estreita correlação entre os resultados do método *Standard* de contagem microbiana em placas e a prova do Resazurin. 2.^o — Os resultados obtidos com leites de várias procedências, são perfeitamente concordantes. 3.^o — Sob as condições citadas, a leitura em 60 minutos é a mais aconselhável e provavelmente a que fornece melhores resultados. 4.^o — Conhecendo a classe do leite, o produtor pode, por meio da prova do Resazurin, evidenciar a qualidade do mesmo.

E assim poderiam, ser ainda citados outros autôres, todos êles favoráveis à prova do Resazurin.

Baseados nas pesquisas citadas, resolvemos repetir essas verificações empregando a prova do Resazurin na Secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz, sob a orientação do Dr. Bruno Rangel Pestana, chefe da Subdivisão de Bromatologia e Química. Foram empregadas as técnicas seguintes:

TÉCNICAS

Para a prova da redutase com o azul de metileno, seguimos a técnica indicada pelo *Standard Methods for Milk Analysis* e para a do Resazurin, a que abaixo descrevemos:

Preparo da Solução de Resazurin. — 1.^o — Solução stock. — Pesar exatamente 0,05 g de Resazurin (Eastman Kodak Company) e transferir com os cuidados necessários, para um balão aferido de 100 ml, e completar com água destilada êsse volume. Depois de dissolvido o Resazurin, passar para outro balão de 150 ml e autoclavar a 120°C, 20 minutos. A solução empregada na prova é obtida fazendo a diluição de 1 ml dêsse soluto stock, em 9 ml de água destilada. Obtém-se assim um teor de 0,005% de Resazurin. Esta solução conserva-se muito bem.

Aparelhamento. — O material empregado consiste em um banho-maria regulável a 37°C, com estantes para os tubos de prova. Êstes tubos são calibrados e de 10 ml ou de 16 x 160 e tais tubos deverão ser previamente esterilizados e providos com rôlhas de borracha, afim de se fazer a inversão periódica cada 5 minutos.

Técnica. — Medir exatamente por meio de uma pipeta calibrada, 10 ml de leite e colocar no tubo calibrado ou tubo de 16 x 160; juntar, com os cuidados de assepsia, 1ml da solução de

Resazurin, colocando os tubos no banho-maria regulado a 37°C e anotar a hora. Fazer a inversão dos tubos de 5 em 5 minutos. A leitura da prova consiste nas mudanças de coloração do Resazurin em mistura com o leite, a medida que os microorganismos reduzem o corante, passando pelos seguintes tons:

1.º — Tom azul que significa ausência de alteração ou melhor, nenhuma redução sofrida pelo Resazurin.

2.º — Tom arroxeadado no início da redução, que em seguida passa ao roxo.

3.º — Tom rosa, que indica franca redução.

4.º — Tom branco, que significa o final da reação.

Essa mudança de tonalidade de côres é a principal característica informativa, pois é baseada nela que se avalia e se conclue sobre o valor e a qualidade do leite em exame.

O principal objetivo do nosso trabalho foi comparar a prova de 60 minutos de Resazurin com o tempo gasto na redutase pelo azul de metileno e depois confrontar as divergências observadas no resultado final.

Em 100 amostras por nós examinadas, empregamos as duas provas comparativamente, tendo verificado que a mudança de coloração dos leites resazurizados se processava em quase todos, num espaço de tempo que regulava em uma quarta parte do tempo necessário para a redução do azul de metileno. Em todos êsses leites foram feitos exames de contagem em placas, índice colimétrico e contagem pelo método de Breed, sendo anotados os leites em que a prova do azul de metileno se completou em menos de 4 horas. Assim, na verificação da qualidade do leite, pela prova do Resazurin, tomando-se como base o tempo de 1 hora para a conclusão, podemos classificá-lo da seguinte forma:

Nenhuma mudança de côr na solução de Resazurin	=	leite bom
Alteração da côr azul para roxa na solução do Resazurin	=	leite regular
Alteração da côr azul para rosa na solução do Resazurin	=	leite ruim
Alteração da côr azul para branca na solução do Resazurin	=	leite péssimo

Para fazer a classificação dos leites de pior qualidade, lêr as variações cromáticas dos tubos com leite resazurinado em espaço de tempo de 30 minutos, isto é, na metade da duração da prova, como acima foi dito, obedecendo-se ao mesmo critério, quanto à tonalidade das côres.

Segundo Schacht e Nichols, o critério a ser usado para a conclusão da prova e a classificação dos leites, poderá ser o seguinte:

1.º — Nenhuma mudança da côr azul original, depois de 1 hora de incubação = bom.

2.º — Nenhuma mudança da côr azul original, em 1/2 hora, porém mudança entre 1/2 e 1 hora = indiferente.

3.º — Mudança em menos de 1/2 hora da côr azul original para roxo, rosa ou branco — máu.

Essa conclusão, embora dê resultados satisfatórios, tem o inconveniente de necessitar o máximo da atenção do analista durante o período de incubação a 37°C. Segundo êsses autôres, a prova do Resazurin pôde ser feita com a adição de coalho à solução do corante, na proporção de 0,1 a 0,2 ml por 100, porém não notamos nos leites examinados, grandes vantagens na conclusão da prova, mesmo porque a solução do Resazurin + coalho, não se conserva por mais de uma hora. Julgamos pois, por economia de material, ser melhor para a análise a solução de Resazurin em água destilada, sem o coalho. A solução de Resazurin + coalho parece encurtar ligeiramente o tempo para a conclusão das provas.

RESULTADOS

As 100 amostras analisadas revelaram o seguinte:

Azul de metileno: 29 amostras reduziram em 30 minutos; 16 em 60 minutos; 8 em 90 minutos; 3 em 120; 4 em 150 minutos; 5 em 180; 5 em 210 minutos e 30 amostras reduziram acima de 4 horas de incubação.

Resazurin: Prova com 60 minutos de incubação: 38 amostras apresentaram o tom branco; 23 o tom rosa; 9 o tom roxo e 30 amostras a tonalidade azul original da solução do Resazurin.

Foram considerados péssimos, pela prova do azul de metileno, 56 leites, e pela prova do Resazurin 61. Com o azul de metileno, 14

leites foram considerados regulares, e 9 pelo Resazurin; 30 leites foram considerados bons por ambas as provas.

A avaliação revelou: 1.º — Com a prova do azul de metileno: que 56% dos leites eram ruins, que 14% eram regulares e que 30% eram bons; 2.º — Com a prova do Resazurin em 60 minutos: que 61% dos leites eram ruins, que 9% eram regulares e que 30% eram bons.

Por êsses resultados vemos que a prova do Resazurin fornece elementos para a classificação dos leites, pois nas 100 amostras analisadas, não houve sequer um resultado que não combinasse, muito aproximadamente com os resultados obtidos com o azul de metileno, considerando que para esta prova, foram regeitados como ruins 56 leites e tendo-se como base o tempo de redução inferior a 2 horas.

Quanto à prova do Resazurin, tomando-se como base a côr rosa para o tempo de 60 minutos, foram considerados péssimos ou ruins 61 leites. Trata-se de uma prova de fácil execução e largamente experimentada na Inglaterra e Estados Unidos e que têm sobretudo a grande vantagem de economizar tempo, pois a prova da redutase com o azul de metileno, embora seja uma prova de real valor, exige do analista observação por periodo dilatado, o que nem sempre é possível. Além do fator tempo, e o que é importante, o Resazurin é mais sensível nos leites oriundos de vacas anormais e possui maior sensibilidade frente aos microorganismos pouco redutores.

CONCLUSÕES E RESUMO

1.º) Empregando comparativamente o Resazurin e o azul de metileno na prova da redutase, foram examinadas 100 amostras de leite.

2.º) Com o emprêgo do Resazurin, foram encontrados os seguintes resultados: 61% de leites ruins, 9% regulares e 30% bons.

3.º) Com o emprêgo do azul de metileno os resultados foram os seguintes: 56% de leites ruins, 14% regulares e 30% bons.

4.º) O emprêgo do Resazurin como reativo na prova da redutase, torna-a muito mais rápida do que com o emprêgo do azul de metileno.

5.º) A prova do Resazurin é uma prova de fácil execução

6.º) O Resazurin é mais sensível aos microorganismos pouco redutores.

7.º) O emprêgo do Resazurin oferece maior facilidade na verificação do resultado, pois a mudança de coloração do Resazurin é mais evidente do que o limite do descoramento completo do azul de metileno.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — RAMSDELL, G. A. e JOHNSON, W. M. T. — 1935 — Investigations of Resazurin as an Indicator of the Sanitary Condition of Milk. *Journ. Dairy Sc.*, 18: 705.
- 2 — BARRET, W. D., RUTAN, H. e KEENAN, J. A. — 1937 — *Journ. Dairy Sc.*, 20:
- 3 — WARNER, J. N. — 1936 — The Use of Resazurin in Determining the Bacterial Quality of Milk and Cream. *Journ. Dairy Sc.* 21: 186.
- 4 — JOHNS, K. C. — 1939 — Place of the Methylene Blue and Resazurin Reduction Tests in a Milk Control Program. *A. Journ. Publ. Health.*, 3: 239.
- 5 — JOHNS, C. K. e HOWSON, R. K. — 1940 — Potentiometric, Studies with Resazurin and Methylene Blue in Milk. *Journ. Dairy Sc.*, 23: 295.
- 6 — SCHACHT, E. L. e NICHOLS, R. E. — 1941 — Studies of the Resazurin-Rennet Test — *Journ. Milk Technology*, 4: 281.
- 7 — GOLDING, N. S. e JORGENSEN, J. — 1945 — A Correlation of the Resazurin Grade with the Standard Plate Count of Raw Milk. *Journ. Milk Technology*, 8: 189.

ÍNDICE DE AUTORES

- ALMEIDA, Floriano de — Frequência de cogumelos na vagina e importância dêsse microorganismos como agentes de vulvovaginites, 149.
- ALMEIDA, Sílvio Soares — Eficiência dos meios de enriquecimento de Kauffmann e de Glicerina-Cloreto de sódio no isolamento da *Eberthella typhosa*, 97.
- ANDREUCCI, Domingos — Vide: ALMEIDA, Floriano de
- BARBOSA, Maria de Lourdes — Vide: DUARTE, Cordélia Nóbrega
- BARROS, Olga de — Vide: ALMEIDA, Floriano de
- BRITO E SILVA, Manoel de — Vide: SILVA, Manoel de Britto e
- BÜLLER SOUTO, Ariosto — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- CURBAN, Guilherme V. — Estudo morfológico e quantitativo do método de Halberg na coloração do Bacilo da lepra, 50.
- DUARTE, Cordélia Nóbrega — O problema do descoramento de bebidas e conexos, 122.
- FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR, J. B. — Vide: MENEZES JÚNIOR, J. B. Ferraz de
- GAMEIER, Zélia — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- GODOY, O. de — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- HIDAL, Fanny S. Tabacow — Colesterol. Da determinação em ovos e produtos que contém ovos, 139.
- LACAZ, Carlos da Silva — Vide: ALMEIDA, Floriano de
- LIMA, Emma de — Algumas notas sôbre a seleção de um meio de cultura para os germes do grupo "Lactobacillus", 132.
- LOPES NETO, José — Variações nas Fórmulas Leucocitárias, 204.
- MACEDO, Maria E. C. — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- MANIERO, Jordano — Uma nova madeira fóssil do Brasil meridional, 65.
- MARTINS, Hélio — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- MELO, Mário Sampaio — Caracteres organoléticos de alimentos e bebidas, 77.
- MENEZES JÚNIOR, J. B. Ferraz de — Investigações sôbre alterações da estrutura vegetal pela ação do calor, 183.
- MENEZES JÚNIOR, J. B. Ferraz de — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- MORENO, Maria Aparecida — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- NÓBREGA DUARTE, Cordélia — Vide: DUARTE, Cordélia Nóbrega
- PACHECO TRIGO, Amélia — Vide: TRIGO, Amélia Pacheco
- PUPU, Olga — Vide: SOUTO, Ariosto Büller
- RIBAS, José Carlos — Notas sôbre o cultivo do Meningococos. I — Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono, 193.
- RIBAS, José Carlos — Vide: SILVA, Manoel de Britto e
- SAMPAIO, Admar Vaz de — Contribuição para a dosagem do tanino nos vinhos, 107.
- SAMPAIO, Admar Vaz de — Considerações sôbre dados analíticos de bebidas em geral, 116.

- SAMPAIO MELO, Mário — Vide: MELO, Mário Sampaio
- SILVA LACAZ, Carlos da — Vide: LACAZ, Carlos da Silva
- SILVA, Manoel de Britto e — Notas sobre o cultivo do Meningococo. II —
Emprêgo do ácido paraminobenzóico, 221.
- SILVA, Manoel de Britto e — Vide: RIBAS, José Carlos
- SILVA, Theodósio M. P. da — Redutase e emprêgo do Resazurim nos exames
de leite, 228.
- SOARES DE ALMEIDA, Sílvio — Vide: ALMEIDA, Sílvio Soares de
- SOUTO, Ariosto Büller — Investigações microbiológicas sobre manteigas, 5.
- SOUTO, Ariosto Büller — Investigações microbiológicas sobre queijos, 13.
- SOUTO, Ariosto Büller — Investigações sobre métodos rápidos para diferen-
ciação dos microorganismos do grupo coliforme, 21.
- SOUTO, Ariosto Büller — Investigações microscópicas sobre manteigas, 28.
- TABACOW HIDAL, Fanny S. — Vide: HIDAL, Fanny S. Tabacow
- TIKER, Leão — Considerações sobre análises de whiskies, 215.
- TRIGO, Amélia Pacheco — Vide: ALMEIDA, Sílvio Soares de
- VAZ DE SAMPAIO, Admar — Vide SAMPAIO, Admar Vaz de

ÍNDICE DE ASSUNTO

Ação do calor. Investigações sobre alterações da estrutura vegetal pela	183	Considerações sobre análise de Whiskies	215
Ácido paraminobenzóico. Notas sobre o cultivo do Meningococo. II — Emprêgo do	221	Considerações sobre dados analíticos de bebidas em geral	116
Algumas notas sobre a seleção de um meio de cultura para os germes do grupo "Lactobacillus"	132	Contribuição para a dosagem do tanino nos vinhos	107
Alimentos e bebidas. Caracteres organoléticos de	77	Cultivo do Meningococo. I — Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono. Notas sobre o ...	193
Alterações da estrutura vegetal pela ação do calor. Investigações sobre	183	Cultivo do Meningococo. II — Emprêgo do ácido paraminobenzóico. Notas sobre o	221
Análises de whiskies. Considerações sobre	215	Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono. Notas sobre o cultivo do Meningococo	193
Atmosfera de dióxido de carbono. Notas sobre o cultivo do Meningococo. I — Cultura sob	193	Dados analíticos de bebidas em geral. Considerações sobre ...	116
Bacilo da lepra. Estudo morfológico e quantitativo do método de Halberg na coloração do	50	Descoramento de bebidas e conexos. O problema do	122
Bebidas. Caracteres organoléticos de alimentos e	77	Diferenciação dos microorganismos do grupo coliforme. Investigações sobre métodos rápidos para	21
Bebidas e conexos. O problema do descoramento de	122	Dióxido de carbono. Notas sobre o cultivo do Meningococo. I — Cultura sob atmosfera de ...	193
Bebidas em geral. Considerações sobre dados analíticos de	116	Dosagem do tanino nos vinhos. Contribuição para a	107
Calor. Investigações sobre alterações da estrutura vegetal pela ação do	183	<i>Eberthella typhosa</i> . Eficiência dos meios de enriquecimento de Kauffmann e de Glicerina-Cloreto de sódio no isolamento da	97
Caracteres organoléticos de alimentos e bebidas	77	Eficiência dos meios de enriquecimento de Kauffmann e de Glicerina-Cloreto de sódio no isolamento da <i>Eberthella typhosa</i> ..	97
Cogumelos na vagina e importância desses microorganismos como agentes de vulvovaginites. Frequência de	149	Emprêgo do ácido paraminobenzóico. Notas sobre o cultivo do Meningococo	221
Colesterol. Da determinação em ovos e produtos que contém ovos	139	Emprêgo do Resazurim nos exames de leite. Redutase e	228
Coloração do Bacilo da lepra. Estudo morfológico e quantitativo do método de Halberg na	50		

Estrutura vegetal pela ação do calor. Investigações sobre alterações da	183	Manteigas. Investigações microbiológicas sobre	5
Estudo morfológico e quantitativo do método de Halberg na coloração do bacilo da lepra	50	Manteigas. Investigações microscópicas sobre	28
Exames de leite. Redutase e emprêgo do Resazurim nos	228	Meio de cultura para os germes do grupo "Lactobacillus". Algumas notas sobre a seleção de um	132
Fórmulas leucocitárias. Variações nas	204	Meios de enriquecimento de Kauffmann e de Glicerina-Cloreto de sódio no isolamento da <i>Eberthella typhosa</i> . Eficiência dos	97
Frequência de cogumelos na vagina e importância desses microorganismos como agentes de vulvovaginites	149	Meningococos. I — Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono. Notas sobre o cultivo do	193
Germes do grupo "Lactobacillus". Algumas notas sobre a seleção de um meio de cultura para os Grupo coliforme. Investigações sobre métodos rápidos para diferenciação dos microorganismos do	132	Meningococo. II — Emprêgo do ácido paraminobenzóico. Notas sobre o cultivo do	221
Investigações sobre métodos rápidos para diferenciação dos microorganismos do grupo coliforme	21	Método de Halberg na coloração do bacilo da lepra. Estudo morfológico e quantitativo do	50
Investigações sobre métodos rápidos para diferenciação dos microorganismos do grupo coliforme	21	Métodos rápidos para diferenciação dos microorganismos do grupo coliforme. Investigações sobre	21
Investigações microbiológicas sobre manteigas	5	Microorganismos como agentes de vulvovaginites. Frequência de cogumelos na vagina e importância desses	149
Investigações microbiológicas sobre queijos	13	Microorganismos do grupo coliforme. Investigações sobre métodos rápidos para diferenciação dos	21
Investigações microscópicas sobre manteigas	28	Notas sobre o cultivo do Meningococo. I — Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono	193
Investigações sobre alterações da estrutura vegetal pela ação do calor	183	Notas sobre o cultivo do Meningococo. II — Emprêgo do ácido paraminobenzóico	221
Isolamento da <i>Eberthella typhosa</i> . Eficiência dos meios de enriquecimento de Kauffmann e de Glicerina-Cloreto de sódio no	97	O problema do descoloramento de bebidas e conexos	122
Lactobacillus. Algumas notas sobre a seleção de um meio de cultura para os germes do grupo	132	Ovos e produtos que contém ovos. Colesterol. Da determinação em	139
Leite. Redutase e emprêgo do Resazurim nos exames de	228	Produtos que contém ovos. Colesterol. Da determinação em ovos e	139
Lepra. Estudo morfológico e quantitativo do método de Halberg na coloração do bacilo da	50	Queijos. Investigações microbiológicas sobre	13
Madeira fóssil do Brasil meridional. Uma nova	65		

Redutase e emprêgo do Resazurim nos exames de leite	228	Variações nas fórmulas leucocitárias	204
Resazurim nos exames de leite. Reduta-se e emprêgo do	228	Vinhos. Contribuição para a dosagem do tanino nos	107
Tanino nos vinhos. Contribuição para a dosagem do	107	Vulvovaginites. Frequência de cogumelos na vagina e importância dêsses microorganismos como agentes de	149
Uma nova madeira fóssil do Brasil meridional	65	Whiskies. Considerações sobre análises de	215
Vagina e importância dêsses microorganismos como agentes de vulvovaginites. Frequência de cogumelos na	149		