

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA

VOL. 11 • 1951 • NÚMERO ÚNICO



SÃO PAULO — BRASIL

Fundador :

Diretor :

DR. J. P. DE CARVALHO LIMA DR. ARIOSTO BÜLLER SOUTO
(Diretor: 1941-1948)

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-Laboratório de Saúde Pública.

DR. ARIOSTO BÜLLER SOUTO

Avenida Dr. Arnaldo, 3

Caixa Postal 7027

São Paulo — Brasil

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA

VOL. 11 • 1951 • NÚMERO ÚNICO



SÃO PAULO — BRASIL

SUMÁRIO

FLORIANO DE ALMEIDA, C. HABERBECK BRANDÃO, E. LEMOS MONTEIRO e R. ALMEIDA MOURA — Flora micológica do ar. Sua significação e importância	5
J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR e BENTO AUGUSTO DE ALMEIDA BICUDO — Sôbre um método microscópico para contagem de cascas no café em pó	13
AUGUSTO DE E. TAUNAY — Bacteriologia das shigeloses	49
FLORIANO DE ALMEIDA, A. CARVALHO SILVA, C. HABERBECK BRANDÃO, E. LEMOS MONTEIRO e R. ALMEIDA MOURA — Ração alimentar purificada como fator de aparecimento de microsporia em gatos	103
CLEMENTINA AMATO e MARIA ELISA WHOLERS DE ALMEIDA — Determinação do Índice de Bellier em óleos vegetais; sua aplicação na dosagem de óleo de amendoim em misturas	107
PLÍNIO M. RODRIGUES e J. TRAVASSOS — Aplicação da reação de Bengtson ao diagnóstico das riquetsioses benignas em São Paulo	119
GERMÍNIO NAZÁRIO — Agentes acidulantes utilizados em alimentos	141
J. J. DE MACEDO, C. HABERBECK BRANDÃO e E. LEMOS MONTEIRO — Ação da aureomicina sôbre a febre experimental em cobaias. Sua atividade, após a adaptação à via parenteral, sôbre riquettsia isolada em São Paulo ..	159
CARLOS TOLEDO FLEURY E A. FRÂNCIA MARTINS — Meningite pneumocócica em nati-morto. (Nota prévia)	167

FLORA MICOLÓGICA DO AR. SUA SIGNIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA

por

FLORIANO DE ALMEIDA

Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

C. HABERBECK BRANDÃO

Do Instituto Adolfo Lutz

E. LEMOS MONTEIRO

Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

e da

Fundação Andréa e Virginia Matarazzo

R. ALMEIDA MOURA

Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

No estudo dos microrganismos em sua distribuição na natureza, merece especial atenção sua presença no ar atmosférico, ou nas poeiras em suspensão. É a presença dos microrganismos nesse elemento que chamamos flora do ar. Seu estudo compreende, naturalmente, a observação dos diferentes germes aí encontrados, bactérias e fungos. Interessa-nos apenas o estudo destes últimos. WOLF e WOLF (1947), referindo-se, em um capítulo de seu livro, à distribuição geográfica dos fungos, dizem que quem voltar a atenção para este assunto impressiona-se logo com o fato de que vastas porções da superfície da terra permanecem completamente inexploradas em relação aos fungos e, daí, serem literariamente *terrae incognitæ fungorum*.

A presença de fungos no ar está na dependência de vários fatores, tais como : lugar, época do ano, estado do ar, isto é, se sêco, úmido, ventoso, etc.

Por isso, para um seu eficiente estudo, deveríamos fazer verificações diárias, isto é, fazer, diariamente, uma coleta dos fungos do ar, para poder aquilatar sua variação. Além do mais, essa verificação deveria ser feita em pontos diversos de uma cidade e à mesma hora.

Na impossibilidade de uma tal observação, vimos fazendo apenas algumas coletas periódicas de poeiras do ar atmosférico da cidade de São Paulo. Em 1949 (agosto e setembro), fizemos duas coletas e, este ano (1950), já, por quatro vezes, fizemos coletas que nos proporcionaram dezenas de amostras de fungos que estamos estudando.

Daremos, mais adiante, uma relação das amostras já identificadas, bem como informações sobre outras em estudo.

Utilizamos, para as nossas coletas, o processo simplista das placas. Para isso, tomamos placas de Petri, com diâmetro de 10cm, mais ou menos,

e com meio de Sabouraud ou Czapek. Usamos, geralmente, só o primeiro, por economia de material. Essas placas são expostas, de 5 a 10 minutos, em locais diversos, porém em hora certa. Para isso, elas são, geralmente, entregues a estudantes de medicina, que se encarregam da colheita. As colônias que crescem são contadas e transplantadas para novos meios culturais, a fim de serem estudadas.

A distribuição de fungos no ar e em suas poeiras tem uma significação e importância que, facilmente, compreendemos. Os esporos dos fungos encontrados nesse elemento são, a todo instante, inalados. Sua penetração e implantação nas vias respiratórias está condicionada às defesas naturais que os organismos apresentam. A maioria dos fungos encontrados no ar pertence, porém, ao grupo dos que, comumente, não determinam infecções micóticas. Alguns esporos, ou mesmo formas vegetativas, no entanto, podem, quando encontram condições favoráveis, germinar, crescer e provocar perturbações várias na árvore respiratória. Tomemos como exemplo o que se observa na Califórnia, no vale do São Joaquim, onde, comumente, se isola, da poeira do ar ou do solo (terra), um fungo: o *Coccidioides immitis*, causador, não raro, de uma grave enfermidade, a coccidioidomicose. Mais vezes, porém, como foi recentemente observado, esse fungo, penetrando nos pulmões, aí determina um quadro clínico relativamente benigno. Simula uma gripe, com duração de uma dezena de dias, mais ou menos, que pode deixar uma seqüela, traduzida, freqüentemente, por nódulos de calcificação pulmonar, inteiramente semelhantes àqueles provocados pela tuberculose. Sua distinção só é possível mediante exames de laboratório que evidenciem o respectivo agente etiológico. Durante a última guerra, registraram-se, em campos de aviação da costa da Califórnia, mais de 6.000 casos dessa forma benigna de coccidioidomicose.

Outro exemplo, mais recente, encontramos ainda nos Estados Unidos: um outro fungo está sendo considerado, também, como causador de nódulos de calcificação pulmonar, em percentagem bastante elevada. É por inalação que este fungo, o *Histoplasma capsulatum*, penetra nos pulmões. É no vale do Mississipi que ele tem sua sede principal, pois é dessa região a maioria dos casos já observados. Por não termos ainda dados nacionais, lançamos mão destes 2 exemplos estrangeiros, pelos quais podemos avaliar a significação e a importância do estudo da flora micológica do ar, na determinação de micoses. Podemos, no entanto, acenar com um fungo, o *Paracoccidioides brasiliensis*, que tem sido, com certa freqüência, ultimamente encontrado, em lesão primária, nos pulmões. Faltam-nos, porém, dados precisos, para dizermos que ele existe nas poeiras de determinadas regiões.

Um outro capítulo, muito interessante e de grande atualidade, é o da alergia aos fungos. Nêle se enquadra, como forma mais importante, a asma fúngica, ou asma bronquial, assim chamada por CAVALLERO (1947), forma essa que tem o seu agente sensibilizante específico em um produto fúngico. Já, há muitos anos, alguns autores verificaram a existência de asmáticos sensíveis às poeiras das casas. Ora, diz aquele autor, se tivermos presente que os esporos fúngicos entram como constituintes normais de tais poeiras, onde são contidos às vezes em alta percentagem, devemos pensar que aqueles casos de hipersensibilidade às poeiras das casas, na realidade, sejam casos de hipersensibilidade aos esporos fúngicos e, mais especialmente, àqueles encontrados com freqüência nos ambientes habitados.

Com essa finalidade, pareceu-nos também interessante estudar a flora do ar ou das poeiras da cidade de São Paulo. Esse será, porém, assunto de outro trabalho, que, oportunamente, tornaremos público. Agora, diremos apenas que, pelos dados que temos da literatura especializada, os fungos observados em outros países diferem um pouco daqueles que vimos encontrando nesta cidade, o que é perfeitamente razoável, pois pertencem êles ao reino vegetal e, assim sendo, obedecem a condições várias de vida.

É assim que certos gêneros, freqüentes nos Estados Unidos, só esporadicamente têm sido aqui encontrados. No livro de WOLF e WOLF, intitulado "Fungi", publicado em 1947 e há pouco mencionado, encontramos referência a uma coleta, semelhante à que temos feito e realizada por Rittenberg, em 1939, em um cruzeiro marítimo. Encontrou êste autor fungos terrestres tais como *Alternaria*, *Catenularia*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Sporotrichum*, *Stemphylium* e *Trichoderma*, alguns dêles também por nós encontrados em São Paulo.

Podemos ainda julgar a **importância do estudo da flora do ar** voltando nossa atenção para o lado dos alimentos e produtos alimentícios, quando em contacto com as poeiras atmosféricas, em certos momentos carregadas de esporos fúngicos. A êste propósito, é interessante citar uma observação feita, nos Estados Unidos, por PRINCE e MORROW (1937), que, em certa região da costa do Texas, em 24 horas, colheram, em 1m³ de ar, 2.688 esporos de fungos.

Entre os mais abundantes, estavam *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Hormodendrum*, *Helminthosporium*, *Monilia* e *Cladosporium*.

Isto não é para se admirar, porquanto, no estudo que estamos fazendo sobre flora micológica do café, graças à preciosa colaboração do Sr. Bento de Almeida Bicudo, da Superintendência do Café, tivemos oportunidade de encontrar cerca de 750 colônias de fungos, em uma placa aberta no terreiro de uma fazenda de café, no interior do Estado. Teóricamente, cada colônia deveria se originar de um esporo. Assim sendo, se tivessemos colhido os esporos em 1m³ de ar, teríamos, certamente, número muito mais elevado, pois que a placa apenas foi aberta durante 10 minutos e nela apenas caíram os esporos contidos em espaço correspondente a seu diâmetro.

Se a maioria dos fungos, que isolamos comumente do ar, é de natureza saprofitica, isto é, não provocadores de doenças, não raro são alguns dêles dotados de propriedades biológicas diversas, mormente a de fermentação dos hidratos de carbono, e também da utilização completa dos açúcares para a respiração, fenômeno êste que Langeron e Guerra denominaram **elektion** e que, no desconhecimento de um termo adequado, nós dizemos **eleikção**. Dessa maneira, embora não patogênicos, êles podem alterar os alimentos e, com isso, causar distúrbios diversos, entre os quais, fenômenos tóxicos.

Quando não agem sobre os alimentos, antes da ingestão, podem, como micróbios da flora de passagem do intestino, provocar, aí, alterações como fermentações ou desintegrações alimentares diversas, que causarão, não raro, sérios prejuízos ao seu hospedeiro.

Em qualquer ocasião que seja, os fungos, quando encontrados em certos produtos, deverão ser considerados como índice de uma técnica incorreta empregada pelos fabricantes ou industriais, ou ainda como falha ou

deficiência das condições higiênicas locais. Por essa razão, achamos que o policiamento sanitário não deve ser condicionado, unicamente, a questões de cubagem de ar, ladrilhos, azulejos, mas sim que deve ser criado um serviço orientador, ou ainda de assistência técnica, que, ao lado das exigências atuais, terá outras, com finalidade orientadora e de colaboração, como é o caso de fornecimento de técnicas modernas, fermentos selecionados, etc.

Dissemos, há pouco, que os fungos podem agir sobre certos produtos ou alimentos e determinar fenômenos de intoxicação intestinal ou outras perturbações. A propósito de alteração de produto ou substância de uso, por ação de fungos, Conant, Wagner e Rackmann, citados por CAVALLERO (1947), estudaram o caso de indivíduo asmático, que era sensível, unicamente, ao **Kapock** envelhecido e contaminado por fungos. (**Kapock** é material usado, principalmente nos Estados Unidos, para confecção de colchões e travesseiros.) Isoladamente, tanto o extrato de **Kapock** fresco ou esterilizado, como os fungos que nele se encontravam eram incapazes de provocar reação no indivíduo sensível. Concluíram os autores que o princípio ativo sensibilizante resultava da ação recíproca e interferente dos dois fatores.

Referindo-se ainda à asma fúngica, diz CAVALLERO (1947) que a via seguida pelos antígenos sensibilizantes é, geralmente, a aérea; trata-se, portanto, quase sempre, de asma por inalação. Embora rara, a asma por ingestão já tem sido observada, como é o caso de Traut, ainda referido por CAVALLERO (1947). Sabemos que há também um caso semelhante observado em São Paulo. O trabalho em ambiente contaminado permite-nos considerar a profissão como fator importante na determinação da asma fúngica. Longe iríamos se quiséssemos estudar os fungos do ar como causas de micoses. Assinalaremos apenas os casos referidos por TOWEL, SWANBY e HURON (1932), que observaram uma típica forma pulmonar, de natureza profissional, em 35 indivíduos que trabalhavam como lenhadores e que se tornaram sensíveis a um fungo, o *Anisporium*.

Em recente trabalho, M. BLANCO (1950), na Argentina, fez um interessante estudo sobre as broncopneumopatias micóticas, apresentando alguns casos clínicos bem documentados. Essas formas de micoses constituem já, naquele país, um assunto que interessa o Ministério do Trabalho. São consideradas micoses profissionais e seus portadores, em alguns casos, recebem indenizações, por se tornarem impossibilitados para certas profissões.

NEGRONI e FISHER (1942), na Argentina, realizaram estudos sobre a flora do ar da cidade de Buenos Aires e arredores, assim como sobre a flora micológica alergógena do Delta do Paraná (1941). Embora não tenham tirado conclusões definitivas sobre a frequência dos diversos fungos durante as estações do ano, notaram, no entanto, uma maior frequência de *Penicillium* e *Cladosporium* (*Hormodendrum*) no inverno e primavera (julho a outubro), ao passo que, durante a primavera e verão (agosto a janeiro), predominavam *Aspergillus* e *Alternaria*.

Em nossas últimas verificações, até o momento em número de 5, sendo que duas reunidas em uma, e em várias épocas, encontramos, como fungo predominante, o *Cladosporium* (*Hormodendrum*), que nem uma só vez deixou de figurar.

Vejam, resumidamente, a distribuição que encontramos em nossa 1.^a coleta, feita nos seguintes bairros, no mês de agosto de 1949 (fim de inverno) :

Aclimação — Barra Funda — Canindé — Indianópolis — Sumaré (Faculdade) — Lapa — Pinheiros — Vila Mariana — Vila Pompéia.

A coleta consistiu em abrir uma placa com meio de Sabouraud, durante 5 minutos, em hora e dia determinados.

Encontramos, nesses 9 bairros, os seguintes gêneros :

Cladosporium em todos. Em algumas placas encontramos colônias do grupo *Cladosporium* e de outros, com aspectos diversos, possivelmente espécies diferentes.

Penicillium em 5 bairros.

Aspergillus em 2.

Leadura em 8, na maioria do gênero *Candida*

Leadura do grupo *Rhodotorula* em 7.

Cephalosporium em 2.

Fusarium em 1.

Torula em 3.

Rhizopus em 2.

Mucor em 1.

Numerosos fungos imperfeitos e alguns ainda não identificados foram também isolados.

A 2.^a coleta foi feita em fins de setembro, início da primavera, nos seguintes bairros e com os resultados adiante anotados :

Bela Vista — Brás — Cambuci — Cidade — Jaçanã — Higienópolis — Jardim Paulista — Paraíso — Vila Clementino — Sumaré (Faculdade) — Consolação.

Cladosporium 11 vezes, isto é, em todos os bairros. Obtivemos, também nesta vez, não raro, várias colônias de espécies diferentes na mesma placa.

Penicillium 8 vezes. Também várias espécies.

Leadura 6 vezes, mormente do gênero *Candida*.

Leadura do grupo *Rhodotorula* 7 vezes.

Aspergillus 2 vezes.

Torula 3 vezes.

Chaetomium 1 vez.

Numerosos outros não identificados.

A 3.^a coleta foi esta em março de 1950, fins de verão, em diversos bairros e com os resultados adiante anotados. Desta vez, colaboraram conosco, além de estudantes de Medicina, também alunas de Enfermagem Obstétrica, sendo feitas duas coletas em uma mesma semana, razão porque consideramos como uma só.

Itaim — Sumaré (Faculdade) — Lapa — Paraíso — Parí — Perdizes — Santana — Carandirú — Pinheiros — Jabaquara (São Judas) — Santa Cecília — Campos Elíseos — Belém — Brás — Brooklin — Vila Deodoro — Vila Guilherme — Tatuapé — Ponte Pequena. Além desses bairros, obtivemos material de Mogí das Cruzes e São Miguel, localidades próximas à Capital.

Cladosporium 18 vezes.
Penicillium 18 vezes.
Aspergillus 10 vezes.
 Levedura 10 vezes.
 Levedura do grupo *Rhodotorula* 6 vezes.
Stemphylium 1 vez.
Cephalosporium 3 vezes.
Torula 3 vezes.
Trichotecium 1 vez.
Fusarium 1 vez.
Hemispora 2 vezes.

Nesta verificação, isolamos, em 3 bairros diferentes, uma bactéria que apresentava, nas placas, uma leve ação inibitória sobre alguns fungos. Esse germe está isolado e será, oportunamente, estudado.

Uma 4.^a verificação foi feita no dia 6 de maio de 1950, durante o outono, nos seguintes bairros :

Sumaré (Faculdade) — Barra Funda — Mercado — Campos Elíseos — Santa Cecília — Cambucí — Santana — Jardim América — Tucuruví — Brás — Paraíso.

Foram encontrados os seguintes gêneros :

Cladosporium 8 vezes.
Aspergillus 3 vezes.
Penicillium 9 vezes.
Rhodotorula 5 vezes.
Actinomyces 1 vez.
Torula 5 vezes.
Rhizopus 3 vezes.
Hemispora 2 vezes.
Fusarium 1 vez.
 Levedura 2 vezes.

Pelo exposto, vemos que há um gênero, *Cladosporium* (*Hormodendrum*), que foi sempre encontrado e em qualquer época. Em observações anteriormente feitas, esse gênero esteve sempre presente.

Uma análise bibliográfica do assunto nos mostra que, nos Estados Unidos e na Argentina, há um fungo freqüentemente observado no ar, a *Alternaria*, que nós, nestas últimas verificações, não encontramos.

Isolamos, várias vêzes, amostras do gênero *Hemispora*, espécie *stellata* que, como sabemos, é um dos produtores de micoses gomosas. Do mesmo modo, isolamos, freqüentemente, amostras de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos que, comumente, são incriminados como provocadores de asma.

Neste trabalho, não pretendemos tirar conclusões, mas sim despertar a atenção dos estudiosos para a importância dos cogumelos contidos nas poeiras do ar. Com a continuação de nossas pesquisas, é possível que, oportunamente, cheguemos a alguma conclusão.

RESUMO

Neste trabalho, os autores analisam algumas verificações feitas por pesquisadores estrangeiros sobre a presença de fungos no ar atmosférico, em diferentes regiões. Chamam a atenção para a importância que tal estudo representa, mormente em relação ao encontro de certos fungos que determinam micoses pulmonares. Assinalam ainda o papel que os fungos do ar representam nas manifestações alérgicas pulmonares e também, de modo particular, na contaminação de alimentos.

Apresentam, a seguir, alguns resultados obtidos em algumas verificações feitas na cidade de São Paulo.

SUMMARY

In this paper, the authors analyse some experiences made by foreign research workers about the presence of fungi in the air in different regions. They call attention to the importance of such a study, especially with reference to the finding of certain fungi which determine pulmonary mycosis. They also show the role which the fungi of the air play in allergic pulmonary manifestations as well as food contaminations.

Some results which were obtained in certain verifications made in the city of São Paulo are related.

RÉSUMÉ

Les auteurs analysent quelques vérifications faites par des chercheurs étrangers sur la présence de champignons dans l'air atmosphérique en différentes régions. Ils démontrent l'importance que cette étude représente principalement en relation à la présence de certains champignons qui déterminent des mycoses pulmonaires. Ils désignent encore le rôle des champignons dans les manifestations allergiques pulmonaires et aussi, de façon particulière, dans la contamination des aliments.

Ensuite, ils montrent quelques résultats obtenus en certaines vérifications faites dans la Capitale de São Paulo.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, F. e C. FAVA NETO — 1947 — Observações sobre a flora micológica do ar na cidade de São Paulo. *Fichário Médico-Terapêutico "Labofarma"* 9 (36) : 1-3.
- BLANCO, M. — Bronconeumopatias micóticas (Seudotuberculosis) em los obreros de la industria textil. Buenos Aires, Lopez & Etchegoyen, S. R. L., 1950.
- CAVALLEIRO, C. — 1947 — L'allergia e l'immunità nelle micosi. *Mycopathologia* 4 (1) : 1-24.
- NEGRONI, P. e I. FISHER — 1941 — Contribución al conocimiento de la flora micológica (microfitos) del Delta del Paraná. *Rev. Inst. Bact. Dep. Nac. Hig.* 10 (30) : 334-342.
- NEGRONI, P. e I. FISHER — 1942 — Flora micológica del aire en Buenos Aires y sus alrededores. Contribución al conocimiento de la flora alergogena. *Rev. Inst. Bact. "Dr. Carlos G. Malbran"* 11 (2) : 228-242.
- NEGRONI, P. e I. FISHER — 1943 — Contribución al conocimiento de la flora alergogena. *La Prensa Medica Argentina* 30 (36) : 3-15.
- PRINCE, HOMER E. e MARIE BETZNER MORROW — 1937 — Molds in the etiology of asthma and hay fever with special reference to the coastal areas of Texas. *Southern Med. J.* 30 : 754-762.
- TOWEL, JOHN W., HENRY C. SWEANY e WILLIS H. HURON — 1932 — Severe bronchia asthma apparently due to fungus spores found in mapple bark. *J. A. M. A.* 99 (6) : 453-459.
- WOLF, F. A. e F. T. WOLF — The Fungi. New York, John Wiley & Sons, 1947 ; 2 : 395-415.

SÔBRE UM MÉTODO MICROSCÓPICO PARA CONTAGEM DE CASCAS NO CAFÉ EM PÓ

por

J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR
do Instituto Adolfo Lutz

e

BENTO AUGUSTO DE ALMEIDA BICUDO
da Superintendência dos Serviços do Café

I N T R O D U Ç Ã O

Com a apresentação dêste método microscópico de contagem de cascas no café em pó, foi nosso único desejo contribuir para a eliminação de uma fraude, tornada, dia a dia, mais intensa, dissimulada e imperceptível, muitas vêzes, pelas condições favoráveis de semelhança dos componentes do pó e, principalmente, pela falta de um processo capaz de avaliar a proporção existente na mistura.

Pelos recursos usuais da técnica microscópica, a presença da casca, como, aliás, de toda e qualquer substância estranha juntada ao pó de café, sempre foi revelada com facilidade e precisão.

Todavia, a sua proporção, avaliada por método comparativo, como até então era feita, não satisfazia plenamente os requisitos necessários à elucidação da análise, porquanto as designações adotadas **raros, alguns, pequena e grande quantidade** de elementos da casca não forneciam meios seguros à aplicação das penalidades legais, nem tão pouco podiam marcar um limite de tolerância que, por princípio, devia existir.

Quando examinamos microscopicamente uma amostra de café em pó, devemos estar previamente orientados pelos seus caracteres organoléuticos, porque uma quantidade apreciável de elementos da casca modifica, sensivelmente, o aspecto e o aroma do café puro, permitindo, à vista desarmada, ser notada a fraude.

O mesmo não acontece quando a quantidade desses elementos é pouco elevada e o grau de torração e de moagem são idênticos aos do café.

O presente trabalho foi publicado sob forma de monografia pela Superintendência dos Serviços do Café em 1950 e entregue para publicação na Revista do Instituto Adolpho Lutz em 5 de junho de 1951, depois de revisto e ampliado.

A côr do pó, castanho-avermelhada ou pardo-escuro, e a característica principal de estar pulverizado e ser oleoso contribuem para que as partículas de cascas não sejam notadas, mesmo porque estas partículas estão sempre recobertas pela porção mais fina do pó.

Neste caso, somente pelo exame de lupa poderá ser constatada a presença das partículas maiores da casca, sabendo-se, entretanto, que, sem um tratamento especial do pó, esta operação requer muita perícia e só é adquirida depois de algum exercício e observação.

Este fato representava, de há muito, uma grande falha no resultado do exame microscópico do café torrado e moído, principalmente do ponto de vista conclusivo da análise, por não poder estimar a porcentagem de casca presente na amostra.

Foi então que, com o seu espírito disciplinado, dinâmico e empreendedor de verdadeiro cientista, o Dr. Bruno Rangel Pestana, Chefe da Sub-Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolpho Lutz, solicitou, da parte do primeiro dos autores deste trabalho, a dedicação pelo estudo de um método microscópico que nos levasse à possibilidade de dar, ao menos aproximadamente, a quantidade de casca existente no café em pó.

Em 1948, iniciaram-se os ensaios, tendo-se chegado, após longos meses de tentativas, à feliz certeza de se poder alcançar a meta desejada.

Por vários motivos de ordem técnica, foram êsses trabalhos interrompidos para serem reiniciados mais tarde, em 1949, sem, entretanto, poder-se chegar à esperada conclusão, por falta de material adequado e estritamente necessário à orientação de estudos dessa natureza.

Tendo vindo estagiar, nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, os funcionários da Superintendência dos Serviços do Café Bento Augusto de Almeida Bicudo, na Secção de Microscopia Alimentar, e Raul de Almeida Pereira, na Secção de Química, em janeiro do corrente ano, foi então possível, depois de alguns meses de experimentações, dar por terminado o método que ora publicamos, tão grande e geral foi o interesse despertado no sentido de sua pronta realização.

Queremos deixar aqui os mais sinceros agradecimentos a êsses funcionários amigos e a todos que, de um modo ou de outro, nos prestaram valiosa colaboração e, em particular, a Bento Augusto de Almeida Bicudo, que é também autor deste trabalho, pela gentileza da preparação de inúmeras amostras que se fizeram necessárias ao esclarecimento dos múltiplos detalhes do processo, bem como pela dedicação com que se entregou à contagem de numerosas amostras que fazem parte do quadro demonstrativo das observações que possibilitaram precisar a segurança do método por nós ideado.

À Superintendência dos Serviços do Café, na pessoa de seu muito digno gerente Dr. Pedro de Siqueira Campos, a expressão mais fiel do nosso reconhecimento, pela feliz iniciativa do intercâmbio técnico-científico com o Instituto Adolfo Lutz, que permitiu a concretização do nosso ideal, e

pela atenção e solicitude com que atendeu ao nosso apêlo, franqueando o fornecimento de vasto material de que constaram as mais intrincadas amostras que conduziram, orientaram e abreviaram nossas investigações.

Ao Dr. Bruno Rangel Pestana, o nosso cordial agradecimento pelo verdadeiro interêsse e entusiasmo com que acompanhou as várias etapas de experimentações, proporcionando-nos todos os meios ao seu alcance, para o pleno êxito desta empreitada.

O nosso sincero "muito obrigado" à distinta colega D. Ana Gomes, pela gentileza com que procedeu às rigorosas pesadas de tôdas as amostras analisadas, e ao sr. Antônio Hércules Florence, pelos vários e excelentes desenhos de quadros padrões que se tornaram indispensáveis, no decorrer de nossos ensaios.

O presente trabalho está dividido nas seguintes partes :

- 1) Morfologia do fruto e da semente do café
- 2) Estrutura microscópica
- 3) Caracteres histológicos do pó de café
- 4) Caracteres morfológicos do pó de café
- 5) Exame microscópico do pó de café
- 6) Princípio do método
- 7) Tomada da amostra e descoramento
- 8) Calibração dos retículos
- 9) Técnica para contagem
- 10) Parte experimental
- 11) Discussão
- 12) Conclusão
- 13) Resumo
- 14) Bibliografia.



MORFOLOGIA DO FRUTO E DA SEMENTE DO CAFÉ

O fruto do café é uma drupa carnosa, de forma ovóide ou oblonga, na espécie *arabica* e globosa, quase esférica, na *liberica*.

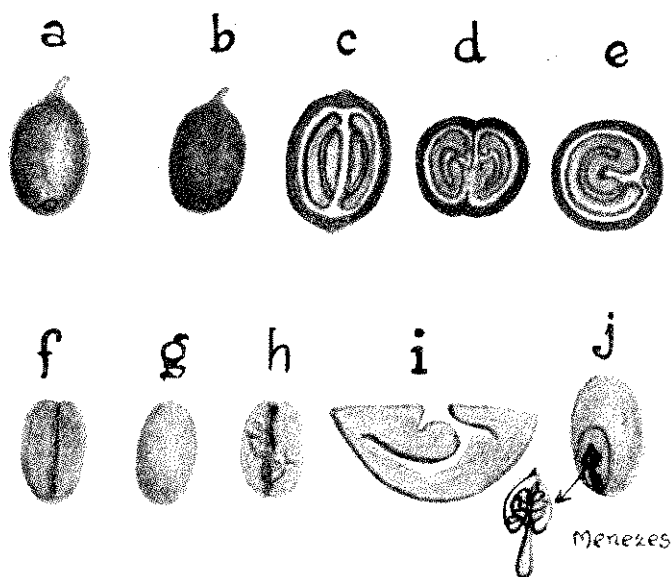


Fig. 1 — Caracteres morfológicos do café :

- a — fruto maduro (cereja) ;
- b — fruto sêco (côco) ;
- c — corte longitudinal do fruto ;
- d — corte transversal do fruto ;
- e — fruto com uma semente (corte transversal) ;
- f — semente envolta pelo endocarpo (marinheiro) ;
- g — semente desprovida dos envoltórios (face dorsal) ;
- h — semente com vestígios da película ou espermoderma (face ventral) ;
- i — corte transversal da semente aumentado (fenda e pregas) ;
- j — semente mostrando cotilédone e radícula.

Quando maduro (café em cereja, fig. 1-a), exhibe uma côr vermelha ou carmesim e possui superfície lisa e brilhante, que se torna rugosa e enegrecida quando o fruto está sêco (café em côco, fig. 1-b).

É curtamente pedunculado e apresenta, na extremidade, uma cicatriz em forma de corôa, procedente do disco epigino do ovário.

O pericarpo, carnudo, de pequena espessura, é constituído pela casca do café. Esta se separa em duas partes distintas: uma, externa, de côr pardo-negra, polpuda, que é representada pelo conjunto do epicarpo e mesocarpo, e outra, interna, levemente corada, de aspecto pergaminoso, dura e fina, recobrando as sementes. Esta camada, conhecida pelo nome de marinho, é o endocarpo (fig. 1-c-d-e-f).

Em alguns frutos, há uma única semente (café ervilha ou café moka), devido ao desenvolvimento de um só óvulo e à atrofia de uma das lojas, como se pode notar em secção transversal do fruto (fig. 1-e).

São conhecidas variedades de café cujos frutos diferem na côr (amarela, vermelha, alaranjada), no tamanho e no número de sementes, as quais podem atingir a oito (var. polisperma Burek).

Cada fruto contém, geralmente, duas sementes, convexas sobre o dorso e planas na parte ventral por onde se unem, apresentando cada semente uma fenda longitudinal proveniente do enrolamento do grão sobre si mesmo, ao formar as pregas (fig. 1-c-d-h-i). Quando crua, a semente possui albume córneo, de côr que varia de verde-claro a amarelo-pálido e seu odor é fraco e suave.

Submetida à torração, torna-se friável, quebradiça, de côr pardo-avermelhada e adquire odor fortemente aromático, agradável e *sui-generis*.

A semente é revestida, em tôda sua superfície, por uma película prateada, excessivamente fina e aderente, que não é encontrada externamente nos cafés beneficiados, mas persiste no interior da fenda e das pregas (fig. 1-h). Esta película é o espermoderma.

A maior parte da semente é constituída pelo endosperma, possui embrião alongado, radícula ínfera e cotilédones foliáceos e cordiformes (fig. 1-i-j).

Alguns autores, como Houck, Youngken e Winton, baseados em recentes estudos sobre o desenvolvimento do óvulo, persistem em afirmar que a região da semente comumente chamada **endosperma**, pela maioria dos farmacognostas, não é senão o **perisperma**, por ser êste tecido formado pela nucela.

ESTRUTURA MICROSCÓPICA DO CAFÉ

É a parte mais importante na investigação microscópica do café em pó, porquanto a histologia, característica para cada substância examinada, conduz o analista à sua imediata identificação, podendo constatar o gráu de pureza do produto ou a presença dos elementos estranhos que constituem uma fraude.

Em corte transversal, a cereja do café apresenta as seguintes camadas, observadas na fig. 2:

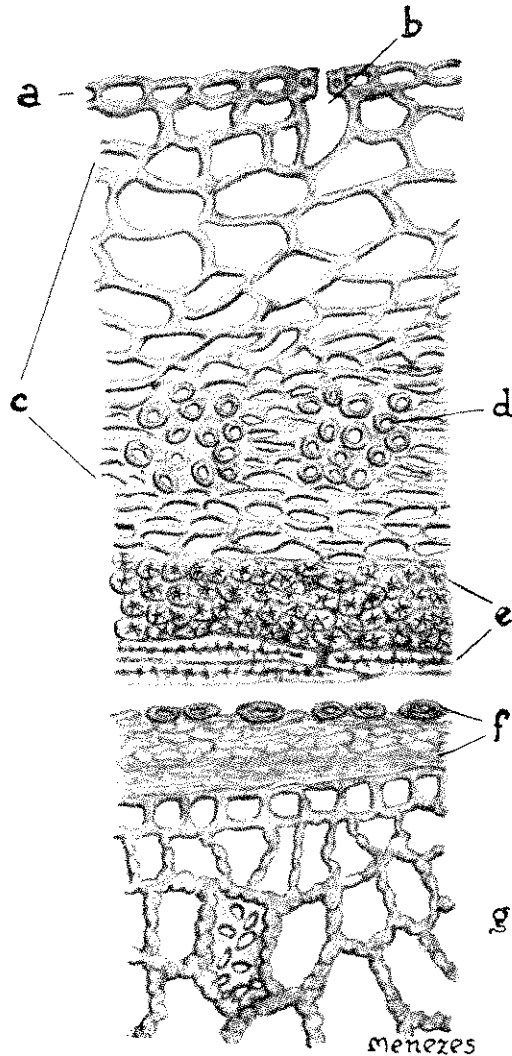


Fig. 2 — Corte transversal do fruto — 400 × (original)

Epicarpo (a) — constituído de células poligonais, pequenas, encerrando conteúdo pardo e estômatos (b).

Mesocarpo (c) — com células poligonais, grandes, irregulares, também com conteúdo pardo e que, à proporção que se aproximam da parte interna, vão se deformando, achatando e se tornando cada vez menores. Na parte mais central do mesocarpo, entre as células desordenadas, correm feixes fibro-vasculares (d).

Endocarpo (e) — apresentando duas fileiras de fibras, uma transversal e outra longitudinal, de cor acinzentada, na casca crua, e pardo-avermelhada, quando torrada. A resistência desta camada do pericarpo à trituração é devida a esta disposição original das fibras.

Espermoderma (f) — é a película prateada, aderente à semente; compõe-se de células esclerenquimáticas ou fibras características, bastante longas, na região dorsal da semente, menos longas, na parte ventral ou plana, e irregulares, largas, dispostas em várias direções, na porção enrugada que se acumula na fenda. Estas fibras estão assentadas sobre uma fina membrana, composta de um parênquima de células de paredes estreitas, alongadas longitudinalmente, de pequenas dimensões, e de uma camada de células compressadas, alongadas transversalmente, situadas mais abaixo.

Endosperma (g) — formado de um tecido elástico e córneo, constituído por células poliédricas ou isodiamétricas, cujas paredes, celulósicas, se tornam mais grossas e nodosas da periferia para a parte central da semente. Estas células são volumosas e estão constituídas, no grão cru, por numerosas gotas oleosas e por uma substância mal definida, contendo proteína, açúcares redutores, tanino, cafeína, ácido oxálico, etc. A torração não modifica, em absoluto, a estrutura microscópica do café; seus elementos histológicos continuam inalteráveis, adquirindo, excepcionalmente, uma cor pardo-avermelhada, que é mais intensa em determinados parênquimas. Transformação sensível se passa na natureza física do grão, que é córneo e elástico, quando cru, e sensivelmente quebradiço, quando torrado, e, principalmente, na composição química, em que certas substâncias presentes são consideradas como produtos da torração.

CARACTERES HISTOLÓGICOS DO PÓ DE CAFÉ

Examinado ao microscópio, com grande aumento (400 x), o pó de café não deve ser constituído senão pelos dois únicos elementos seguintes (fig. 3):

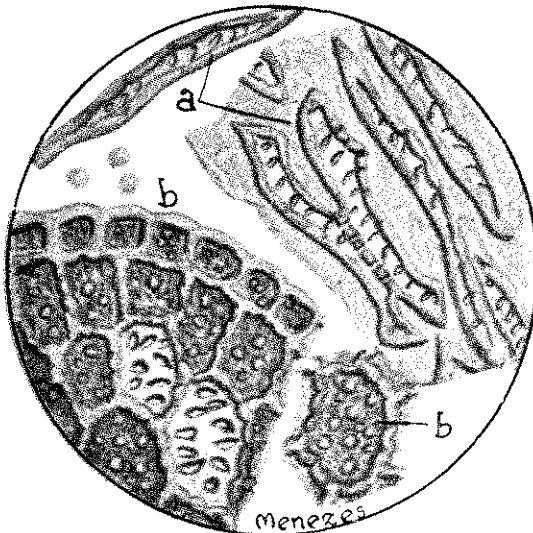


FIG. 3 — Elementos histológicos da semente — 400 X (original).

Espermoderma (a) — constituído de fibras alongadas fusiformes, de paredes grossas, levemente caniculadas, de lume bem aberto, apresentando uma cor amarelo-clara e uma série de poros oblíquos, bem distintos, no sentido de seu comprimento. Apresentam-se em grupos, deixando ver, por entre os pequenos espaços formados, a epiderme inferior, transparente, cujos detalhes da delicada estrutura sômente serão realçados pela adição de uma gota de soluto de hidróxido de potássio a 10% à preparação. As fibras mais longas atingem 300 μ de comprimento por 30 ou 40 μ de largura e as irregulares apresentam dilatações muito maiores, trazendo, sempre, os característicos poros oblíquos, de grande importância analítica.

Endosperma (b) — as células da periferia são quase cúbicas, muito menores que as da parte interna do grão, cujas paredes, grossas e nodosas, dão-lhes um contôrno poliédrico ou isodiamétrico. Estas células apresentam um conteúdo pardacento, entremeado por gôtas oleosas e, em algumas, vasias, podem ser notados poros grandes e pequenos, redondos ou estirados. Suas paredes são ligeiramente amareladas e atingem, facilmente, a espessura de 6 μ ; são de natureza celulósica, corando em azul pelo cloriodeto de zinco.

A presença de elementos da casca no café em pó é um índice de contaminação ou de fraude. A fig. 4 mostra a estrutura microscópica da casca de café, torrada e moída, decolorada pelo soluto de hipoclorito de sódio e observada de superfície, em preparação aquosa, com aumento de 400 diâmetros :

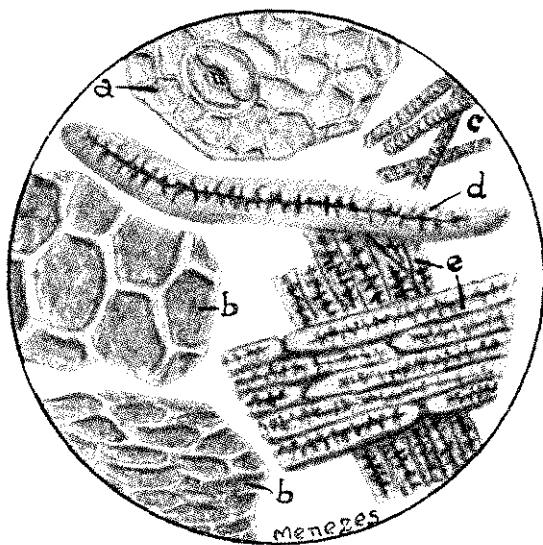


FIG. 4 — Elementos histológicos da casca — 400 \times (original)

Epicarpo (a) — constituído de células poligonais de pequenas dimensões, de cor pardo-escura, e estômatos.

Mesocarpo (b) — apresenta um parênquima de células poligonais de paredes grossas, lisas e de cor pardo-escura, menos acentuada que a do

epicarpo. A característica de possuírem estas células paredes lisas, serem pouco transparentes, de forma irregular e vários tamanhos, menores que as do endosperma, serve para diferenciá-las destas últimas, com as quais apresentam alguma semelhança. A casca é constituída, na sua maior parte, pelo mesocarpo, cujas células diminuem progressivamente de tamanho, vão se achatando, para se tornarem quase comprimidas na região divisória com o endocarpo. Na parte mediana, passam os vasos espiralóides (c) e as fibras (d) características, pertencentes ao feixe fibro-vascular. Estas fibras, vistas de superfície, são mais volumosas, mais longas e menos caniculadas que as do endocarpo. Sofrendo menos a ação direta do calor durante a torração, por estarem implantadas no mesocarpo médio, mostram-se coradas em cinza ou pardo-claro.

Endocarpo (e) — as fibras esclerenquimáticas de que consta o endocarpo, ou marinho, do café são longas, de extremidades planas ou arredondadas, de lume bem estreito, intensamente raiadas e de côr pardo-avermelhada. Apresenta típico e original entrelaçamento, cruzando-se no sentido longitudinal e transversal. Só esta característica poderá diferenciá-las das fibras do mesocarpo e do espermoderma.

CARACTERES MORFOLÓGICOS DO PÓ DE CAFÉ

No capítulo "CARACTERES HISTOLÓGICOS DO PÓ DE CAFÉ", descreveu-se a estrutura interna dos tecidos de que se compõem as diversas camadas da casca e da semente do café, a fim de que o analista esteja habilitado a reconhecê-los ou identificá-los microscòpicamente (aumento de 100 e 400 diâmetros), quando se tornar necessário.

Como, no presente método de contagem, os elementos estranhos são separados com o auxílio de uma lupa montada ou microscópio simples, em que o maior aumento nem sempre ultrapassa a 30 diâmetros, sòmente podemos observá-los morfológicamente, porque a sua estrutura histológica não é observada com êsse diminuto aumento. Dêste modo, o aspecto, a côr, a espessura e a fórmula de cada uma das partículas focalizadas no campo microscópico da lupa têm importância capital na investigação a ser feita com o fim de separá-las.

Os caracteres morfológicos do pó de café, obtidos através o aumento indicado de 20 vêzes, são os seguintes :

C A F É P U R O

Semente — quando tratado pelo clorofórmio, o pó se apresenta sob a fórmula de blocos ou fragmentos de contôrno irregular, arredondados ou facetados, de côr pardo-claro, sempre mais volumosos que os elementos da casca, (fig. 5-e), e de um pó finamente pulverizado (fig. 5-f). São inconfundíveis pela sua superfície caracteristicamente granulosa. O pó fino adere e recobre os elementos maiores.

Espermoderma (película) — fig. 5-a — é de todos os elementos do pó de café o de espessura mais fina. Apresenta-se com a côr amarelo-pálida, pardo-avermelhada ou negra, conforme o gráu de calor sofrido durante a

torração e tem, na superfície, estrias retilíneas, correspondentes às numerosas fibras que possui. Seu aspecto é de uma fina membrana ondulada, algumas vezes enrugada e brilhante. Mesmo quando enegrecida e em bloco, jamais poderá ser confundida com o mesocarpo, por ser estriada, muito mais fina, friável, facilmente desfeita ao simples toque de um estilete ou agulha e por possuir brilho intenso e particular.

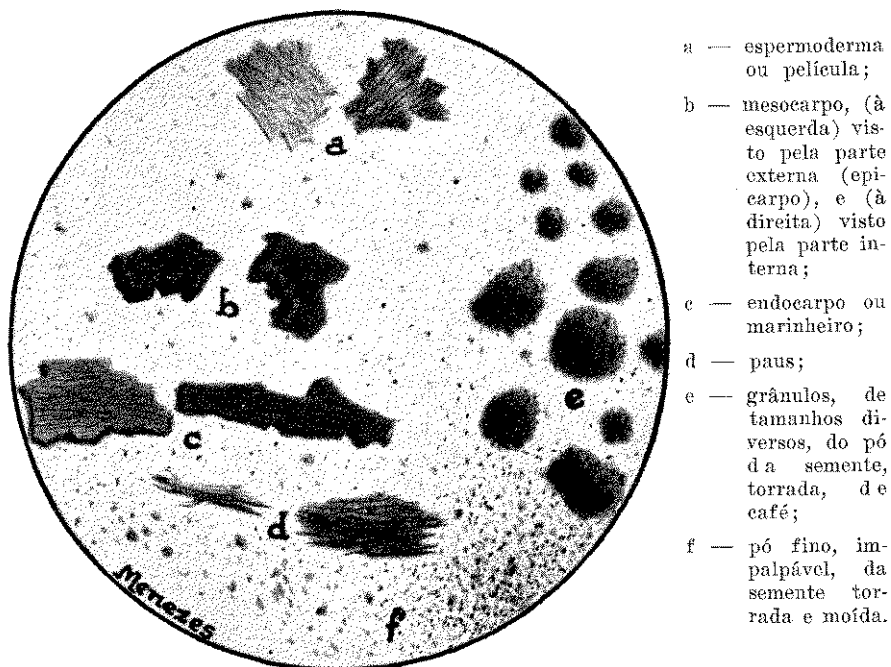


Fig. 5 — Elementos morfológicos do café em pó, descorado
— 20 X — (original).

C A S C A

Mesocarpo — fig. 5-b — possui a forma de pequenas placas espessas, irregulares, de côr pardo-negra, resistentes e de superfície nodosa e brilhante.

Endocarpo (marinheiro) — fig. 5-c — tem o aspecto de lâminas espessas, ligeiramente curvas, côr amarelo-pardacenta ou pardo-avermelhada, de superfície lisa ou ligeiramente estriada e sem brilho.

P A U S

O fragmento de madeira (fig. 5-d), torrado, quando procedente da parte mais interna, é de côr branca ou amarelada e seu aspecto é grosseiramente fibroso, sempre mais alongado do que largo. Quando provém da parte externa, notamos que a côr varia de pardo-escuro a negra e se pode ainda notar vestígios das fibras. Os fragmentos muito pequenos de paus geralmente se carbonizam parcialmente, durante a torração, e se apresentam lisos externamente, entretanto, partidos com bisturi, no sentido longitudinal, dei-

xam ver ainda suas fibras características, a não ser que estejam totalmente carbonizados.

EXAME MICROSCÓPICO DO PÓ DE CAFÉ

Logo após ter sido a amostra submetida à prova dos caracteres organoléuticos (côr, aroma e aspecto), faz-se uma observação à lupa, com aumento de 10 diâmetros, a fim de se constatar uma possível fraude, revelada por granulações de aspecto diferente ao pó de café. Procede-se, então, à "pesca" dos elementos suspeitos, por intermédio de uma agulha de platina, previamente molhada em água, montando-os entre lâmina e lamínula, em preparação aquosa, para serem identificados ao microscópio com grande aumento (400 vêzes).

Apesar de estar fraudado, o pó nem sempre apresenta vestígios da substância estranha, pelo simples fato de estar esta dissimulada por uma perfeita uniformidade de côr e de moagem. Faz-se a preparação de uma lâmina direta da amostra, que consiste em juntar-se, sôbre uma gôta d'água, pequena porção do pó, amassando-se, com o bisturi, os grãos maiores, para que tenham transparência, e cobrindo-se com lamínula.

A identificação de todos os elementos histológicos constantes da preparação deve ser feita, ao microscópio, com aumentos de 100 e 400 diâmetros, de um modo minucioso e conclusivo, para certificar-se de que a amostra está constituída por pó de café puro, por um sucedâneo ou por café fraudado com uma ou várias substâncias estranhas.

É recomendável a adição de uma gôta de lugol (soluto iodo-iodetado) para a imediata verificação de fraude por substâncias amilíferas, tais como : milho, feijão, cevada, centeio e outras, revelada pela côr violácea característica da dextrina, aí presente, pela hidrólise do amido submetido à ação do calor.

Quando a identificação de qualquer elemento se torna impraticável por apresentar pigmentação intensificada por efeito da torração, o descoramento pelo soluto de hipoclorito de sódio deve ser aplicado. Usa-se, para isso, um vidro de relógio no qual se descora, durante 2 horas, com o soluto indicado, pequena porção do pó de café, previamente sêco em estufa a 100° C, e pulverizado em gral de massa ; lava-se com água, por algumas vêzes, e faz-se uma lâmina, montada em uma gôta de soluto de hidrato de cloral. Com êste tratamento, os fragmentos menores, completamente descorados, e os mais volumosos, com os bordos inteiramente transparentes, oferecem recurso satisfatório para uma investigação microscópica minuciosa de seus elementos histológicos típicos e diferenciais.

Várias preparações devem ser feitas com a tomada de material em pontos diferentes da amostra, levando-se em conta a pequena porção da substância a ser analisada exigida na montagem de uma lâmina para exame microscópico e, ainda, a possibilidade de serem encontrados elementos estranhos, presentes, em pequena quantidade, entre os constituintes do pó.

A fig. 3 mostra os elementos histológicos do pó da semente de *Coffea arabica*, constituídos pelo espermoderma ou película e pelo endosperma, **únicos elementos que devem ser encontrados no pó de café puro**, e a fig. 4a exhibe os elementos histológicos da casca ou pericarpo, cuja presença,

em quantidade elevada, revela a intensão facciosa do torrador em fraudar o produto.

Por processos mecânicos, o espermoderma é retirado da superfície da semente, porém, como êle continua a envolver o interior das dobras e da fenda (fig. 1-h), onde não é possível sua extração pelo sistema usual de benefício, a sua presença no pó de café é considerada normal. Mesmo à vista desarmada, êstes elementos da película são notados à superfície do pó de café, sob a forma de pequeníssimas fibras ou de partículas laminares, finas, prateadas, ou amarelas e brilhantes, que, ao observador pouco experiente, podem dar a impressão de tratar-se de fragmentos da casca de café, muito embora seu aspecto e côr sejam, microscôpicamente, inconfundíveis.

Todo e qualquer elemento, com estrutura microscópica diferente da apresentada pelo espermoderma e endosperma da semente do café, será considerado um elemento estranho e a proporção encontrada no pó esclarecerá a possibilidade da existência de uma contaminação ou de uma fraude.

Conhecidos todos êstes elementos, está o analista habilitado a identificar, microscôpicamente, o café puro e diferenciá-lo do fraudado com cascas.

O reconhecimento das demais estruturas microscópicas correspondentes às substâncias suscetíveis de serem juntadas ao café requer um estudo mais demorado e minucioso, necessitando o exercício e a prática que nos levam a familiarizar com a morfologia de determinados tecidos, capazes de orientar a investigação, facilitada ainda pela aplicação de métodos especiais indispensáveis para cada caso em particular. O número dessas substâncias é infinito porque, depois de torradas e moídas, podem tornar-se mascaradas pela própria contestura do pó de café.

Sob as lentes da lupa, êstes elementos devem ser "pescados", para com êles serem feitas tantas lâminas quantos forem os aspectos apresentados, porque, provávelmente, cada um irá exhibir, ao microscópio, morfologia distinta, capaz de orientar a identificação imediata de todos êles.

Um ensaio prévio do pó de café, de grande valor para a investigação microscópica das substâncias estranhas, consiste em tomar-se um copo de 500 ml com água fria e espalhar-se, aos poucos, à superfície do líquido, 2g da amostra; esperar por uns 5 minutos, dando-se, de quando em vez, pequenas pancadas nos lados do copo, para provocar a sedimentação das partículas suspeitas, porque estas, na sua maior parte, vão ao fundo, enquanto que as do pó verdadeiro tendem a flutuar. Decanta-se o líquido e passa-se o sedimento para uma placa de Petri, a fim de serem catados, à lupa, os elementos suspeitos que, por sua vez, serão identificados ao microscópio.

Em tôda amostra de café deve ser procedida a pesquisa de areia, terra, torrões, metais pesados, etc., cuja técnica é a mesma adotada para o prévio descaramento do pó na contagem de cascas, porém, com pequenas modificações, como segue:

Tomar 2 g de pó de café e passar para um copo cônico de 30 ou 60 ml, contendo 20 ml de clorofórmio. O pó deve ser colocado aos poucos na superfície do líquido, porque, quando há terra, areia, etc., a sedimentação é

visivelmente observada, por ser quase imediata, mesmo sem agitação. Por precaução, deve-se agitar, com um pequeno bastão de vidro, fazendo-se movimentos circulares lentos, sem se aprofundar o bastão, a fim de que a camada colorida não chegue até ao fundo, prejudicando a visibilidade do sedimento formado. Deixar repousar por 10 a 15 minutos. Retirar, com uma espátula, o pó que sobrenada no líquido, pela parede oposta ao bico do copo, de modo que, ao ser decantado, não se misture parcialmente ao sedimento. Decantar, cuidadosamente, o clorofórmio, deixando-se ficar no copo 1 a 2ml do líquido transparente e passá-lo, gôta a gôta, para uma lâmina de vidro, inclinando-se, lentamente, o copo e auxiliando a retirada do sedimento por intermédio de uma alça de platina. Espalhado o sedimento e evaporado o clorofórmio, deverá ser a lâmina observada à lupa, com aumentos de 10 a 30 diâmetros, para a avaliação da quantidade de areia, terra, torrões e metais pesados, feita por método comparativo, usando-se lâminas padrões.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Quando, em 1948, fazíamos, no Instituto Adolpho Lutz, os primeiros ensaios deste método, cercados ainda por aquela atmosfera dúbia e crepuscular e, cheios de esperança e de ânimo, procurávamos vencer todos os obstáculos para encontrar o ponto de apoio necessário e desejado, um raio de luz acidental e esplendoroso veio, então, iluminar a nossa aspiração.

Ao examinarmos, à lupa, um pó de cascas de café, finamente triturado em geral, notamos a grande quantidade de partículas fibrosas nêlo presente. Tentamos pulverizá-lo ainda mais, porém só de uma parte foi possível obter pó impalpável; a outra, constituída pelas fibras, não se modificou, apesar da torração elevada da casca, continuando estas partículas intactas sob as lentes da lupa. Notamos que a proporção das partículas fibrosas, para a de pó impalpável, era de 1 : 3.

Procurar separá-las de uma quantidade conhecida de pó de café e, com elas, preencher um retículo calibrado, foi um princípio básico que norteou nosso trabalho, desde as primeiras experiências, até os testes finais que permitiram a conclusão satisfatória do método.

Portanto, as bases desse método microscópico de contagem se assentam na avaliação da quantidade de partículas fibrosas da casca contidas em 0,10 g de pó de café, previamente tratado pelo clorofórmio.

Com o auxílio da lupa e por meio de uma agulha, tais partículas são separadas e colocadas sobre uma lâmina de vidro e dispostas, uma ao lado da outra, num arranjo capaz de formar um perfeito quadrado que irá preencher determinado retículo constante de um Quadro-Padrão, correspondendo à porcentagem de casca encontrada.

As partículas separadas pertencem às regiões fibrosas do mesocarpo e do endocarpo da casca, perfeitamente resistentes à moagem, quando não carbonizadas, o que não acontece com as células achatadas da porção central e as camadas vizinhas do epicarpo, facilmente pulverizáveis por serem de constituição muito delicada. De finura quase impalpável, o pó proveniente dessas camadas só poderá ser identificado com o grande aumento do

microscópio (400 X), não oferecendo meios para ser reconhecido através às lentes da lupa, que é o instrumento ótico empregado e cujo aumento não ultrapassa, no método, a 20 diâmetros. Por esta razão, procurou-se fundamentar o método exclusivamente na avaliação da quantidade destas partículas fibrosas presentes na amostra. Verificou-se, mais tarde, que as primeiras camadas do mesocarpo externo também podiam ser computadas na contagem por apresentarem, quando trituradas, granulações mais ou menos resistentes e não descoráveis pelo clorofórmio.

O fato de serem utilizados somente estes elementos da casca no preenchimento das áreas padronizadas não altera, em absoluto, a precisão do método, como à primeira vista pode fazer crer, em primeiro lugar, porque a quantidade do pó impalpável guarda uma relação geralmente constante com a das partículas fibrosas contáveis e, em segundo, porque o retículo é calibrado exclusivamente com estas partículas fibrosas, facilmente identificáveis à lupa; caso contrário, seria preciso utilizar-se um retículo muito maior para comportar também o pó impalpável, se fôsse possível a sua separação de acôrdo com a técnica.

Dissemos que o pó impalpável guarda uma relação "geralmente constante" com as partículas fibrosas, pelo fato de ser maior a sua pulverização quando a casca sofre uma torração mais intensa. Neste caso, as porções do mesocarpo externo também se tornam pulverizáveis. Como nossos experimentos se fundamentaram sobre cafés de torração média, a pequena diferença encontrada a menos na contagem da casca de cafés queimados ou de torração elevada ou apertada deverá ser considerada como tolerância, por preencher o retículo imediatamente inferior do Quadro-Padrão.

Temos certeza de que esta tolerância não irá estimular o torrador a "apertar" a torração com o intuito de encobrir a fraude, pois, quanto mais torrado for o café, mais a casca se queima, sendo, neste caso, perfeitamente notada, até mesmo à vista desarmada. Nestas condições, a casca toma um aspecto brilhante, negro metálico, muito semelhante ao do milho queimado e facilmente identificável ao microscópio, após descoramento.

TOMADA DE AMOSTRA E DESCORAMENTO

Quanto à tomada de amostra para exame, preferimos usar a quantidade de 0,10 g, não só por facilitar e tornar mais rápida a separação da casca, como por ser ainda a menor porção capaz de preencher, com as referidas partículas, um retículo visível com área inicial de 1 mm².

Nem mesmo com o auxílio da lupa seria possível a separação total e perfeita das partículas da casca se a amostra não fôsse submetida a um prévio tratamento. Notamos que, quando o grau de torração da casca e do pó estava equilibrado por uma tonalidade de cor uniforme e pouco acentuada, os fragmentos da casca mantinham-se mascarados e encobertos, dificultando sua separação. Para isso, se fazia necessário estabelecer, entre os dois componentes do pó de café fraudado, um contraste perfeito, de forma a permitir a retirada da casca com plena segurança.

Procedeu-se, então, a uma série de ensaios, visando a escolha de um solvente ou descorante que nos proporcionasse visão clara e distinta desses

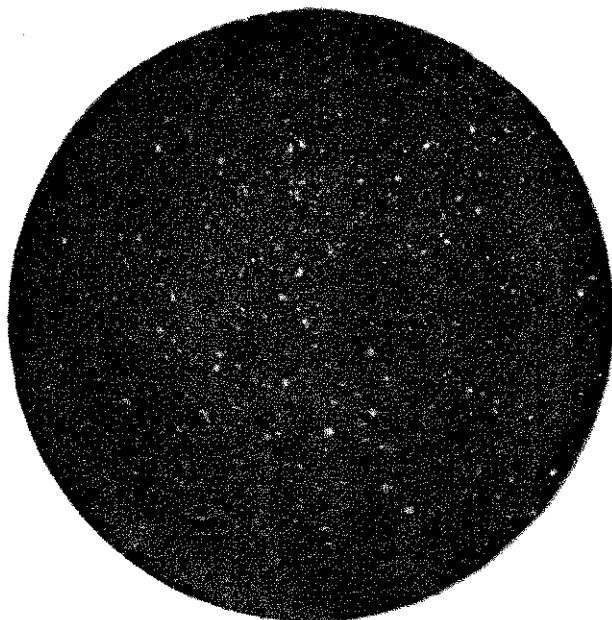


FIG. 6 — Fotografia do pó de café contendo 15% de cascas e sem tratamento pelo clorofórmio.

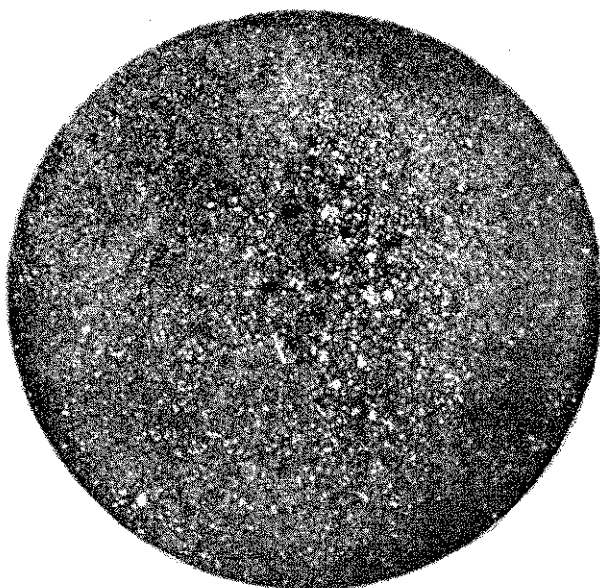


FIG. 7 — Fotografia do pó de café contendo 15% de cascas — tratado pelo clorofórmio.

elementos. Chegou-se, afinal, à conclusão de que o clorofórmio era o preferido e indicado para o caso, por permitir, ao mesmo tempo, o descoramento e a eliminação do óleo do café, deixando as partículas da casca perfeitamente visíveis e em condições de serem separadas com facilidade e rapidez. Com este tratamento, o pó, descorado, perde o aspecto oleoso e aderente, para se tornar inteiramente desintegrado e seco, mantendo o necessário contraste com os fragmentos da casca que permanecem ainda fortemente corados, por não sofrerem nenhuma alteração em presença do clorofórmio.

Nas figs. 6 e 7, vemos duas placas de Petri com o mesmo café, contendo 15% de cascas. Na primeira placa, o pó, de aspecto untuoso e bastante escuro, não permite o reconhecimento das partículas de casca, perfeitamente visíveis na segunda, devido o contraste de cor oferecido pelo pó descorado.

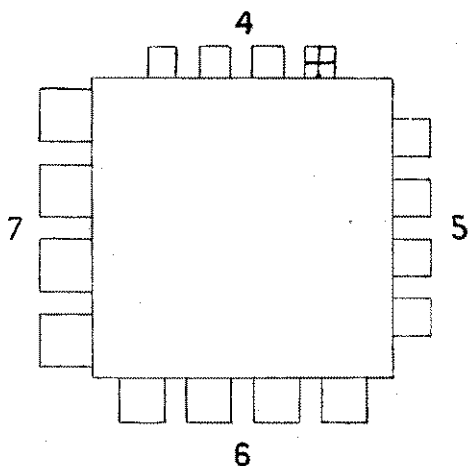
Submetida à torração em presença do café, a casca adquire, logo, cor escura característica, chegando mesmo a se queimar, muito antes do café ter atingido um grau de torração elevado, isto porque a quantidade de óleo presente em seus tecidos não vai além de traços levíssimos.

A tonalidade de cor apresentada pelo pó de café puro, depois de descorado, não é sempre a mesma; uns descoram pouco, chegando outros a adquirir uma leve coloração amarelo-parda, sem com isso indicarem presença de substâncias estranhas nem estarem esgotados.

É aconselhado repetir o descoramento, quando, após o primeiro tratamento, o pó não se descora de modo conveniente.

A intensidade do descoramento do café moído é função da qualidade, do grau de torração e de sua composição química.

CALIBRAÇÃO DOS RETÍCULOS



O número indica o lado do retículo em mm

FIG. 8 — Modelo do primitivo Quadro-Padrão.

estava equilibrado por uma tonalidade de cor uniforme e pouco acentuada.

Nas primeiras experimentações, efetuadas em 1948 e 1949, adotávamos, como Quadro-Padrão, um pequeno número de retículos desenhados ao redor de uma grande área quadrangular ou circular, dentro da qual se depositava um peso conhecido da amostra, para a separação das partículas da casca.

Na fig. 8, que representa um desses Quadros, vemos, em cada face do quadrado, quatro retículos iguais, crescendo suas áreas progressivamente de tamanho, com o aumento de 1 mm de lado: 16 mm², 25 mm², 36 mm², e 49 mm². Os números 4, 5, 6 e 7, colocados ao lado de cada série de retículos, correspondem a seus respectivos lados, comportando suas áreas 4, 5, 10 e 15%.

Porcentagens maiores eram adquiridas com o preenchimento de outros retículos do Quadro-Padrão e, menores de 4%, pelas frações representadas num dos retículos do n.º 4.

Estas proporções não podiam, às vêzes, deixar de ser bastante relativas, tendo-se em vista muitos fatores desfavoráveis que impediam a precisão dos resultados.

Estávamos no caminho certo sem, entretanto, podermos esclarecer e justificar nossas convicções.

Nas atuais experimentações, tomamos tôdas as precauções possíveis, dentro dos amplos recursos que nos foram oferecidos, para que pudessem ser eficientes nossos ensaios e observações, revistos em todos os seu estágios anteriores.

Para a calibração dos retículos, foram feitas várias séries de amostras com porcentagens crescentes de 1 a 50% de cascas torradas, adicionadas a café torrado, em grão, cuidadosamente escolhido, isento de impurezas e moídos juntos, uma amostra de cada vez, partindo sempre da de menor para a de maior porcentagem. As primeiras porções de cada moagem foram desprezadas, como medida de precaução, para evitar possíveis erros, ocasionados pela mistura com restos da amostra anterior, permanecidos nas engrenagens do moinho. As cascas e o café usados foram sempre os mesmos em cada série, variando de torração e de procedência nas demais séries.

Além das várias séries de amostras produzidas com a casca e o café moídos juntos, em moinhos da Superintendência dos Serviços do Café, outras tantas foram preparadas no Laboratório de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, partindo-se de cascas e de café em pó, moídos separadamente. As primeiras, feitas em maior quantidade, foram pesadas em balança tipo Roberval, a fim de se obter produto semelhante ao que é encontrado no comércio, e as últimas, obtidas em porções menores, com pesadas rigorosas de cada um dos componentes, previamente pulverizados.

No primeiro teste desta segunda fase de experimentações, efetuado para a avaliação das áreas dos retículos, utilizaram-se amostras de café contendo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20% de cascas e o resultado obtido foi a série de quadrados que nos apresenta a fig. 9 :

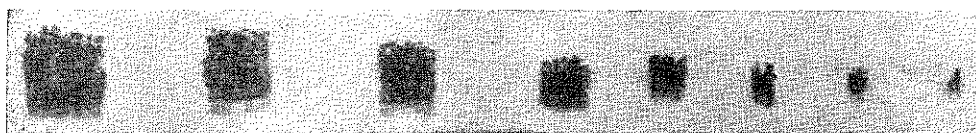
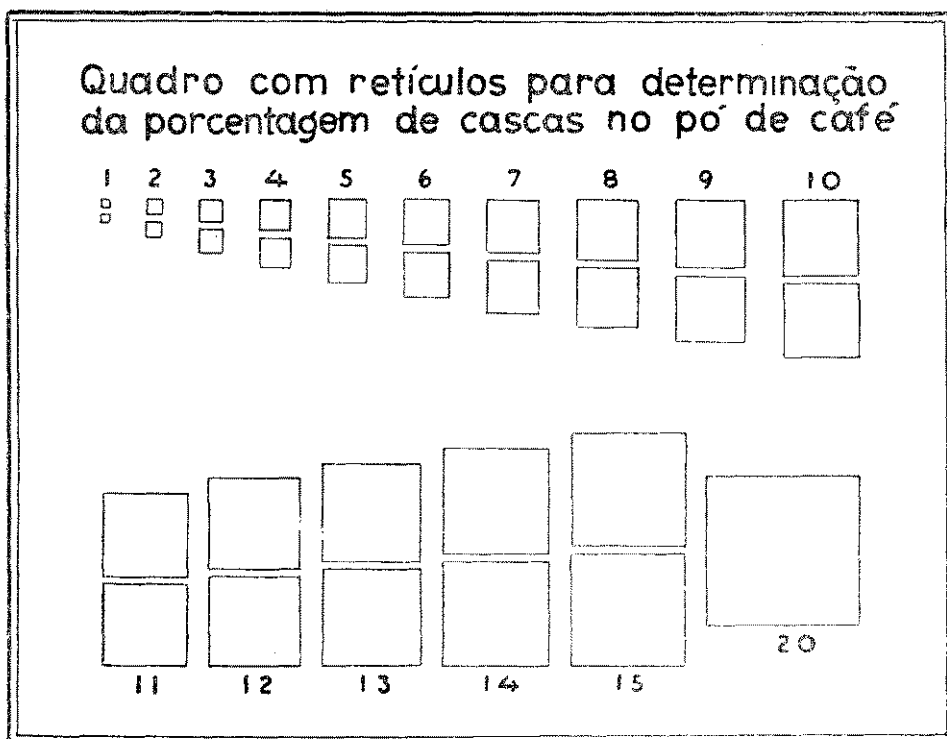


Fig. 9 — Fotografia da série de quadrados formados pelas cascas das amostras do 1.º teste.

Notamos que era visível a progressão dos quadrados formados pelas cascas e que a área ocupada pela amostra de 1% muito se aproximava à de 1 mm². A forma quadrangular pareceu-nos ainda a mais lógica, estética e prática, motivo porque foi desenhado um Quadro-Padrão com um número maior de retículos, tendo cada qual 1 mm de lado a mais que o anterior, como vemos na fig. 10 :



Os números indicam o lado do retículo em mm

FIG. 10 — Primeiro Quadro-Padrão.

As amostras de 1 a 20% correspondentes ao primeiro teste preencheram, aproximadamente, as áreas apontadas no quadro demonstrativo abaixo:

Lados	Retículos Área	Porcentagem Aproximada
1 mm	1 mm ²	1 %
2 mm	4 mm ²	2 %
3 mm	9 mm ²	3 %
4 mm	16 mm ²	4 %
5 mm	25 mm ²	5 %
6 mm	36 mm ²	10 %
7 mm	49 mm ²	15 %
8 mm	64 mm ²	20 %

Observamos que se tornavam também necessários quadrados com $\frac{1}{2}$ milímetro de lado a mais, pelo fato de um determinado retículo não comportar certa porção de casca e o seguinte ser demasiado grande, como foi notado,

de início, com a porção de 1%, cujo retículo de 1 mm² era insuficiente e o imediato, de 4 mm², apresentava sobra de espaço.

Construiu-se nova série de retículos, constando de 12 áreas progressivas, correspondentes a porcentagens de cascas de 1 a 50%, sendo alguns dêles acrescidos de ½ mm de lado, de acôrdo com observações feitas em resultados anteriores.

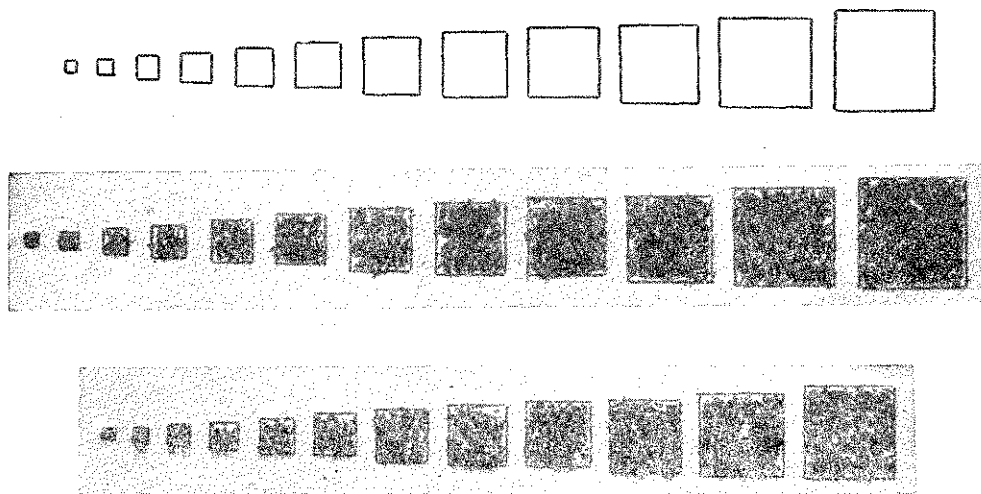


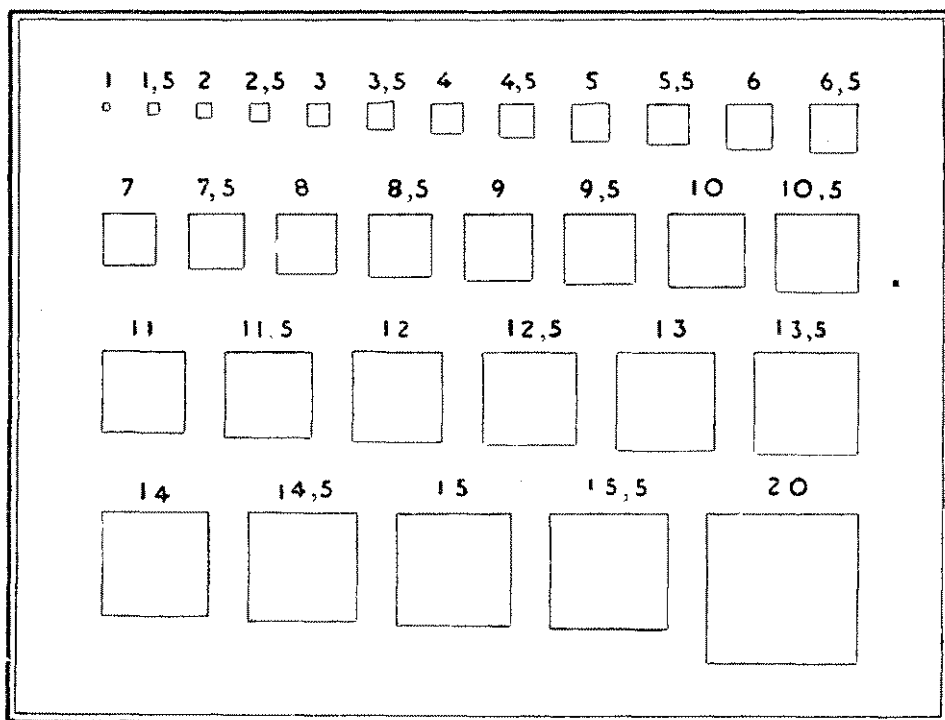
Fig. 11 — Desenho do segundo Quadro-Padrão e fotografias de 2 séries de amostras.

A figura 11 mostra o desenho do Quadro-Padrão e, logo abaixo, fotografias de duas séries de amostras, tiradas sôbre o desenho do mesmo Quadro-Padrão, e contendo de 1 a 50% de cascas, com diferentes graus de torração e que apresentaram idênticas proporções no preenchimento das respectivas áreas, como se pode notar pelo quadro demonstrativo seguinte:

Lados	Retículos Área	Porcentagem Aproximada
1½ mm	2,25 mm ²	1 %
2 mm	4 mm ²	2 %
3 mm	9 mm ²	3 %
4 mm	16 mm ²	4 %
5 mm	25 mm ²	5 %
6 mm	36 mm ²	10 %
7½ mm	56,25 mm ²	15 %
8½ mm	72,25 mm ²	20 %
9½ mm	90,25 mm ²	25 %
10½ mm	110,25 mm ²	30 %
12 mm	144 mm ²	40 %
13½ mm	182,25 mm ²	50 %

Muitas outras séries de amostras foram feitas com a utilização destes retículos, notando-se, porém, alguma diferença nos resultados obtidos, principalmente com porcentagens superiores a 15%, cujas áreas necessitavam de um novo ajustamento. Construiu-se, então, um novo Quadro-Padrão que, aliás, ainda não foi completamente satisfatório pelo fato de, continuando a apresentar os retículos uma figura retangular de lados iguais, as suas superfícies não corresponderem exatamente a múltiplos e sub-múltiplos de 36 mm², superfície média principal, ainda mesmo que se utilizassem, para a formação das áreas intermediárias, aumentos de $\frac{1}{2}$ milímetro de lado, considerados praticamente a menor fração de uma régua, em condições de dar pontos de referência para se traçarem as linhas de que se compõem tais quadrados.

Quadro com retículos para determinação da porcentagem de cascas no pó de café



Os números indicam o lado do retículo em mm

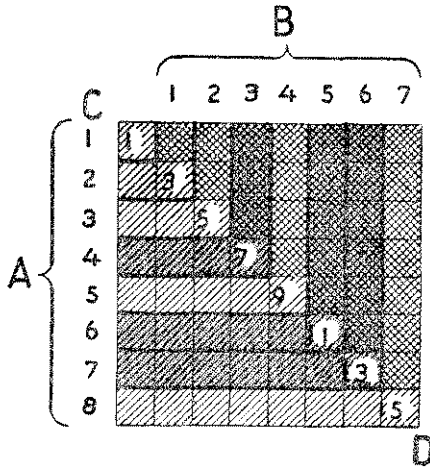
FIG. 12 — Terceiro Quadro-Padrão.

O novo Quadro-Padrão é o que exhibe a fig. 12 e o quadro demonstrativo de suas áreas é o seguinte :

Reticulos		Porcentagem Aproximada
Lados	Área	mm ² = 0,30 g
1 mm	1 mm ²	0,30 %
1½ mm	2,25 mm ²	0,67 %
2 mm	4 mm ²	1,20 %
2½ mm	6,25 mm ²	1,87 %
3 mm	9 mm ²	2,70 %
3½ mm	12,25 mm ²	3,67 %
4 mm	16 mm ²	4,80 %
4½ mm	20,25 mm ²	6,07 %
5 mm	25 mm ²	7,50 %
5½ mm	30,25 mm ²	9,07 %
6 mm	36 mm ²	10,80 %
6½ mm	42,25 mm ²	12,67 %
7 mm	49 mm ²	14,70 %
7½ mm	56,25 mm ²	16,87 %
8 mm	64 mm ²	19,20 %
8½ mm	72,25 mm ²	21,67 %
9 mm	81 mm ²	24,30 %
9½ mm	90,25 mm ²	27,07 %
10 mm	100 mm ²	30,00 %
10½ mm	110,25 mm ²	33,07 %
11 mm	121 mm ²	36,30 %
11½ mm	132,25 mm ²	39,67 %
12 mm	144 mm ²	43,20 %
12½ mm	156,25 mm ²	46,87 %
13 mm	169 mm ²	50,70 %
13½ mm	182,25 mm ²	54,67 %
14 mm	196 mm ²	58,80 %

Desta forma, quanto maiores forem as áreas dos retículos comparadas a um dêles, tanto maior será a diferença de um para outro, pela simples razão de crescerem estas áreas em dois sentidos ao mesmo tempo.

A fig. 13, bastante ampliada, representa o aumento gradativo das áreas dos retículos, por milímetro de lado, notando-se que êsse aumento corresponde à soma do número de mm^2 de que se compõe o lado do retículo



A - Lado acrecido (vertical)
B - Lado anterior (horizontal)
CD - Progressão do aumento da área

Fig. 13

entre estas áreas, os resultados mantinham-se proporcionais e as oscilações encontradas giravam em torno de números muito próximos do real, conforme se pode observar pelo respectivo quadro demonstrativo.

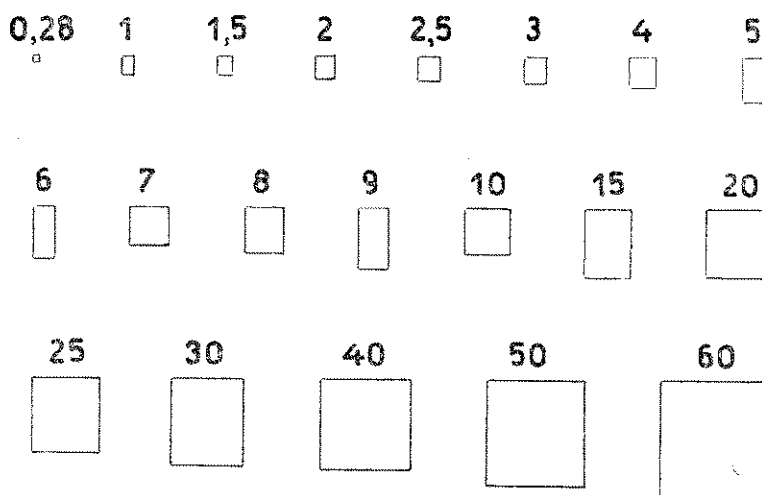
Como em tôdas as experiências procedidas, as amostras preparadas com 10% de cascas deram sempre, como resultado, o preenchimento do retículo de 36mm^2 , decidimos tomar esta área como ponto de partida para a avaliação dos demais retículos do Quadro-Padrão definitivo, não mais se levando em conta a uniformidade geométrica dos retículos, mas sim a obtenção de áreas as mais exatas possíveis, ainda mesmo que representadas por figuras irregulares.

Com o auxílio de uma lente e de uma régua de cálculo, poder-se-ia construir, com precisão, as figuras dos retículos em forma quadrangular correspondentes às áreas desejadas, mas a sua reprodução, se necessária, por parte de interessados, seria trabalhosa e praticamente desnecessária, por apresentarem os retículos de contornos irregulares obtidos por intermédio de uma régua, com frações de $\frac{1}{2}$ mm, superfícies que satisfazem plenamente as exigências do método, pois a diferença existente entre a área do retículo construído e a área considerada certa oscila de 0,0001 a $0,0012\text{mm}^2$, como vemos no quadro demonstrativo colocado logo abaixo do Quadro-Padrão definitivo :

anterior (vertical) com o número de mm^2 do lado acrecido (horizontal), ou sejam, aumentos progressivos de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, etc. mm^2 em cada retículo da série. Como exemplo, podemos citar as áreas correspondentes a 5%, 10% e 15%, respectivamente de 16mm^2 , 36mm^2 e 49mm^2 , utilizando-se êste Quadro - Padrão, quando, logicamente, deveriam ser de 18mm^2 , 36mm^2 e 54mm^2 , comparadas às porcentagens citadas.

Apesar das diferenças existentes

Quadro com retículos para determinação da porcentagem de casca no pó de café



O número indica a porcentagem

Fig. 14 — Quadro-Padrão definitivo.

Porcentagem %	Lado do Retículo em mm	Área do Retículo em mm ²	Área Certa em mm ²	Diferença de Área em mm ²
0,28	1 x 1	1	1	0
1	1,5 x 2,5	3,7	3,6	0,0001
1,5	2 x 2,5	5	5,4	0,0004
2	2,5 x 3	7,5	7,2	0,0003
2,5	3 x 3	9	9	0
3	3 x 3,5	10,5	10,8	0,0003
4	3,5 x 4	14	14,4	0,0004
5	3 x 6	18	18	0
6	3 x 7	21	21,6	0,0006
7	5 x 5	25	25,2	0,0002
8	6 x 5	30	28,8	0,0012
9	4 x 8	32	32,4	0,0004
10	6 x 6	36	36	0
15	9 x 6	54	54	0
20	8 x 9	72	72	0
25	9 x 10	90	90	0
30	9,5 x 11,5	109,2	108	0,0012
40	12 x 12	144	144	0
50	13 x 14	182	180	0,0002
60	14 x 15,5	217	216	0,0010

Com a calibração dos retículos por essa forma, ficou definitivamente resolvido adotar-se este quadro como Quadro-Padrão para a determinação das porcentagens de casca no café em pó, depois da realização de uma série de testes que lograram perfeitamente satisfatórios.

TÉCNICA PARA CONTAGEM

Material necessário :

Lupa
Balança centesimal
Cálice graduado, cônico, de 60 ml
Bastão de vidro
Espátula de metal
Placas de Petri (10 cm de diâmetro)
Funil e papel de filtro
Tiras de papel de filtro
Agulha de platina
Pincel de pêlo de marta
Lâmina de vidro (76 x 26 mm)
Clorofórmio
Água destilada
Quadro-Padrão de retículos.

MÉTODO OPERATÓRIO

Sobre uma folha de papel grosso, homogeneizar, previamente, a amostra, com o auxílio de uma espátula de metal ; passar, por meio de concha calibrada, 2 g de pó de café, para um cálice cônico, de 60 ml, contendo 25 ml de clorofórmio ; agitar, com um bastão de vidro, por várias vezes, durante 20 minutos ; filtrar, sobre papel de filtro sem pregas, e levar este a estufa, a 45.°C, por 10 minutos, para secar ; remover o pó para placa de Petri, com o auxílio de uma espátula e, para ela, passar também, com a ajuda de um pincel, o resíduo de pó aderente às paredes do cálice ; misturar bem, desfazendo os grumos, até perfeita homogeneização. Esta mistura deve ser feita com espátula, juntando, separando e amassando, levemente, o pó, procurando-se evitar a agitação provocada por movimentos circulares e bruscos dados à placa, a fim de que as partículas da casca não venham se reunir à superfície do pó, contribuindo para uma pesada defeituosa ao se fazer a

tomada de amostra para contagem. Pesar 0,10 g do pó, transportar para placa de Petri. A separação dos elementos estranhos ao café será facilitada, usando-se a técnica seguinte : com um pequeno movimento dado à placa de Petri, faz-se acumular o pó, na parte superior ; em seguida, mantendo-a ligeiramente inclinada para baixo, bate-se, com a ponta dos dedos, no fundo da mesma, para que as partículas da casca e os grãos mais volumosos do café se destaquem do pó fino. Este permanece, ainda, na parte superior da placa. Levar à lupa (aumento de 10 a 20 diâmetros) ; colhêr, com uma agulha de platina, os elementos da casca e transferi-los para uma gota de água destilada colocada sôbre uma lâmina de vidro. Esta operação é feita tocando-se com a ponta da agulha a gota d'água e, em seguida, a superfície da partícula de casca, para provocar a sua aderência e ser removida para a gota d'água. A separação direta e a séco destas partículas, como se fazia anteriormente, tornava-se lenta e penosa, pelo fato de serem as mesmas bastante duras e irregulares, saltando ou se perdendo ao primeiro contacto da agulha ; daí o adotar-se a colheita com o auxílio da gota d'água que, evitando êste inconveniente, não provoca o aumento de volume a estas partículas de natureza fibrosa, principalmente por ser curto o tempo necessário à sua separação.

Finda a colheita ou pesca dos elementos da casca, retirar o excesso d'água de sôbre a lâmina, com os lados planos de um pedaço de papel de filtro cortado com tesoura, procurando, com êle, ajustar as partículas na formação de um quadrado. Levar a lâmina à lupa para a separação dos grânulos de café puro, possivelmente aderentes à casca, colocando-se, então, sob a lâmina, o Quadro-Padrão, com o fim de ser encontrado o retículo de área correspondente. Renovar a acomodação das partículas no preenchimento total do retículo, utilizando-se agulha de platina e uma tira de papel de filtro. É necessário que estas partículas se justaponham uma ao lado da outra, sem, entretanto, se sobreporem.

Se o quadrado formado pelas cascas não preenche totalmente um determinado retículo e excede o tamanho do anterior, retira-se, então, a parte excedente de cascas para, com ela, formar um novo quadrado que irá cobrir um dos primeiros retículos do Quadro-Padrão, porque a diferença existente entre uma área e outra é sempre muito pequena. A soma dos teores oferecidos por êstes dois retículos será a porcentagem de cascas encontrada na amostra do pó de café examinado.

Há casos em que uma partícula observada à lupa pode, pelo seu aspecto e côr anormais, estabelecer dúvida ao iniciante, entre um fragmento da casca ou da semente de café. Nesta hipótese, a remoção da partícula suspeita para uma lâmina e seu exame ao microscópio, com a aplicação da técnica já descrita, darão os meios para a necessária identificação. Estas partículas pertencem às camadas do mesocarpo externo, próximas ao epicarpo, possuem células de membranas grossas, porém lisas, de tamanhos gradativamente menores em suas camadas e que diferem claramente das células do endosperma, quase sempre uniformes, de paredes porosas e marcadamente nodosas (figs. 3 e 4). Como já fizemos referência anteriormente, as granulações oferecidas por estas camadas são observadas sômente quando a casca sofreu torração leve ou média, não sendo encontradas na de torração elevada, por se tornarem pulverizáveis.

PARTE EXPERIMENTAL

Sendo a casca do café o elemento básico do método, o seu conhecimento, sob todos os aspectos, foi motivo de especial interesse de nossa parte. De início, procurando estudar o seu comportamento frente aos processos de torração e moagem, utilizamos um mesmo tipo de casca torrada na obtenção de duas espécies de amostras : uma em que a casca foi moída juntamente com o café em grão e outra em que, moída separadamente, foi posteriormente adicionada a pó de café puro. Diferentes graus de torração foram aplicados a êstes tipos de amostras, tendo-se, entretanto, dado preferência aos de torração média, pela semelhança na totalidade de côr apresentada pela maioria dos cafés em pó entregues ao consumo.

Quando moídas ao mesmo tempo que as sementes, produzem as cascas um pó de granulação mais ou menos uniforme, por não sofrerem diretamente a ação compressora das engrenagens do moinho. Ao contrário, quando trituradas separadamente, apresentam um pó sensivelmente irregular, devido à pulverização acentuada das porções friáveis da casca e a resistência oferecida pelas regiões fibrosas do mesocarpo e do endocarpo ou marinheiro, que se apresentam então sob a forma de grandes lâminas ou placas duras, brilhantes e enegrecidas, cujo tamanho pode atingir, muitas vêzes, até 25 mm².

A maior ou menor resistência da casca à trituração varia com a sua natureza, por ser fator dependente das condições climatéricas, do solo, do trato e da espécie ou variedade da planta de que procedeu, haja visto a casca dos cafés da Alta Mogiana e das zonas noroeste do Estado ; aquela, caracteristicamente úmida ou "melada", e esta, visivelmente seca.

Submetidas à moagem, estas cascas dão pós de aspecto diferente, porém uniformes no preenchimento da série de retículos, quando usado um mesmo tipo de casca, conforme se pôde concluir pelos testes levados a efeito com os mais variados tipos de cascas procedentes de diversas regiões cafeeiras do nosso Estado.

Dependendo do tipo de casca o preenchimento do retículo, a calibração dêste motivou a realização de muitos testes, dada a natural oscilação que acompanhava, algumas vêzes, os resultados. Diversos Quadros-Padrões foram desenhados, até que uma acomodação perfeita das partículas de casca fôsse obtida e a construção do Quadro-Padrão definitivo realizada.

Com o fim de poder orientar nossas observações e chegarmos a resultados lógicos e concludentes, adotou-se, desde o início, pesar, sistematicamente, tôdas as porções de casca contidas nas áreas de cada retículo preenchido. Notou-se que o pêso de cascas encontrado em 0,10 g de determinada amostra guardava sempre uma proporção, relacionada com a respectiva porcentagem, de antemão conhecida. Para confirmar a veracidade dêste fato, prepararam-se três séries de amostras, contendo cada série um tipo de cascas com torração leve, média e elevada, proporcionando-nos os resultados obtidos a relação aludida, conforme indica o quadro seguinte :

Porcentagens	AMOSTRAS			MÉDIA	
	A	B	C	De pesadas	Por 100 Pêso x 3000
1 %	0,0005	0,0003	0,0003	0,00037	1,1 %
2 %	0,0009	0,0008	0,0005	0,0007	2,1 %
3 %	0,0013	0,0012	0,0009	0,0011	3,3 %
4 %	0,0017	0,0016	0,0013	0,0015	4,5 %
5 %	0,0024	0,0023	0,0021	0,0022	6,6 %
10 %	0,0042	0,0034	0,0032	0,0036	10,8 %
15 %	0,0064	0,0060	0,0056	0,0060	18,0 %
20 %	0,0085	0,0082	0,0077	0,0081	24,3 %
25 %	0,0112	0,0101	0,0095	0,0102	30,6 %
30 %	0,0140	0,0122	0,0117	0,0126	37,8 %
40 %	0,0190	0,0153	0,0131	0,0158	47,4 %
50 %	0,0234	0,0215	0,0154	0,0201	60,3 %

Amostra A — torração leve

Amostra B — torração média

Amostra C — torração elevada

Média de pesadas — pêso da casca de 0,10 de amostra

Média por 100 — média da pesada x 3 x 1000.

A proporcionalidade dos números é evidente neste quadro, guardando entre si as amostras A, B e C uma relação constante, muito embora a estimativa de suas porcentagens apresente resultados acrescidos de 10% e de 20% na maioria das amostras. Isto não representaria inconveniente, caso se pretendesse determinar, por método ponderal, a proporção de cascas, bastando, para tanto, fazer-se os respectivos descontos, de 10 ou 20%, nos resultados obtidos.

A fim de se obter a porcentagem da amostra analisada por êste meio, faz-se a multiplicação da pesada primeiramente por 3, pela simples razão de estarem presentes na casca os elementos fibrosos contáveis na proporção de 1/3 e, depois, por 1000, para a obtenção do resultado de 100 g, sabendo-se que a contagem é procedida em 0,10 g de amostra.

Para se chegar à conclusão de que êstes elementos se mantinham, aproximadamente, na proporção de 1/3 dos demais pulverizáveis e não computados na contagem, realizou-se o seguinte teste, bastante significativo :

De duas porções de 0,10 g de pó de cascas de café, uma de torração média e outra de torração elevada, foram separadas as partículas fibrosas, as quais ocuparam as áreas de dois retículos perfeitamente iguais. Em seguida, de uma amostra contendo 0,10 g de cascas de torração média e 0,10 g de pó de café puro, foram separadas também as mesmas partículas, com o fim de ser constatada a possibilidade, não só de ficarem de permeio com o pó de café alguns dêstes elementos sem ser catados, como ainda de poder a sua falta interferir na pesada, prejudicando a precisão do resultado. A

separação de tais partículas se fez diretamente do pó para os retículos, sem auxílio da gota d'água, para que a umidade não participasse da pesada como causa de erro, obtendo-se um retículo de área precisamente igual à dos dois anteriores. A pesada dos elementos da casca separados dessas 3 amostras veio confirmar nossas observações, por ser lógica e manter-se inteiramente proporcional para com a porção restante do pó, como vemos no seguinte quadro :

AMOSTRAS	1	2	3
ÁREA DO RETÍCULO	361 mm ²	361 mm ²	361 mm ²
LADOS DO RETÍCULO	19 x 19	19 x 19	19 x 19
<hr/>			
PÊSO DE :			
Parte contável	0,0342 g	0,0325 g	0,0336 g
Pó impalpável	0,0658 g	0,0675 g	0,0664 g
Pó de café	—	—	0,1000 g
<hr/>			
Totais	0,1000 g	0,1000 g	0,2000 g
<hr/>			

- Amostra 1 — 0,10 g de casca de torração média
 Amostra 2 — 0,10 g de casca de torração elevada
 — 0,10 g de casca de torração média
 Amostra 3
 — 0,10 g de pó de café puro.

Já que, por esse meio (determinação ponderal), poderíamos chegar à possibilidade de revelar, embora aproximadamente, a proporção de cascas existente no pó de café, caso não tivéssemos um processo mais exato como o dos retículos calibrados, muito nos anima poder indicar o presente método microscópico para contagem, certos de que, pelas razões expostas, as diferenças mínimas e irremovíveis apontadas não irão prejudicar a conclusão do resultado analítico, pela margem de tolerância prevista nas áreas dos retículos do Quadro-Padrão definitivo.

DISCUSSÃO

Foi possível chegar-se a conclusões satisfatórias, depois da realização de mais de 300 testes procedidos em amostras, as mais variadas possíveis. Destinaram-se umas ao estudo das modalidades da casca do café e seu descoramento, outras à calibração dos retículos, uma grande parte delas, no conhecimento da qualidade do café em pó entregue ao consumo pelas torrações existentes no interior do Estado e na Capital paulista e algumas de Estados vizinhos.

Damos, a seguir, o QUADRO DEMONSTRATIVO DAS EXPERIMENTAÇÕES, que esclarece, de um modo sucinto, as operações que se fizeram necessárias à conclusão deste método :

QUADRO DEMONSTRATIVO DAS EXPERIMENTAÇÕES

N.º DE AMOSTRAS	ESPÉCIE	PORCENTAGENS										SUBSTÂNCIAS ESTRANHAS	OBSERVAÇÕES
		CASCAS			PAUS		CINZA TOTAL		CAFEÍNA				
		1 a 5%	10 a 20%	25 a 60%	1 a 5%	10 a 20%	Até 5 g %	+ de 5 g %	Até 1%	+ de 1%			
145	Testes	62	41	18	15	9							descoramento do pó e calibração dos retículos
61	Capital	56	5	0	2	0	21	2	17	10	13	15% de cascas foi a maior quantidade encontrada	
15	Capital	0	0	0	0	0						ausência de cascas e paus	
53	Interior	40	8	5	4	0	92	9	49	38	28	40% de cascas foi a maior quantidade encontrada	
33	Interior	0	0	0	0	0						ausência de cascas e paus	
307													Total das análises

Em 162 amostras de produtos comerciais analisadas, foram encontradas 114 contendo substâncias estranhas :

Cascas	114
Paus	6
Areia, terra, pedras e torrões	32
Milho	3
Trigo	1
Colza	1
Cevada	1
Caramelo	3

e 48 constituídas de café puro, numa porcentagem bem pequena de 29%.

Não foi encontrado café fraudado somente com paus ou com uma das substâncias estranhas apontadas ; em todos êles a presença da casca foi verificada.

As porcentagens maiores de cascas foram observadas em cafés moídos procedentes do interior do Estado, tendo, em algumas amostras, atingido a cifra bastante elevada de 40%. Nas amostras de cafés entregues ao consumo público pelas torrefações da Capital, muito embora nenhuma delas alcançasse tal cifra, um grande número apresentou porcentagem de 2 a 15%.

De acôrdo com o que tivemos oportunidade de verificar, cafés em pó com teores altos de cafeína, acima do limite permitido pelo Código Sanitário (0,700 g %), continham cascas em grande proporção, chegando a ultrapassar 10% em muitos casos.

Verificamos, também, que o acréscimo de casca no café não aumenta o seu resíduo mineral fixo, pois, em 124 amostras examinadas, 113 apresentaram resultados inferiores a 5 g%, limite máximo tolerado pelo regulamento em vigor, muito embora contivessem algumas amostras 15% dos elementos da casca.

Desta forma, o exame microscópico parece ser ainda o mais indicado para o caso do café, desde que se tenha por mira a questão da fraude, pois, além de poder indicá-la com segurança, é rápido e permite dar, em certos casos, como o da casca de café, a proporção da substância adicionada.

O resultado reproduzido no Quadro Demonstrativo referente a cafés em que se constatou ausência de cascas e demais impurezas indica, de um modo evidente, a necessidade urgente de melhorar a qualidade dêste precioso produto, pois, das 162 amostras procedentes das torrefações da Capital e do Interior, somente 48 eram puras, correspondendo à porcentagem mínima de 29%.

Em nossas investigações, a presença de fragmentos de madeira não foi encontrada em proporções maiores que 3%. Consideramos tal fato como

uma prova da impraticabilidade do aproveitamento de paus na fraude do café, cujo aspecto se modifica de modo a permitir, fãcilmente, o seu reconhecimento, pelas inúmeras fibras típicas presentes.

A aplicação dêste método pode estender-se à contagem de qualquer outra substância empregada em diferentes modalidades de fraude, desde que, para isso, se utilize um Quadro-Padrão prèviamente ajustado.

É imprescindível, para os efeitos do método, que o analista conheça perfeitamente os elementos histológicos do café, os caracteres morfológicos do pó, as alterações macroscópicas por que passa, nas várias fazes do processo, a fim de que tenha pleno desembaraço na separação das partículas da casca e na sua conseqüente acomodação nos retículos.

CONCLUSÃO

Baseados em resultados que confirmaram, integralmente, nossas observações, no decorrer das experimentações para a concretização das bases dêste método, chegamos às seguintes conclusões :

1.º) — Êste método satisfaz, plenamente, as exigências do momento, pelas possibilidades de determinar as porcentagens de impurezas contidas no café em pó, principalmente de cascas, cuja proporção poderá ser estimada a partir de 0,28%.

2.º) — É de fácil interpretação, por não apresentar ao analista nenhuma dificuldade de ordem técnica e científica.

3.º) — Sua aplicação pode estender-se à contagem de qualquer substância adulterante, desde que se utilize um Quadro-Padrão apropriado.

4.º) — É de utilidade prática indiscutível, podendo, certamente, influir no espírito de contumazes fraudadores, para que sejam mais sóbrios em suas desmedidas ambições.

5.º) — Possibilita a eliminação de uma fraude, permitindo às Repartições fiscalizadoras estenderem sua ação ao café em pó, como é realmente entregue ao consumo público.

6.º) — Permite o estudo de medidas que visem determinar a porcentagem mínima de impurezas a ser tolerada no peor café em pó permitido para o consumo público.

Confiantes na realidade das afirmativas que acabamos de explanar, sentimo-nos bastante seguros para indicar a aplicação dêste método e solicitar a sua oficialização.

R E S U M O

Os autores apresentam um método microscópico inédito para a avaliação da porcentagem de cascas contidas no café em pó, desejando contribuir para a eliminação desta modalidade de fraude, cuja freqüência se acentua, últimamente, pelo elevado preço atingido pelo produto.

Fazem um estudo morfo-histológico do fruto e da semente do café, ilustrando-o com desenhos originais coloridos.

Descrevem os processos utilizados no exame microscópico do café e os meios para identificação de substâncias estranhas comumente adicionadas ao produto em pó.

Todos os ensaios foram efetuados na Sub-Secção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolpho Lutz, tendo sido grande parte das amostras gentilmente fornecida pela Superintendência dos Serviços do Café.

Expõem, detalhadamente, o princípio do método e a técnica para contagem que, em síntese, é a seguinte :

Pesar 2 g de pó de café, passar para um cálice cônico contendo 20 ml de clorofórmio, agitar, por várias vezes, durante 20 minutos, para descorar e desengordurar o pó; filtrar e secar o resíduo em estufa, a 45.º C, pesar 0,10 g do mesmo, transportar para placa de Petri, levar à lupa (aumento de 10 a 20 X), colher, com agulha de platina molhada, os elementos da casca (que não se descoram pelo clorofórmio) e transferi-los para uma gota d'água colocada sobre lâmina de vidro. Retirar o excesso d'água por meio de papel de filtro, procurando ajustar as partículas da casca na formação de um quadrado. Colocar a lâmina sobre o Quadro-Padrão e procurar o retículo de área correspondente.

Esclarecem como chegaram à calibração dos retículos do Quadro-Padrão, que permite a determinação de porcentagens de impurezas, a partir de 0,28%.

Várias fotografias e quadros demonstrativos são apresentados para maior clareza na interpretação dos resultados.

Baseados nos resultados das experimentações procedidas, os autores chegaram às seguintes conclusões :

Este método microscópico de contagem vem preencher, satisfatoriamente, uma lacuna permanecida, de há muito, no campo da Bromatologia.

Permite determinar porcentagens de impurezas, principalmente de cascas, contidas no café em pó, sendo de fácil interpretação, por não apresentar dificuldades de ordem técnica e científica.

Sua aplicação pode estender-se à contagem de qualquer substância adulterante, contanto que se faça uma calibração especial de retículos.

Confiantes na segurança do método, os autores solicitam a sua oficialização.

SUMMARY

The authors present an unpublished microscopic method to value the percentage of hull contained in ground coffee, in order to contribute for the elimination of this kind of fraud, the frequency of which has been increasing lately because of the high price of the product.

A morpho-histological study of the fruit and seed is made, illustrated with original coloured drawings.

They describe the processes used in the microscopic examination of coffee and the means for the identification of foreign substances commonly added to the ground product.

All the experiments were made at the "Sub-Secção de Microscopia do Instituto Adolpho Lutz", a great part of the samples having been kindly furnished by the "Superintendência dos Serviços do Café".

A detailed exposition of the principles of the method for the counting is made, which, in synthesis, is the following :

Weigh 2 g of ground coffee and pass it through a conical cup containing 20 ml of chloroform, shake it many times, during 20 minutes, to discolour and take away the fat of the powder; filter and dry the remainder in a stove at 45.° C ; weigh 0,10 g of it and pass the same to a Petri dish, and look through a lens (increase of 10 — 20), gather with a wet platinum needle the peel elements (wich did not discolour by the chloroform), and transfer them to a water drop placed on a slide.

Take away the water excess with a filter paper, trying to adapt the hull particles to a square formation.

Adjust the thin plate to a pattern picture and look for the corresponding surface reticule.

The explanation is given as to how the calibration of the pattern picture reticules is obtained, which permits the determination of the percentage from 0,28 to 60% of coffee hull.

Several photos and pictures are presented, in order to help the interpretation of the results.

Based on the results obtained from the tests, the authors came to the following conclusions :

This microscopic method comes to fill, in a satisfactory way, an old blank which existed for a long time in bromatology.

It permits the determination of the impurity percentages contained in ground coffee, starting from 0,28%, being of an easy interpretation because it does not present difficulties of technical or scientific order.

Its application may be extended to the count of any adulterating substance, as long as a special calibration of the reticules is made.

It makes possible the elimination of certain frauds, favouring the fiscalization of ground coffee as it is given for sale, and permits the study of a toleration limit to be adopted for inferior types of coffees.

Trusting in the security of this method, the authors are looking forward for its officialization.

R É S U M É

Les auteurs présentent une méthode microscopique inédite pour évaluer le pourcentage des écorces contenues dans la poudre de café, désirant contribuer à l'élimination de ce genre de fraude, dont l'habitude s'accroît chaque jour, à cause du prix élevé de ce produit.

Ils ont fait une étude morpho-histologique du fruit et de la graine du café, illustrée de dessins originaux coloriés.

Ils décrivent les procédés utilisés à l'examen microscopique du café, et les moyens d'identifier les substances étrangères communément additionnées au produit moulu.

Tous les essais ont été effectués à la "Sub-Secção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolpho Lutz". Une grande partie des échantillons ont été gentiment fournis par la "Superintendência dos Serviços do Café".

Ils exposent, d'une manière détaillée, le principe de la méthode employée et la technique de comptage qui, en synthèse, est la suivante :

On doit peser 2 g de poudre de café, que l'on met ensuite dans un verre à expérience gradué contenant 20 ml de chloroforme, agiter plusieurs fois, pendant 20 minutes, pour décolorer et dégraisser la poudre; filtrer et sécher le résidu en étuve à 45.° C, peser 0,10 g de ce résidu, le poser sur une plaque de Petri; regarder avec une loupe (augmentation de 10 à 20 X) prendre, avec une aiguille de platine mouillée, les éléments d'écorce (qui ne se décolorent pas par le chloroforme) et les mettre dans une goutte d'eau sur une lamelle. Retirer l'excès d'eau au moyen d'un papier filtre et former un carré en rapprochant les particules d'écorce. Poser la lamelle sur le Cadre Modèle et chercher le réticule de la surface correspondante.

Ils expliquent comment ils sont parvenus au calibrage des réticules du Cadre Modèle, qui permet de déterminer le pourcentage d'impuretés à partir de 0,28%.

De nombreuses photographies et cadres démonstratifs sont présentés pour indiquer l'interprétation des résultats.

Basés sur les résultats des expériences acquises, les auteurs sont parvenus aux conclusions suivantes :

Cette méthode microscopique de comptage vient remplir avec satisfaction une lacune qui dure depuis fort longtemps dans le champ de la Bromatologie.

Elle permet de déterminer le pourcentage d'impuretés, principalement des écorces contenues dans le café en poudre, étant de facile interprétation parce qu'elle ne présente pas de difficultés d'ordre technique ou scientifique.

Son application peut s'étendre au comptage de n'importe quelle substance adultérante, à la condition que l'on fasse un calibrage spécial de réticules.

Confiants dans l'efficacité de cette méthode, les auteurs sollicitent l'officialisation du même.

BIBLIOGRAFIA

- BAILLON, M. H. — Dictionaire de botanique. Paris, Librairie Hachette et Cie., 1876 ;
1 : 544.
- CULBRETH, D. M. R. — A manual of materia medica and pharmacology. New York,
Lea & Febiger, 6. ed., 1917 ; p. 547-551.
- HAGER-MEZ — El microscopio y sus aplicaciones. Barcelona, Gustavo Gili Editor,
1922 ; p. 104-112.
- HERAIL, J. — Traité de matière médicale, pharmacographie. Paris, Librairie J. B.
Baillièrre et Fils, 1927 ; p. 626-638.
- MACÉ, E. — Les substances alimentaires. Paris, Librairie J. B. Baillièrre et Fils, 1891 ;
363-379.
- MENEZES JR., J. B. F. — 1950 — Do exame microscópico nas fraudes do café. S.
Paulo, Boletim da S. S. C., Secr. Fazenda 25 (275):5-7.
- MOELLER, J. — Guia para ensayos micro-farmacognósticos. Barcelona, Editorial
Labor S. A., 1927 ; p. 130-131.
- UKERS, W. H. — All about Coffee, New York, The Tea & Coffee Trade Journal Com-
pany, 2. ed. ; 1935.
- WINTON, A. L. e K. B. WINTON, — The Structure and Composition of Foods. New
York, John Wiley & Sons. Inc., 1932 ; 4 : 140-162.
- YOUNGKEN, H. W. — Tex-book of pharmacognosy. Philadelphia, The Blakiston
Company, 5. ed., 1943 ; p. 828-833.



BACTERIOLOGIA DAS SHIGELOSES

por

AUGUSTO DE E. TAUNAY

Do Instituto Adolfo Lutz

Desde que SHIGA (1898) demonstrou a etiologia bacteriana de algumas formas de disenteria, pensou-se que os germes responsáveis por essa condição mórbida fossem limitados a poucas espécies bem definidas, verificando-se, mais tarde, ao contrário, constituírem grande variedade de espécies e tipos.

Nosso trabalho representa contribuição para o estudo bacteriológico do gênero *Shigella*, no qual procuramos utilizar métodos que permitam prestar informações exatas aos Serviços de Saúde Pública, sem o que se torna difícil qualquer medida profilática e impossível a realização dos inquéritos epidemiológicos. Por outro lado, com o advento da quimioterapia antimicrobiana e com o uso cada vez mais generalizado dos antibióticos, qualquer experimentação clínica com um desses agentes terapêuticos só poderá ter valor se o controle bacteriológico for perfeito, já tendo sido demonstrada a existência de tipos de shigelas mais sensíveis que outros à ação de várias drogas.

Sendo assunto de grande interesse médico-sanitário, inicialmente procuramos, na literatura médica nacional, o que de mais importante existe sobre o assunto. A primeira referência sobre pesquisa de bactérias disenterígenas que encontramos foi a de ADOLPHO LUTZ (1897), nos Relatórios do Instituto Bacteriológico de São Paulo. Este autor não conseguiu demonstrar a presença de bacilos disentéricos em fezes e os germes que isolou não foram aglutinados pelo sangue dos doentes.

FICKER (1915), examinando as fezes de 260 doentes suspeitos de disenteria bacilar, isolou o bacilo de Shiga 2 vezes e o bacilo de Flexner 8 vezes, chamando a atenção para a existência da doença em São Paulo.

Mais tarde, GODINHO (1917) refere-se a uma epidemia havida em Pernambuco, no ano de 1904, em que se suspeitou da etiologia bacilar, sem ter sido possível isolar o germe causador. Baseado na opinião de Adolpho Lutz, acredita que, em São Paulo, o primeiro caso constatado foi em 1903, embora o agente etiológico não tenha sido isolado. Como confirmação, cita o fato de esse doente ter sido acometido, em 1913, pela mesma moléstia, tendo sido, nessa ocasião, isolado das fezes, por Ficker, um bacilo tipo Flexner. Conclui que, em São Paulo, existem casos de disenteria bacilar tipo Shiga-Kruse e Flexner que, embora sem caráter epidêmico, merecem atenção dos clínicos e que a moléstia já fôra verificada em brasileiros natos.

GUIMARÃES e CORTEZ (1918) relatam caso fatal de disenteria bacilar em criança, causada por bacilo tipo Flexner; nesse trabalho, referem-se a uma epidemia de disenteria bacilar ocorrida em Cabo Frio, causada pelo bacilo de Shiga-Kruse.

GUIMARÃES (1922, 1922 a) publica o relatório de uma epidemia de disenteria bacilar na Penitenciária do Estado de São Paulo, com 142 casos, tendo havido 2 óbitos. A princípio, pensou que o agente responsável fôsse o bacilo de Flexner; posteriormente, identificou, como agente etiológico, o bacilo de Shiga.

PACHECO (1925) estuda o problema na Bahia: em 17 doentes de disenteria, isolou bacilo tipo Shiga em 80% dos casos e, em 10%, o tipo Y. Os 10% restantes não eram portadores de germes disentéricos.

GESTERIA (1930), consultando dados do Instituto Oswaldo Cruz da Bahia, de 1925-1929, encontrou, em 240 exames, 50 positivos com predominância do bacilo Flexner.

PACHECO e RODRIGUES (1928, 1930) e PACHECO e MENDONÇA (1930) fazem estudo bem documentado da bacteriologia das disenterias na cidade do Rio de Janeiro. MENDONÇA (1931) relata os resultados de 804 exames com 220 casos positivos, tendo isolado bacilos Flexner, Shiga, *sonnei* e Schmitz.

Foi, entretanto, com Arlindo de Assis que o problema das shigeloses (térmo criado por ele, em 1935, "compreendendo tôdas as determinações patológicas produzidas pelos bacilos disentéricos, quer as intestinais como as extra intestinais") tornou-se bem conhecido entre nós. A contribuição de Assis, como veremos, no decorrer dêste trabalho, é deveras notável e merece, portanto, menção especial.

Mais recentemente, RANGEL PESTANA e FARACO (1942) trazem interessante contribuição sobre a bacteriologia das enterocolites disentéricas, principalmente pelo elevado número de exames que realizaram.

MONTEIRO FILHO (1947), em sua tese de concurso para professor catedrático da Faculdade de Medicina de Niterói, faz revisão muito boa sobre a bacteriologia das shigeloses. Na literatura estrangeira, encontramos estudos muito bem feitos por WEIL (1943, 1947), NETER (1942) e FELSEN (1945).

Dividimos êste nosso trabalho em duas partes: na primeira, justificamos a nossa orientação, no que diz respeito à diferenciação dos vários tipos de bacilos disentéricos, baseados seja em pesquisas por nós realizadas ou em verificações feitas por outros autores, que aceitamos como certas, no momento; na segunda, analisamos o que nos foi dado observar, num período de 4 anos, empregando métodos de trabalho que, a nosso ver, parecem satisfatórios.

Não é nosso propósito discutir, aqui, questões de sistemática bacteriana. Sabemos que a delimitação atual do gênero *Shigella*, dentro do grupo das Enterobacteriáceas, é devida mais à necessidade de entendimento entre os vários pesquisadores, estando ainda incerta a posição sistemática de alguns tipos dentro do gênero. Assim sendo, seguimos, em linhas gerais, a classificação adotada pelo MANUAL DE BERGEY (3.^a edição por BREED e colab., 1948).

1.^a PARTE

MÉTODOS DE ESTUDO

O diagnóstico de laboratório de uma shigelose faz-se, em geral, pelo exame das fezes. Sendo estas muito ricas em bactérias, torna-se necessário ao bacteriologista tomar uma série de precauções para aumentar as possibilidades de êxito do exame.

O material a ser examinado deve ser o mais fresco possível, porque, sendo o bacilo disentérico microrganismo bastante delicado, é rapidamente vencido pelo colibacilo e outros germes habituais do intestino. A melhor maneira consiste em levar ao laboratório as fezes, imediatamente depois de emitidas. Aí, o laboratorista pode escolher as partes que mais o interessam para exame; em geral, são as constituídas por muco. Em casos agudos, o isolamento do bacilo disentérico é fácil; o mesmo não acontece nos casos crônicos, aconselhando alguns autores a usar o método do bastão, preconizado por HARDY e WATT (1934), ou então colher o material diretamente das ulcerações intestinais, consoante recomenda FELSEN (1945).

Nem sempre é possível que as fezes, depois de emitidas, sejam enviadas, rapidamente, ao laboratório. Nestes casos, é muito útil o emprêgo de líquidos conservadores que impeçam a proliferação dos saprofitas habituais do intestino, sem prejudicar os bacilos disentéricos por ventura existentes.

BANGXCANG e ELIOT (1940), estudando os líquidos conservadores para transporte de fezes, concluem que de todos o que dá melhores resultados é a mistura de citrato de sódio e desoxicolato de sódio em salina tampanada, descrita por êsses autores.

Não tivemos oportunidade de realizar estudos comparativos entre líquidos conservadores. A experiência que temos nos foi dada pelo estudo de fezes inoculadas com bacilos disentéricos, usando, como termo de comparação, a glicerina como conservador, meio que sempre utilizamos.

Como é sabido, os bacilos disentéricos são muito sensíveis a pH ácido, motivo porque os líquidos conservadores empregados devem sempre ser ajustados a pH alcalino ou neutro. No caso da solução glicerinada, devemos sempre usar glicerina neutra e, assim mesmo, muitas vezes encontramos pH ao redor de 4, que é impróprio. Esse inconveniente é facilmente evitado, desde que se tampone a solução glicerina-cloreto de sódio com tampão de fosfato, para manter o pH em torno de 8. Ao conservador deve-se juntar fenol vermelho e só usá-lo se apresentar coloração rósea, pois é sabido que a glicerina pode se decompor, produzindo ácido, que então iria mudar a cor do indicador para o amarelo, o que indica estar o líquido conservador com pH alterado.

As verificações de KLIGER e colab. (1943), admitindo que seja o bacteriófago existente nas fezes o responsável pela morte rápida dos bacilos disentéricos, sugerem a adição à glicerina de formalina (1 : 10.000 e 1 : 7.500) capaz de inativar o bacteriófago sempre que houver necessidade de transportar fezes.

Em nosso laboratório, em experiências feitas, verificamos que o formol, se não aumenta a eficiência, não prejudica o exame. Como não temos ex-

periência suficiente, baseados na dos autores acima citados, parece-nos facultativa a adição do formol sempre que o exame das fezes leve algum tempo para ser iniciado. Na parte final, quando transcrevemos estudos realizados em nosso laboratório, estão tabelados os resultados que conseguimos, usando técnicas diferentes, e de tôdas a que nos deu melhor resultado foi a de Hardy e Watt, não tendo havido diferença entre transporte de fezes "in natura" e fezes já semeadas em líquido conservador, quando o período entre a emissão das mesmas e a semeadura não foi maior do que 6 horas.

A seguir, temos a escolha dos meios de cultura a serem empregados. É grande a variedade de meios propostos para o isolamento de bacilos disentéricos e, diante dos resultados obtidos pelos vários autores, concluímos que não há ainda um meio de cultura ideal para todos os tipos de *Shigella*, tornando-se, por isso, necessário o emprêgo de pelo menos 2 meios diversos, um diferenciador e outro seletivo.

Como meio diferenciador, emprega-se, em geral, uma base de gelose lactosada, à qual se adiciona um indicador de reação, permitindo diferenciar colônias de germes que produzam ou não ácido a partir da lactose. Esses meios não impedem o crescimento, algumas vezes abundante, do bacilo *coli* e do *proteus*, o que torna, muitas vezes, impossível a verificação das colônias suspeitas. Os meios dêste tipo, mais comumente empregados entre nós, são os de Endo, de Mac Conkey, de Holt-Harris-Teague e o ágar-ácido rosólico. Não são meios diferenciadores puros porque, em sua composição, entram substâncias bacteriostáticas para bacilo *coli* e *proteus*.

O segundo grupo é constituído por meios de culturas também com base de gelose lactosada, à qual se adiciona um indicador e uma ou várias substâncias bacteriostáticas que permitem o crescimento de bacilos disentéricos e impedem os germes Gram-positivos, a maioria dos coliformes, evitando o crescimento espraicante do *proteus* e permitindo, por isso, semeaduras mais abundantes. O inconveniente dêste tipo de meio é o de inibir também, algumas vezes, o crescimento de certas bactérias patogênicas, principalmente a *Sh. dysenteriae* e a *Sh. alkalescens* (PESTANA e FARACO, 1940).

A técnica que, habitualmente, usamos é a seguinte :

Chegando as fezes ao laboratório, são semeadas num tubo de solução glicerina-cloreto de sódio tamponada, a pH 8. A quantidade de fezes semeadas no tubo de glicerina (10 cm³) é a equivalente ao volume de uma amêndoa, tomando-se o cuidado de escolher partes muco-sangüinolentas, quando presentes. A emulsão das fezes da solução de glicerina deve ser a mais perfeita possível.

Como meio diferencial, usamos o de Holt-Harris-Teague e, como seletivo, o meio S. S., parte obtido da casa "Difco" e parte preparado em nosso laboratório, segundo fórmula que daremos em apêndice. Sempre usamos 2 placas do meio S. S. e 1 de H. H. T. Colocamos, com pipeta estirada ou com alça de platina, 4 gôtas da emulsão de fezes, em pontos separados numa placa de S. S. ; com um bastão em L espalha-se o material por tôda a superfície da placa e o mesmo bastão será passado na superfície de outra placa de S. S. e, por último, na placa de H. H. T., tomando-se o cuidado de não passar o bastão 2 vezes pelo mesmo ponto.

A preferência por êsses 2 meios nos foi indicada por experiências realizadas em nosso laboratório. O meio S. S. é de todos, até hoje, por nós experimentados, o que tem dado melhores resultados; permite sementeiras de maior quantidade de fezes, sendo fácil a diferenciação das colônias suspeitas, tendo ainda a vantagem de impedir a ação invasora do *proteus*. A razão de usarmos o meio de H. H. T. foi a de estarmos mais familiarizados com êle e o considerarmos equivalente aos outros acima citados. Semeadas as placas, estas são colocadas em estufa, a 37.º C, por 24 horas. No dia seguinte, verifica-se a presença de colônias suspeitas. No quadro adiante, estão sumariamente descritos os aspectos das colônias nos vários meios.

QUADRO 1

ASPECTO DAS COLÔNIAS NOS DIFERENTES MEIOS SELETIVOS

Grupo de microrganismos	Meio de cultura Holt-Harris-Teague	Meio de cultura Agar S. S.
<i>S. typhi</i>	Convexas, lisas, brilhantes, em geral de azul mais claro que o meio.	Colônias sem côr ou pouco amareladas. Em 48 horas a côr pode se acentuar.
<i>Salmonella sp.</i>	Semelhantes às do bacilo tífico.	Em geral maiores que as do bacilo tífico.
<i>Shigella sp.</i>	Semelhantes às do bacilo tífico.	Semelhantes às do bacilo tífico. <i>Sh. sonnei</i> pode crescer formando colônias muito grandes com centro amarelo.
Coliformes	Colônias azul-negro ou com centro escuro e timbre metálico.	Inibidos. Podem crescer como colônias opacas de tonalidade do róseo ao vermelho. Colônias maiores podem ter centro vermelho com periferia branca ou amarela.
<i>Proteus</i>	Colônias sem côr, com pseudópodos.	Colônias sem côr, podendo ter pseudópodos.

De um modo geral, é o que se deve observar, até que cada qual possa, por experiência própria, julgar o que deverá ser considerado como colônia suspeita, uma vez que, não raro, germes patogênicos são isolados de colônias atípicas.

ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS :

Isolar de cada placa pelo menos uma colônia com caracteres semelhantes aos acima descritos. Procurar atingir, com a agulha depois de fria, a colônia, bem no centro, evitando, o mais possível, isolar colônias em zonas da placa onde estas não estejam bem separadas. Se não for possível, será de toda conveniência isolar a colônia que não puder ser separada da primeira vez numa placa de H. H. T., por estrias sucessivas. Isolada a colônia, inocular o meio de tríplice açúcar de Krumwiede modificado, introduzindo a agulha na base e, quando esta for retirada, passá-la pela parte inclinada.

Após incubação de 24 horas em estufa, muitas indicações podem ser dadas pelo simples exame do tríplice açúcar, conforme está esquematizado no quadro seguinte.

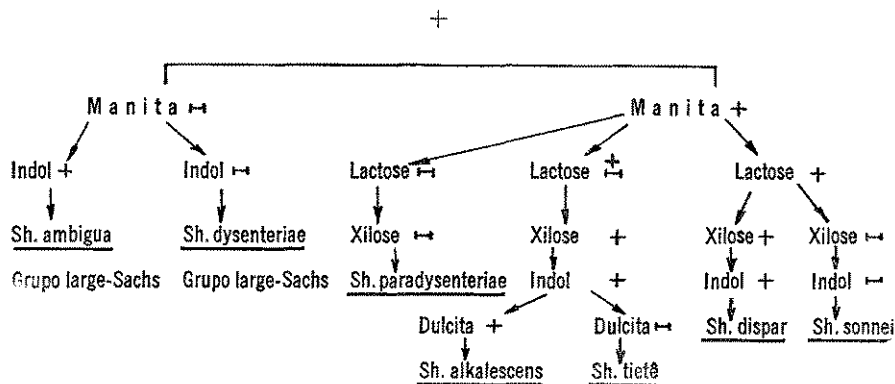
QUADRO 2

	PARTE INCLINADA	BASE
<i>S. typhi</i>	Não altera.	Ácido com ligeiro enegrecimento.
Grupo disentérico	Não altera.	Ácido sem enegrecimento.
<i>Proteus</i> <i>Paracoli</i>	Não altera.	Ácido e bolhas de gás, com enegrecimento difuso e intenso para as salmonelas.
Salmonelas		
Reações sem valor ...	Não altera.	Não altera.
	Ácido e gás.	Ácido e gás.

Devemos sempre lembrar que algumas shigelas podem produzir ácido na parte inclinada do tríplice açúcar, voltando êste, em geral, para alcalino, se a incubação for prolongada por mais 24 horas. Algumas amostras de *Sh. paradysenterix* (tipo *newcastle*) podem produzir um pouco de gás na base, apesar de serem legítimos bacilos disentéricos. A seguir, de cada tríplice suspeito, será feita uma tentativa de identificação bioquímica.

Como vimos, a produção de ácido sem gás, na base do tríplice, indica, em geral, tratar-se de *Shigella* ou da *Salmonella typhi*. Neste segundo caso, a produção de ácido sulfídrico pela *S. typhi* orienta a pesquisa para êsse lado. Para confirmação de gênero e separação em espécies, usamos os seguintes meios diferenciais: dextrose, lactose, manita, xilose, dulcita, meio de Stuart, meio de citrato de Simmons, água peptonada para produção de indol, meio de Clark Lubs para verificação do acetilmetilcarbinol, caldo comum ou ágar semi-sólido para verificação de motilidade. Serão consideradas shigelas todos os bacilos Gram-positivos que fermentem a dextrose sem gás, não hidrolisem uréia, não utilizem citrato, não produzam acetilmetilcarbinol e hidrogênio sulfurado e que sejam imóveis. Obedecendo à chave de identificação, poderemos chegar à diferenciação da maioria das espécies de *Shigella*.

QUADRO 3
 QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO
 Bacilos Gram-negativos imóveis
 Citrato, Uréia, V. P. e H²S negativos
 Dextrose



Nota: Existem bacilos disenterícos capazes de produzir bolhas de gás na dextrose e na manita; pertencem ao grupo paradisenteríco, sendo sorológicamente idênticos ao tipo *Sh. paradysenteriae* Boyd 88. Pertencente ao mesmo grupo também é freqüente um bacilo manita-negativa, a *Sh. newcastle*. Também é comum um bacilo disenteríco manita — indol +, sorológicamente idêntico à *Sh. paradysenteriae* Boyd 103. A diferenciação entre certos tipos *Sh. alkalescens*, *Sh. tietê* e *Sh. dispar* só é possível pelo estudo sorológico.

Após a verificação das propriedades bioquímicas, seguem-se os testes sorológicos para identificação completa do germe e separação em tipos.

O êxito do emprêgo de técnicas sorológicas para identificação das salmonelas fêz com que muitos laboratórios estendessem para o grupo das shigelas métodos semelhantes. A experiência da segunda guerra mundial confirmou a praticabilidade de tal processo, que é método rápido, seguro e capaz de identificar, com precisão, a totalidade das shigelas. O método é baseado na aglutinação específica macroscópica, em lâmina de determinada *Shigella*, pelo seu sôro específico.

Conhecida a possibilidade de existirem antígenos comuns entre as várias espécies de bacilos disenterícos e mesmo a outros germes da família *Enterobacteriaceae*, devemos usar somente soros diagnósticos que possuam unicamente anticorpo correspondente ao tipo específico da bactéria. Isto se consegue, verificando, inicialmente, quais as reações de grupo que apresenta determinado sôro, para as várias espécies de shigelas e, depois, removendo êsses anticorpos secundários, por meio de absorções apropriadas. Muitas vêzes, não é preciso absorver o sôro, bastando testá-lo em várias diluições, para se conseguir uma ótima, onde há somente aglutinação para o germe que se deseja. Quando tratarmos da sorologia do grupo paradisenteríco, descreveremos, detalhadamente, os métodos por nós usados para obtenção de soros monovalentes.

A identificação pode ser feita diretamente das placas de isolamento, bastando emulsionar, em solução fisiológica, as colônias suspeitas e testá-

las, com soros específicos, em lâmina ; aglutinação positiva com sôro será suficiente para estabelecer o diagnóstico do germe.

Esse processo só deve ser usado quando houver muita urgência. Sugerimos isolar, primeiramente, as colônias suspeitas em tríplice açúcar e, dos tubos com fermentação tipo *Shigella*, proceder às provas de aglutinação do seguinte modo :

- 1) colocar, aproximadamente, 0,5cm³ de solução fisiológica no tubo de tríplice açúcar ;
- 2) com uma pipeta estirada, tendo a ponta encastoadada frouxamente com algodão hidrófilo, emulsionar, na solução fisiológica, todos os germes da parte inclinada do meio ;
- 3) aspirar a emulsão através do algodão ;
- 4) colocar uma gôta dessa emulsão sôbre vários quadrados de uma placa de vidro quadriculada. Sôbre a gôta da emulsão, pingar uma gôta do sôro. Misturar bem sôro e emulsão com uma alça e verificar com qual sôro há aglutinação. Aglutinação positiva evidente com um sôro é suficiente para terminar o exame, dispensando outras provas complementares.

É indispensável verificar sempre se a suspensão do germe em análise é estável em solução fisiológica, bastando, para isso, colocar uma gôta da suspensão na placa de vidro e constatar se não é auto-aglutinável.

É aconselhável colocar as emulsões, antes de serem testadas, 10 minutos, num banho-maria em ebulição. Existem certas espécies de bacilos disentéricos que possuem antígenos de superfície termolábeis, que impedem a aglutinação e que, com essa prática, são destruídos.

Dado o grande número de tipos de bacilos disentéricos, torna-se dispendioso o emprêgo de todos os soros para a identificação. Para isso, achamos muito útil o emprêgo de soros polivalentes específicos, as mais das vezes suficientes para a rotina diária.

Usamos 4 soros polivalentes :

- 1) Sôro polivalente *Sh. paradysenterix* (I-VI)
- 2) Sôro polivalente *Sh. paradysenterix* (VII-XII)
- 3) Sôro polivalente *Sh. alkalescens*
- 4) Sôro polivalente *Sh. sonnei*

Os dois primeiros são preparados tomando-se os tipos I a VI e VII a XII, que são semeados em tubos de ágar e incubados, 24 horas, em estufa a 37.°C. O crescimento bacteriano é raspado e emulsionado em solução fisiológica ; num 1.° frasco, misturam-se todos os tipos, de I a VI, e, num 2.°, os de VII a XII ; agita-se bem e estandardizam-se as emulsões para 1.000 milhões de germes por cm³. Injetar, na veia de 2 coelhos, 5 inoculações, em dias alternados, começando com 0,5, aumentando 0,1 nas seguintes. Depois de 5 dias da última inoculação, sangrar o animal e verificar se o sôro aglutina todos os germes que entraram em sua preparação ; verificar se existem reações cruzadas com todos os outros tipos de shigelas ; remover as aglutininas comuns, por absorção ou por diluição.

Em geral, os soros assim preparados não aglutinam bem as amostras correspondentes ao tipo VI, motivo pelo qual é útil empregar, na emulsão, maior quantidade desse germe, ou melhor, fazer uma 6.^a inoculação no coelho com 1 cm³ de 1.000 milhões de germes do tipo VI. A observação indica, quase sempre, a necessidade de se absorverem esses soros com *Sh. sonnei*, *Sh. alkalescens* e *S. typhi*.

Para o grupo VII a XII os mesmos cuidados são necessários, e aqui também encontramos aglutinações cruzadas para *Sh. sonnei* fase II e *Sh. alkalescens*.

Consideramos, como soro polivalente *alkalescens*, um soro preparado da mesma maneira, usando-se como antígenos *Sh. alkalescens* tipo I e *Shigella* tipo *tietê*.

Os mesmos cuidados são necessários; com este soro as aglutinações cruzadas mais freqüentes se dão com *Sh. paradysenterix* e *Sh. sonnei*.

Usamos, para o preparo do soro polivalente *sonnei*, amostras de *Sh. sonnei* em fase I e II. Preparo e verificação idênticos aos anteriores. Reações cruzadas mais freqüentes com *S. typhi* e *Sh. paradysenterix* tipo XI.

Resumindo, pronto o soro polivalente, verificado que aglutina bem com todas amostras que entraram no seu preparo, observar quais outras espécies de shigela também são aglutinadas por esse soro. Tentar diluir, de modo a afastar aglutinações de grupo; se não for possível, absorvê-lo com as amostras que têm antígenos comuns.

Sabendo-se que as shigelas do grupo manita-negativa são raras entre nós, não usamos soros polivalentes para sua identificação. Para todo germe suspeito de *Shigella*, que não aglutina com nenhum desses soros polivalentes, usamos soros monovalentes correspondentes a cada uma das espécies do grupo manita-negativa. No caso de também não haver aglutinação, esse germe deve ser estudado mais detalhadamente, levando-se em conta suas características biomorfológicas e antigênicas.

Usando esse processo, há alguns anos, sempre comparando com os resultados das provas bioquímicas, não temos discordâncias e, de certa maneira, tem-nos dado resultados mais satisfatórios que os conseguidos com as provas bioquímicas.

Em nosso Laboratório, quando é o caso, confirmamos os resultados dos soros polivalentes, com soros monovalentes tipo-específicos e nunca tivemos discordâncias entre os dois soros.

À primeira vista, parece ser difícil o emprêgo de um número tão grande de soros para se chegar a um resultado. Entretanto, se conhecermos a incidência das várias espécies de bacilos disentéricos numa dada região, o problema torna-se mais fácil. Em São Paulo, verificamos que cerca de 90% dos casos de disenterias bacilares são causados por 3 tipos de bacilos, na seguinte ordem: *Sh. paradysenterix*, *Sh. sonnei*, *Sh. alkalescens*, seguidas dos outros cuja incidência varia conforme os anos. Do grupo mais freqüente (*Sh. paradysenterix*), cerca de 98% são causados por bacilos dos tipos I a VI, razão pela qual o emprêgo somente dos 3 soros polivalentes (*Sh. paradysenterix* I a VI, *Sh. sonnei* e *Sh. alkalescens*) será suficiente para a grande maioria dos casos.

WHEELER (1944a) e FERGUSSON e colab. (1947) utilizaram o processo rápido de identificação dos bacilos disentéricos pela aglutinação macroscópica em lâmina e chegaram a resultados muito satisfatórios, o que nos induziu a proceder do mesmo modo. Até agora, não notamos discordância alguma com o método bioquímico. Como já dissemos, é o processo sorológico o único que permite diferenciar tipos de bacilos disentéricos, o que não se consegue pelos métodos bioquímicos.

Foram êsses os métodos que utilizamos para isolar e identificar bacilos disentéricos em fezes. Em capítulos separados, estudaremos, detalhadamente, cada um dos tipos de shigelas patogênicas para o homem.

Não pretendemos estabelecer um quadro de classificação ; o seu arranjo corresponde à diferenciação bioquímica anteriormente descrita, baseado em reduzido número de provas, para finalidade descritiva.

Dividimos os bacilos disentéricos em 3 grupos, de acôrdo com a acidificação ou não da lactose e da manita.

I grupo : manita + lactose —	{	<i>Sh. paradysenteriaë</i> <i>Sh. alkalescens</i> <i>Sh. tietê</i>
II grupo : manita + lactose +	{	<i>Sh. sonnei</i> <i>Sh. dispar</i>
III grupo : manita — lactose —	{	<i>Sh. dysenteriaë</i> <i>Sh. ambigua</i> <i>Sh. sp. grupo Large-Sachs</i>

SHIGELLA PARADYSENTERIÆ

A *Shigella paradysenteriaë* (Collins) Weldin, ou grupo paradisentérico, é constituída por uma variedade grande de tipos de bacilos disentéricos, todos êles possuindo em comum certas propriedades bioquímicas.

Êsses bacilos são responsáveis pela grande maioria das shigeloses humanas, estando os vários autores, hoje em dia, acordes em considerá-los patogênicos para o homem, uma vez que todos os membros dêsse grupo já foram reconhecidos como agentes disenterígenos em várias partes do mundo.

Cabe a FLEXNER (1900) a primeira descrição de um bacilo dêste grupo ; isolou-o nas Filipinas, de casos de disenteria. No mesmo ano, STRONG e MUSGRAVE (1900), também nas Filipinas, isolaram outro componente do grupo e, mais tarde, HISS e RUSSEL (1903) descreveram um terceiro. Na 1.ª tentativa de classificação dos bacilos disentéricos feita por HISS (1904), todos êsses germes foram colocados no grupo dos fermentadores da manita, propondo êsse autor a utilização de alguns carboidratos para separação dessas três variedades. Êsta classificação, apesar de estar longe da realidade, foi e ainda continua sendo largamente citada na literatura médica.

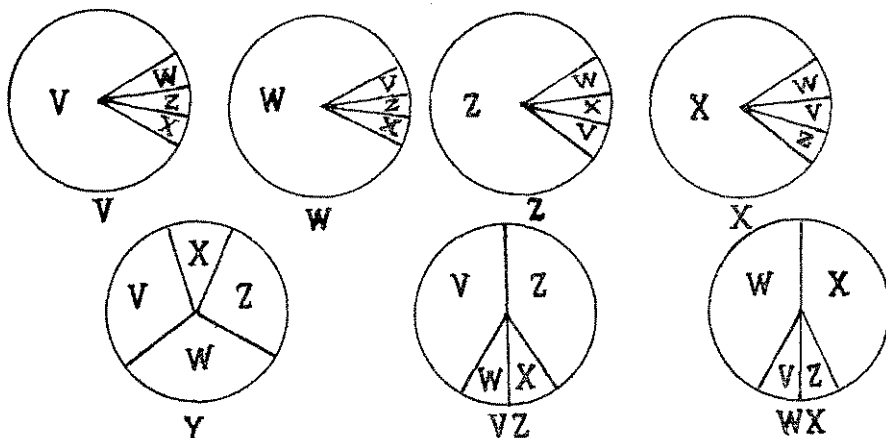
KRUSE e colab. (1907) foram os primeiros a mostrar a grande complexidade sorológica do grupo fermentador da manita. Os tipos descritos por esses autores não podem, hoje em dia, ser comparados aos presentemente conhecidos. Investigações posteriores de MURRAY, em 1918, e GETTINGS, em 1919, (*In* TOPLEY e WILSON, 1946) e, principalmente, de ANDREWES e INMAN (1919) foram o ponto de partida para a diferenciação sorológica do grupo paradisentérico. Apesar dessas verificações, BOJLEN (1934) ainda procurou estabelecer relações entre a fermentação da manita, da sacarose e da maltose com os diferentes grupos sorológicos, mas os seus resultados não obtiveram confirmação.

Provas inofismáveis do pouco valor das provas de fermentação para o reconhecimento dos vários tipos podem ser encontrados nos trabalhos de KRUSE e colab. (1907) e, entre nós, nas verificações feitas por ASSIS (1930). Hoje em dia, somente algumas delas são utilizadas; assim mesmo, para diferenciação com outros bacilos disentéricos; as mais usadas podem ser assim agrupadas:

	+ Dextrose
	— Lactose
	— Sacarose
	+ Manita
	— Xilose
<i>Sh. paradysenterix</i>	— Glicerina
	+ Dulcita
	— Salicina
	+ Indol
	— Uréia
	— Citrato
	— V. P.

Principalmente com os trabalhos de ANDREWES e INMAN (1918), a diferenciação sorológica dos vários tipos do grupo paradisentérico começou a ser conhecida. Estudaram esses autores 116 amostras de bacilos paradisentéricos, concluindo que, em todo bacilo Flexner, existem pelo menos 4 componentes antigênicos diversos, distribuídos em proporções variáveis para cada amostra. Em algumas culturas, haveria grande preponderância de determinado antígeno sobre os demais, caracterizando, por assim dizer, um tipo. Estabeleceram 4 tipos sorológicos V, W, X e Z, de acordo com o antígeno predominante, e um 5.º tipo, que foi denominado Y, possuindo quantidades mais ou menos equivalentes dos antígenos V, W e Z, associados a pequena quantidade de X. Encontraram ainda 2 sub-tipos VZ e WX, variantes dos tipos V e W, com a particularidade de conterem grande proporção dos antígenos Z e X. Esquemáticamente, os conceitos de Andrewes e Inman podem ser assim representados:

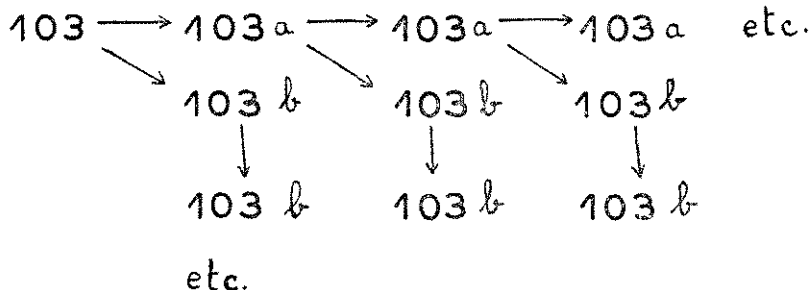
FIGURA N.º 1



DAVISON (1920), entre outros, mostrou ser a classificação de Andrewes e Inman incompleta; não podia colocar dentro desse esquema muitas amostras isoladas por ele. BOYD (1938), publicando suas observações sobre o comportamento sorológico de 4.856 culturas de *Sh. paradysenteriae*, isoladas, em sua maioria, na Índia, verificou que cerca de $\frac{3}{4}$ dessas culturas podiam ser caracterizadas como alguns dos tipos anteriormente descritos por Andrewes e Inman. Com as restantes, estabeleceu a existência de 9 tipos sorológicos até então não conhecidos; 3 desses tipos (amostras Boyd 103, P 119 e Boyd 88) estavam relacionados, sorologicamente, com os tipos V, W e Z de Andrewes e Inman, ao passo que, dos 6 tipos restantes, (amostras Boyd 170, P 288, P 274, D 1, D 19 e P 143), apenas a P 143 revelava possuir pequena quantidade de antígeno em comum com os primitivos tipos de Andrewes e Inman.

Os estudos de Boyd levaram-no a discordar das conclusões de Andrewes e Inman, relativamente à estrutura antigênica do grupo Flexner. Observando fenômenos de variação em um dos seus tipos (amostra B 103), pôde demonstrar que esse fenômeno envolvia uma modificação fundamental na estrutura antigênica. Em subculturas sucessivas, a amostra B 103 originava 2 tipos de colônias (fig. 1), uma das quais (a) reproduzia, integralmente, os característicos morfológicos da amostra, ao passo que a outra (b) era va-

FIGURA N.º 2

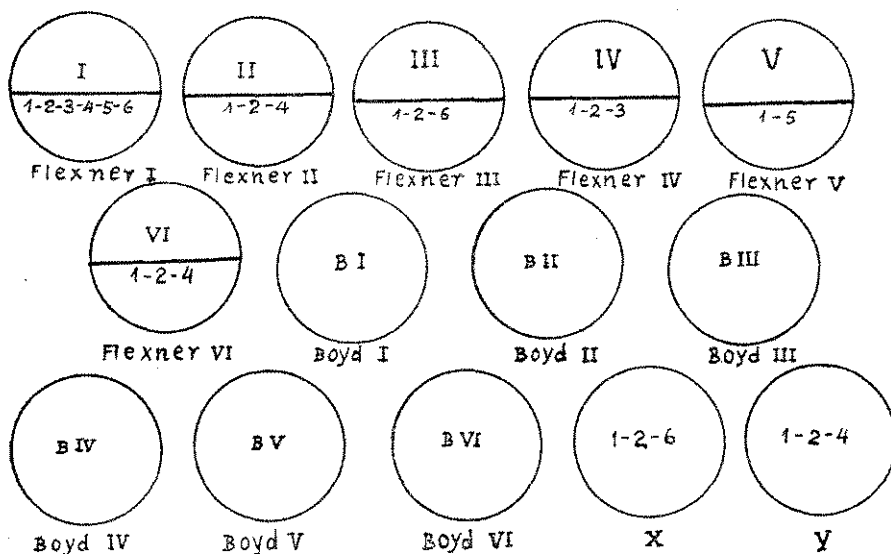


riante incompleta da primeira, incapaz de reverter ao tipo original, produzindo, exclusivamente, culturas do seu próprio tipo.

Por meio de provas de aglutinação cruzada, chegou à conclusão de que a amostra 103 A possuía 2 antígenos diversos: um antígeno tipo-específico que lhe era próprio e um antígeno de grupo que êle compartilhava com as amostras V, W, X, Y e Z. A variante 103 B, ao contrário, possuía apenas o antígeno de grupo, pois era incapaz de remover as aglutininas tipo-específicas do sôro 103 A; teria sofrido processo degenerativo com perda do antígeno específico característico da amostra original, conservando o antígeno de grupo o qual, por ser menos especializado, seria mais resistente a variações involutivas. Êstes fenômenos de variação foram observados por Boyd, de modo mais ou menos completo, em outros tipos de *Sh. paradyserteriae* e representariam tendência normal dos componentes da espécie nas condições artificiais de cultura. Baseado em suas observações, fruto de numerosas experiências de aglutinações cruzadas e absorções de aglutininas, Boyd negou as conclusões de Andrewes e Inman, relativas à constituição antigênica do grupo Flexner. Cada tipo não possuiria uma quantidade predominante de um antígeno específico e quantidades menores dos antígenos específicos dos outros tipos, como admitiam aqueles autores; cada tipo possuiria um antígeno próprio, característico, não compartilhado pelos demais tipos e a relação entre os diversos membros do grupo Flexner seria estabelecida através de um antígeno de grupo comum a todos. Não conseguiu demonstrar um antígeno tipo-específico nas amostras X e Y de Andrewes e Inman, concluindo que êstes dois tipos deveriam ser considerados como variantes dos tipos Z, W e 103, que perderam seus antígenos tipo-específicos, conservando somente seu antígeno de grupo.

Esquemáticamente, os vários tipos antigênicos criados por Boyd podem ser assim representados:

FIGURA N.º 3



Na figura 3, os algarismos romanos representam o antígeno tipo-específico e o complexo antigênico comum aos vários tipos é apresentado em algarismos arábicos reproduzido de maneira simplificada no esquema.

Boyd também não encontrou os chamados tipos mixtos de Andrewes e Inman.

WHEELER (1944), revendo a constituição antigênica do grupo paradisentérico, confirmou plenamente os trabalhos de Boyd. Para êle também seriam diferenças qualitativas e não quantitativas, que importariam na diferenciação dos vários tipos. Chega a conclusões um pouco diversas quanto ao antígeno de grupo, que, para Wheeler, seria constituído por 9 componentes diversos, um dos quais existe em todos os membros do grupo. Wheeler também mostrou que um antígeno tipo-específico pode estar ligado a antígenos de grupos diferentes, o que permite diferenciar 2 germes com o mesmo antígeno tipo-específico, pelo seu conteúdo diverso em antígenos de grupo.

WEIL e colab. (1944), ao contrário de Boyd e Wheeler, chega a conclusões semelhantes às primitivas de Andrewes e Inman, pois aceita a validade dos tipos X e Y e acredita que os vários tipos sejam caracterizados por um componente primário associado a outros antígenos quantitativamente menos importantes e, por isso, denominados secundários. Um antígeno primário, isto é, predominante em certa amostra, poderá ser secundário em outra. Weil identificou 14 antígenos diferentes nos bacilos paradisentéricos e a predominância de um desses antígenos é o que caracteriza a amostra como tipo sorológico definido. Baseou suas observações, não só em provas de absorção de aglutininas, como também em provas de proteção, utilizando embrião de galinha. Argumentou que a existência de um antígeno, comum a cerca de 80% dos bacilos Flexner mais frequentemente encontrados, levaria a se obter elevado grau de proteção cruzada quando qualquer uma das amostras fosse utilizada para imunização; verificou que tal não existe e o que confere proteção é o antígeno presente em maior quantidade. Por meio de soros devidamente absorvidos, dividiu o grupo Flexner em uma série de tipos, utilizando, para êsse fim, soros aglutinantes monovalentes.

Sendo as diferenças antigênicas de ordem quantitativa e não qualitativa, entre os vários tipos, admite, para explicar a possibilidade de se obter um soro monovalente, a hipótese de diferenças funcionais entre os antígenos primários e secundários, isto é, os antígenos secundários estariam, por assim dizer, protegidos no microrganismo intacto de tal forma que, quando postos em contacto "in vitro" com soros possuindo anticorpos a êles correspondentes, não são acessíveis a êsses anticorpos. A diferença entre um tipo e outro seria dada por posições diferentes dos vários antígenos dentro do corpo bacteriano.

Sendo difícil estabelecer a correspondência entre os tipos sorológicos descritos por KRUSE (1907), LENTZ e PRIGGE (1931) e AOKI (1921), deixamos de fazê-lo, estando, no quadro 4 somente mencionados os tipos sorológicos descritos pelos autores anteriormente citados.

Êste assunto já foi objeto de estudos por nós realizados (1948) e as conclusões a que chegamos parecem-nos permitir o uso do esquema proposto por Boyd e modificado por Wheeler como o mais simples e talvez o que mais

QUADRO 4

Andrewes e Inman	Boyd	Wheeler	Weil
V	V	I	I
W	W	II	II
Z	Z	III	III
—	Boyd 103	IV	IV
—	Boyd P 119	V	V
—	Boyd 88	VI	VI
X	—	—	VII
Y	—	—	VIII
—	Boyd 170	VII	IX
—	Boyd P 288	VIII	X
—	Boyd P 274	IX	XIV
—	Boyd D 1	X	XI
—	Boyd D 19	XI	XII
—	Boyd P 143	XII	XIII

se aproxime da realidade. Assim sendo, usamos, para o grupo paradisentérico, a nomenclatura proposta por Wheeler.

Não é necessário insistir na grande importância médico-sanitária da tipagem dos bacilos paradisentéricos isolados nas diversas partes do mundo. Sem esse recurso que oferece o laboratório, não é possível propor-se um tipo de vacina para uma região; também não se poderia opinar sobre a patogenicidade dos vários componentes do grupo e, por último, verificar a existência de novos tipos, algumas vezes importantes em determinadas regiões. Qualquer trabalho epidemiológico perderia grande parte de seu valor se não fosse completado pelos dados que a sorologia oferece.

No Brasil, Assis e colab. (1946) foram os primeiros a verificar a incidência dos vários tipos de bacilos paradisentéricos no Rio de Janeiro. ALMEIDA e colab. (1947) fizeram o mesmo em São Paulo e os resultados obtidos por esses autores estão de acordo com o que já foi verificado em outras partes do mundo. Em São Paulo, somente os tipos IX e X não foram encontrados, o mesmo tendo sido verificado no Rio de Janeiro.

Na última revisão sobre o assunto feita por WEIL (1947), encontramos dados pormenorizados, por autor e região, da incidência dos bacilos paradisentéricos, mostrando que os diversos tipos vêm sendo encontrados em todas as partes, não pairando mais dúvidas sobre tipos de patogenicidade duvidosa.

Em nosso Laboratório, seguindo métodos propostos por WHEELER (1944, 1944a), realizamos a tipagem de todas as amostras isoladas por nós na cidade de São Paulo, de 1946 ao 1.º semestre de 1950. Os resultados estão representados no quadro na parte final deste trabalho.

A seguir, vamos descrever os métodos que utilizamos para preparação dos soros usados na tipagem dos bacilos paradisentéricos. Inicialmente, verificamos estarem as amostras em fase S. Inoculamos, na veia de coelhos, em dias alternados, na quantidade de 1 cm³, doses crescentes da suspensão de germes. Total de 5 inoculações, perfazendo 5.000 milhões de germes.

As duas primeiras inoculações foram subcutâneas, com germes mortos pelo formol ; as três últimas, por via venosa, usando-se germes vivos.

Cinco dias após a última inoculação, procedíamos à sangria exploradora, verificando-se o título dos soros obtidos fazendo-se aglutinações em tubo a 37.° C, incubados por 24 horas. Todos os soros com título de 1/3.200 ou mais foram considerados satisfatórios.

Para obter um soro tipo-específico monovalente, empregamos o seguinte método :

Diluir o sôro a 1/10 em salina e fazer a aglutinação em lâmina com amostras de bacilos disentéricos em fase S, incluindo amostras representativas de cada espécie e tipo, assim como amostras de *Salmonella typhi*. Se possível, fazer aglutinação com 4 ou mais amostras de Flexner X e o mesmo número de Y.

Observar cada aglutinação durante 5 minutos, no mínimo.

Após observar as aglutinações em lâmina, escolher, como raças absorventes, as que tiverem dado as reações de aglutinação mais fortes. Geralmente, as amostras X e Y estão entre as que dão reações mais fortes, pelo fato de conterem maior quantidade de antígenos de grupo comuns aos vários tipos do grupo paradisentérico. Nesse caso, usar X e Y para as primeiras absorções.

A quantidade de germes a ser empregada nas absorções é determinada por tentativa.

Os germes para absorção são obtidos semeando-se frascos de Roux ou placas de alumínio (25x25) com ágar comum. A semeadura é feita inicialmente em caldo comum, incubado por 6 horas, e, depois, repicado para o ágar. O caldo deve ser usado somente num volume que dê para umidecer a placa ou a garrafa, em geral 1 ou 2 cm³. Preferimos usar placas de alumínio, por ser mais fácil retirar o crescimento microbiano pela simples raspagem do meio. Na maioria das vezes, foi suficiente uma placa de 25x25 para absorção de 15 cm³ de sôro diluído. As absorções sempre foram realizadas em banho-maria, durante 2 horas, no fim das quais a mistura é centrifugada e o líquido sobrenadante retirado.

Como exemplo, vamos reproduzir o que foi feito para preparação de um sôro tipo-específico I. Amostra escolhida tipo I recebida de K. M. Wheeler. Inicialmente, foram verificadas as condições de pureza da cultura. Inoculação em coelho, como foi acima descrito. A sangria de prova mostrou ter o sôro o título de 1/6.400, portanto satisfatório. Sôro diluído a 1/10 e experimentado com tôdas as variedades e tipos de bacilos disentéricos. Aglutinação rápida e total com amostras X, Y e bacilo paradisentérico tipo III. Aglutinações menos intensas com os tipos II, IV, V e VI. Absorção com 2 amostras X, 2 amostras Y e 1 amostra tipo III, 2 horas, a 37.° C, em banho-maria. Em geral, se a absorção for completa, grande porção dos germes permanece em suspensão ; se for incompleta, a totalidade dos germes será aglutinada. Centrifugar e aspirar o sobrenadante. Verificar o sôro depois de absorvido com tôdas as amostras que aglutinaram de início, antes da absorção. No caso presente, foram necessárias 2 absorções com amostras X e Y e tipo III, para remover tôdas as aglutininas de grupo e tornar o sôro monovalente. Fazer diluições do sôro absorvido a 1/15 e 1/20 : se também houver aglutinação rápida e total nessas diluições com a

amostra que serviu para seu preparo, o sôro todo poderá ser usado nessas diluições. Adicionar ácido fênico como preservativo (5 por mil).

Preparamos, usando ésta técnica, 12 soros monovalentes que correspondem à classificação de Wheeler I-XII. Sômente encontramos frações antigênicas comuns a outras shigelas, com o sôro IX (P274) e a *Sh. alkalescens* e sôro XI (D 19), que possuía uma fração da *Sh. sonnei* em fase II. Em ambos os casos, foi fácil remover dos soros essas frações antigênicas.

Queremos ainda chamar a atenção para a dificuldade de se obterem coelhos cujo sôro não possuía anticorpos para os bacilos paradisentéricos. Testamos o sôro de aproximadamente 60 animais, para conseguirmos sômente 6 nos quais não existiam aglutininas naturais. Essa eventualidade precisa ser bem verificada, porque, algumas vêzes, o sôro normal do coelho possui aglutininas em títulos elevados, fato êste já verificado, anteriormente, por BOYD (1940).

Algumas vêzes, também fomos obrigados a absorver os soros com *S. typhi*, o que também já foi verificado por FERGUSON e colab. (1947).

Outros métodos de tipagem já foram propostos. HARDY e colab. (1943) descreveram um método por aglutinação em tubo, com soros não absorvidos. Devemos lembrar que, aqui, as causas de êrro podem ser muito grandes, devido à interferência dos antígenos de grupo. CONZALES e OTERO (1945) propoem a tipagem pela reação de precipitação. Os resultados obtidos foram inteiramente satisfatórios, mas o método é muito mais trabalhoso que o processo acima descrito.

Talvez o fracionamento dos bacilos paradisentéricos por processos químicos venha indicar quais as diferenças de um tipo para outro. Vários autores se ocuparam do assunto e, em resumo, estas são as conclusões.

Observações antigas, quanto à estrutura química dos antígenos do grupo disentérico, mostraram a presença de polisacarídeos específicos nos bacilos Shiga, Flexner e *sonnei*. Mais recentemente, BOIVIN e MESROBEAUNU (*In* TOPLEY e WILSON, 1946), tratando bacilos Flexner pelo ácido tricloroacético, mostraram que o antígeno completo dos bacilos paradisentéricos é constituído por polisacarídeos ligados a compostos nítricos e lipóidicos. GOEBEL e colab. (1945), CARPENTER (1943), PERLMAN e GOEBEL (1946) e SMOLENS e colab. (1946) mostram que cada tipo de shigela possui um antígeno somático composto por um único antígeno complexo. Acentuam, entretanto, não ser possível, dentro de nossos conhecimentos atuais, eliminar a possibilidade de o antígeno somático específico ser substância única, livre de possíveis componentes de grupo.

Outro campo que também apresenta grande interesse é o da existência de antígenos comuns a outras shigelas, salmonelas e coliformes e à *Sh. paradysenteriae*.

FERGUSON e WHEELER (1946) verificam relações entre *paracoli* e Flexner. BORNSTEIN, SAPHRA e DANIELS (1941), com as salmonelas. FERGUSON e colab. (1947) chamam a atenção para o fato de ser desnecessário às vêzes, absorver os soros do grupo Flexner com *S. typhi*, devido à existência de antígenos comuns. Nós (1948a) encontramos antígeno de *Salmonella* IX numa amostra de *Sh. paradysenteriae* tipo II. PLANET DO AMARAL (1949) também encontrou relações antigênicas entre bacilo Flexner tipo II e salmonelas.

Pesquisando a existência de antígenos do grupo paradisentérico em cerca de 2.000 amostras de bacilos do grupo coliforme, tivemos, inúmeras vezes, oportunidade de encontrar reações de aglutinação com os antígenos de grupo dos paradisentéricos. Entretanto, essas amostras, de modo geral, perdiam o componente comum ao grupo Flexner, depois de algumas passagens nos meios artificiais. Uma delas, que estudamos em particular, possuía uma fração antigênica semelhante ao bacilo Flexner tipo II, sendo aglutinado por um soro Flexner tipo II total até diluição 1/1280 (título do soro 1/3.200) e pelo soro tipo II (absorvido) até 1/320. O soro do doente aglutinava não só a amostra do coliforme como amostra Flexner II até 1/640, não tendo sido possível isolar das fezes, em 2 culturas feitas, bacilo paradisentérico.

Existem ainda 2 tipos de bacilos paradisentéricos que, pelas anomalias de seu comportamento bioquímico, merecem especial menção.

CLAYTON e WARREN (1929), estudando um surto disentérico na cidade de Newcastle (Inglaterra), em 1925, isolaram um germe que, para eles, seria o responsável pela epidemia, mas que não podia ser classificado dentro dos esquemas propostos para identificação dos bacilos disentéricos. Apresentava a particularidade de produzir pequena quantidade de gás na dextrose, dulcita e maltose e de não acidificar a manita. Sob o ponto de vista sorológico, possuíam esses germes antígenos comuns com o grupo paradisentérico (V, W, Y e Z de Andrewes e Inman) mas também possuíam antígenos próprios. Posteriormente, DOWNIE e colab. (1933) isolaram, na cidade de Manchester (Inglaterra), um germe semelhante ao bacilo *newcastle*, caracterizando-se pela produção de ácido e gás na manita, sendo as demais reações culturais e comportamento sorológico inteiramente idênticos aos do bacilo *newcastle*. BOYD (1938) demonstrou que esses 2 germes deveriam ser enquadrados dentro do grupo paradisentérico, porque ambos eram antigênicamente idênticos ao bacilo paradisentérico isolado por ele na Índia e conhecido como tipo Boyd 88. Ficou, assim, esclarecida a posição sistemática dos bacilos *newcastle* e *manchester*, atualmente conhecidos como bacilos disentéricos do grupo paradisentérico, classificados como tipo sorológico VI na classificação de Wheeler. A capacidade de produzir gás nos meios habituais de identificação, constituindo uma anormalidade bioquímica no enquadramento desses germes no gênero *Shigella*, não deve ser interpretada de maneira tão absoluta. Na literatura sobre o assunto, de alguns anos atrás, encontram-se referências à produção de pequenas quantidades de gás por bacilos disentéricos.

Recentemente, EWING e TAYLOR (1945), verificando o comportamento bioquímico de diversas amostras de *Sh. paradysenteriae* tipo VI, utilizando, como substrato nas provas de fermentação, 4 variedades de peptona, concluíram que o tipo de peptona usado influenciava na produção de gás. Portanto, a mesma amostra podia ser aerogênica ou não, dependendo do tipo de peptona utilizado.

Quanto à não utilização da manita, carboidrato chave na classificação dos paradisentéricos, já foi verificada, embora em caráter transitório, em outros bacilos paradisentéricos. Neste caso, poder-se-ia admitir que a característica se tornara fixa, não sendo esse fato suficiente para afastá-los do grupo paradisentérico, como o faz o MANUAL DE BERGEY (1948).

A presença de germes desse tipo já foi assinalada por LEITE RIBEIRO (1946) e MONTEIRO FILHO (1946), no Rio, e por ALMEIDA e colab. (1948), em São Paulo, quando chamamos a atenção para esse grupo que, pelo seu comportamento anômalo, pode se prestar a confusões com outros germes entéricos, motivando interpretações errôneas quanto à sua verdadeira significação patogênica.

Situação semelhante apresenta o bacilo disentérico descrito por DENIER e HUET (1912), que tinha a particularidade de fermentar a maltose, não alterando a lactose, manita e sacorose. Propuzeram a denominação de bacilo Saïgon, para especificar o local onde fôra isolado, tendo DENIER (1915) isolado esse germe em 18,78% dos casos de disenteria bacilar por êle verificados. Esse germe também tinha, como característica sorológica, ser aglutinado por soros anti-Flexner.

PACHECO e RODRIGUES (1928) isolaram, no Rio de Janeiro, um bacilo semelhante ao descrito por Denier e Huet ao qual denominaram *Shigella saïgonensis*. MONTEIRO (1947) isolou de um caso de disenteria em adulto um germe semelhante ao chamado tipo Saïgon. Estudou-o, comparativamente, com a amostra de Pacheco e Rodrigues, concluindo que ambas eram idênticas. Verificou também a alta aglutinabilidade da amostra Saïgon por um sôro Flexner polivalente, concluindo: "O bacilo Saïgon, pois, um tipo sorológico de *Sh. paradysenteriae*, compreendendo na sua estrutura um antígeno comum ao tipo Y (Hiss-Russel), quer se considere a independência deste tipo, quer seja considerado como fase de grupo de *Shigella flexner*. Entretanto, a sua constituição antigênica parece-nos bem mais complexa, exigindo um estudo sorológico apurado que prossegue no momento de escrevermos êste trabalho."

WEIL e colab. (1948), fazendo uma revisão sôbre as 2 amostras acima citadas e incluindo uma nova amostra, também isolada no Rio de Janeiro por Assis, de um caso de disenteria aguda, sugerem que êsses germes sejam considerados como *Shigella* tendo encontrado um antígeno "major" diferente de qualquer outro presente no comum dos bacilos disentéricos, e antígenos secundários, semelhantes aos encontrados na fase b da *Sh. paradysenteriae* tipo Boyd 103. Por último, sugeriram a denominação de *Sh. rio* para essa nova espécie.

Tivemos oportunidade, em 1944, de isolar um bacilo deste tipo. Nessa ocasião, verificamos que as suas propriedades bioquímicas e constituição antigênica se enquadravam nas características descritas por Denier e Huet. O quadro clínico era o de disenteria bacilar típica e as fezes do doente tinham muito muco e sangue. O sôro do doente, logo após a cura clínica, foi capaz de aglutinar o germe em questão até a diluição de 1/1.280.

Durante os anos de 1946 e 1947, amostras semelhantes foram sendo isoladas em nosso laboratório, motivo pelo que resolvemos estudá-las com maior cuidado.

Verificamos que todos germes isolados eram aglutinados totalmente por um sôro tipo-específico IV e por um sôro polivalente do grupo Flexner. Concluimos que esse germe deveria ser classificado como uma variante manita-negativa da amostra Boyd 103, ou *Sh. paradysenteriae* IV, uma vez que, segundo Boyd e Wheeler, para diferenciação dos vários tipos de *Sh. paradysenteriae*, devemos dar valor a variações qualitativas. As amostras

por nós isoladas possuíam o antígeno tipo-específico IVa, provavelmente com um antígeno de grupo diferente.

Essa conclusão não concorda com as verificações de WELL e colab. (1948) descrevendo um antígeno "major" diferente de qualquer outro presente no comum dos bacilos disentéricos, motivo pelo qual retornamos ao assunto.

Contrariando o que até hoje foi verificado, tivemos oportunidade de isolar de 2 casos uma amostra desse tipo que, em repiques sucessivos, adquiriu a propriedade de fermentar a manita, propriedade esta que se estabilizou, não nos sendo possível obter uma variante manita-negativa numa série de transplantes que fizemos para esse carboidrato.

Tivemos também a oportunidade de isolar de um caso típico de disenteria bacilar um bacilo paradisentérico tipo IV. Examinando, novamente, as fezes desse doente, uma semana e um ano depois da moléstia, isolamos um bacilo com as características do bacilo de Denier e Huet, o que nos leva a crer que se trate do mesmo germe com propriedades bioquímicas alteradas.

Verificamos um fato já observado por Monteiro e Pacheco, qual seja o da utilização tardia da xilose pelos germes desse grupo, o que não é comum ao grupo paradisentérico. As provas bioquímicas, a nosso ver, se mostravam contraditórias e insuficientes para o estudo do grupo, sendo necessário, portanto, se proceder à análise de sua constituição antigênica.

Preparamos 4 soros, a partir de amostras desse tipo, que haviam sido isoladas em nosso laboratório, e um 5.º com uma amostra rio II, que nos foi enviada por Arlindo de Assis.

Nessa ocasião, já tínhamos isolado 8 amostras manita-negativa e possuíamos 2 amostras rio (II e III). As provas de aglutinação direta com os 4 soros foram positivas para todas as amostras em títulos iguais ou próximos ao título do soro. Os soros absorvidos por qualquer das amostras usadas para as provas da aglutinação direta perdiam as suas aglutininas e, raramente, obtínhamos reações positivas além da diluição de 1/40. Assim sendo o grupo é antigênicamente uniforme, restando verificar as suas relações com o grupo *Sh. paradysenteriae*.

Tomamos, novamente, os 5 soros por nós preparados e verificamos aglutinação direta com os tipos *Sh. paradysenteriae* e I a VI e amostras X e Y.

No quadro 5 estão expressos os resultados que obtivemos.

QUADRO 5

Amostras <i>Sh. paradysente- riae</i>	Soro D 131	Soro D 121	Soro D 166	Soro D 689	Soro Rio II
	título 1/6400	título 1/12800	título 1/6400	título 1/3200	título 1/12800
I	1/640	1/1280	1/2560	1/1280	1/640
II	1/1280	1/640	1/2560	1/320	1/2560
III	1/640	1/1280	1/640	1/1280	5/10240
IVa	1/5120	1/5120	1/5120	1/5120	1/10260
V	1/1280	1/2560	1/5120	1/2560	1/640
VI	1/10	1/640	1/40	1/320	1/320
X	1/5120	1/2560	1/640	1/1280	1/5120
Y	1/5120	1/5120	1/5120	1/5120	1/10240

Logo de início, verificamos que todos os soros aglutinaram, de modo mais uniforme, os tipos paradisentéricos IV e Y, sendo variáveis os resultados com os outros tipos.

Absorvemos cada um dos soros com o tipo IVa e obtivemos os seguintes resultados :

QUADRO 6

	Sêro D 131 absorvido IVa	Sêro D 121 absorvido IVa	Sêro D 166 absorvido IVa	Sêro D 689 absorvido IVa	Sêro Rio II absorvido IVa
I	0	1/320	1/160	1/40	0
II	1/40	1/80	1/320	1/40	1/20
III	1/40	1/320	1/320	1/40	1/1280
IVa-b	0-1/320	0-1/320	0-1/320	0-1/320	0-1/320
V	1/320	1/320	1/320	1/320	1/320
VI	0	0	0	0	0
X	0	1/160	1/80	1/80	0
Y	1/320	1/320	1/320	1/320	0

Por essas provas de absorção, pensamos que as variações relativas ao comportamento antigênico das nossas amostras correspondem mais a variações no antígeno de grupo que a variações no antígeno tipo-específico, pois qualquer delas foi capaz de remover todos os anticorpos do sêro correspondentes ao tipo IVa, deixando ainda aglutininas para o tipo IVb, que, como já foi dito, é uma variante do tipo IVa.

Insistimos absorvendo êsse mesmo sêro, desta vez com IVb e Y, achando-se os resultados no quadro seguinte :

QUADRO 7

	Sêro D 131 absorvido IVa depois IVb e Y	Sêro D 121 absorvido IVa depois IVb e Y	Sêro D 166 absorvido IVa depois IVb e Y	Sêro D 689 absorvido IVa depois IVb e Y	Sêro Rio II absorvido IVa depois IVb e Y
I	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	1/640
IVa-b	0	0	0	0	0
V	1/20	0	0	1/80	1/160
VI	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0

As frações aglutinantes restantes puderam ser removidas do soro por absorção com os tipos III e V, o que demonstra que êsses germes são variantes manita-negativa do tipo IV da *Sh. paradysenterix*, algumas vêzes com antígenos de grupo diferentes do tipo IV clássico, mas comuns ao grupo paradisentérico.

Portanto, não vemos razão para criar um novo tipo de *Shigella* e preferimos classificá-los como variante manita-negativa da *Sh. paradysenterix* tipo IV.

NELSON (1947), tendo isolado culturas desse tipo, verificou o mesmo: identidade sorológica com a *Sh. paradysenterix* tipo IV. Variações semelhantes do antígeno de grupo também já foram encontradas por VEAZIE (1949) em amostras tipo IV, além das que já anteriormente foram descritas por Boyd.

No fim deste trabalho, daremos a freqüência dos vários tipos de bacilos paradisentéricos isolados nos anos de 1946 a 1950 (1.º semestre). De todos os bacilos disentéricos, o paradisentérico foi o mais comum, sendo interessante verificar que, excluído o tipo II (o mais freqüente), tivemos variações grandes na incidência dos vários tipos pelos vários anos.

Ainda no grupo paradisentérico deve ser incluída a mais nova de todas as shigelas, isto é, a *Sh. etousæ*, de HELLER e WILSON (1946), ou *Sh. la-vington*, descrita por LAVINGTON e colab. (1946).

Êste bacilo possui caracteres biomorfológicos idênticos aos do grupo paradisentérico. Não possui antígenos comuns com qualquer outra shigela descrita até hoje, mas suas propriedades bioquímicas se assemelham muito às da *Sh. paradysenterix* tipo XII, o que fez EWVING (1946) propor sua inclusão no grupo paradisentérico. Segundo orientação de Wheeler, êste novo tipo deverá ser *Sh. paradysenterix* tipo XIII. Até hoje, não tivemos notícia desse tipo haver sido isolado no Brasil.

SHIGELLA ALKALESCENS e SHIGELLA TIETÊ

A *Shigella alkalescens*, descrita pela 1.ª vez por ANDREWES (1918), pertence ao grupo dos bacilos disentéricos manita-xilose-indol-positivos. Andrewes, em sua descrição original, não lhe atribuiu importância patogênica para o homem, pelo fato de ser fraco produtor de anticorpos e não ser patogênico para o coelho.

Tal opinião perdurou por muitos anos, chegando mesmo alguns autores, como GILBERT e COLEMAN (1934), a acreditar que o bacilo *alkalescens* fosse um germe banal, aparecendo freqüentemente nos doentes com infecção eberthiana, aconselhando, nestes casos, a pesquisar, com mais cuidado, a presença do bacilo tífico.

BROWN e ANDERSON (1936) não conseguiram evidenciar nenhuma relação entre o bacilo *alkalescens* e o bacilo tífico. Em 28 casos de doentes com afecções intestinais, foi possível isolar êsse germe das fezes em 28,6%, ao passo que, de 129 indivíduos normais, só em 1,4% foi encontrado.

NABARRO e EDWARD (1939), fazendo uma revisão sobre o assunto, concluíram que o germe pode provocar disenterias agudas ou colites crônicas no homem, achando que os portadores assintomáticos são mais freqüentes

do que os encontrados para outros tipos de shigelas ; daí, talvez, a maior frequência da invasão secundária das vias urinárias e sangüíneas, por êsse germe. Entre nós, Assis (1939) foi o primeiro a atribuir-lhe papel patogênico, mostrando sua importância em patologia humana.

NETER (1942), na sua revisão sobre o gênero *Shigella*, admite que fatos positivos nos levam a crer que a *Sh. alkalescens* pode ocasionar formas graves ou ligeiras de enterites e constata, no sangue de doentes com bacilo *alkalescens* nas fezes, a presença de anticorpos específicos. Hoje em dia, não há mais dúvidas sobre o papel patogênico desempenhado pelo bacilo *alkalescens* e devemos ressaltar que muito se deve a Arlindo de Assis, no que respeita à elucidação desse problema.

Estabelecido esse ponto, passemos às propriedades bioquímicas diferenciais e à constituição antigênica do grupo. Dava-se muita importância, como caráter diferencial, à alcalinização do leite-tornassol e acidificação da dulcita e xilose, para diferenciação com o grupo Flexner.

ASSIS (1939) é de opinião que a glicerina a 5% é a única substância de valor diferencial entre a *Sh. alkalescens* e *Sh. flexneri*. Em trabalho posterior (1947), admite a possibilidade de existirem variantes acidificadoras da lactose, verificação já anteriormente feita por NABARRO e EDWARD (1939), tornando, portanto, difícil, muitas vezes, a identificação bioquímica do germe, aceitando esse autor ser de maior valor, para a identificação, o estudo sorológico da amostra.

O estudo da constituição antigênica foi iniciado por ANDREWES (1918) que, em sua descrição, se refere à sua pouca aglutinabilidade frente a soros específicos, notando ainda a existência de aglutininas comuns com bactérias do grupo Flexner ; WELCH e MICKLE (1934) relatam a presença, no soro *alkalescens*, de aglutininas para vários outros bacilos disentericos, chegando a conclusões semelhantes NETER e RAPPOLE (1938).

NETER (1938), estudando a constituição antigênica da *Sh. alkalescens*, conclui que existem pelo menos 2 antígenos : um característico da espécie e outro comum ao grupo paradisenterico. Assis (1939a), de modo geral, confirma as verificações de Neter quanto à individualidade sorológica da espécie e suas relações com os paradisentericos, mas mostrou que, dentro da espécie, pelo menos existem 2 sub-grupos sorológicos, denominados por ele de *alkalescens* tipo I e tipo II. STUART e colab. (1943), verificando 141 culturas típicas de *Sh. alkalescens* que correspondem ao tipo I de Assis, puderam individualizar 4 frações antigênicas do *B. alkalescens*, denominadas por eles de A, B, C e D, sendo que a fração A representa o antígeno tipo-específico da espécie *alkalescens* e as frações B, C e D são encontradas também em bacilos coliformes, do grupo *paracoli* e do grupo paradisenterico. Quanto ao tipo II de Assis, não encontraram nenhum antígeno em comum com o tipo I.

NETER (1944), estudando 2 amostras bioquimicamente semelhantes ao *B. alkalescens*, uma delas por ele isolada e outra recebida de W. H. Ewing com a denominação de amostra 2.193, foi de opinião que se deveria dividir a *Sh. alkalescens* em 4 tipos sorológicos : os 2 primeiros seriam os tipos descritos por Assis, o 3.º corresponde à amostra 2.193 e o 4.º, a uma amostra descrita por ele. Segundo Neter, cada um desses tipos possui um antígeno

específico que o caracteriza, podendo ainda ter antígenos secundários comuns a outras bactérias, principalmente para o grupo Flexner.

A existência de 4 tipos sorológicos de bacilos *alkalescens* tem sido motivo de controvérsias. Não há dúvida quanto às verificações de STUART e colab. (1943) com relação ao tipo I; o tipo II de Assis não é aceito como tipo válido de *Shigella*, por alguns autores, consoante se lê em publicação recente de EWING (1949). O tipo III, como se verifica pelo trabalho de Assis (1947), também ainda não foi bem definido e, finalmente, o tipo IV é representado até hoje por uma única amostra.

Em nosso laboratório, é bastante freqüente o isolamento de germes com características biomorfológicas de shigelas que, numa verificação su-

QUADRO 8

	Lactose	Dulcita	Sorbita	Leite tornassol		Lactose	Dulcita	Sorbita	Leite tornassol		Lactose	Dulcita	Sorbita	Leite tornassol		Lactose	Dulcita	Sorbita	Leite tornassol
1	—	+	+	Al	27	—	+	+	Al	53	—	+	+	Al	79	—	—	—	Al
2	—	—	+	Al	28	—	+	+	Al	54	—	+	+	Al	80	—	—	+	Al
3	—	+	+	Al	29	—	+	+	Al	55	—	+	+	Al	81	—	—	—	Al
4	—	+	+	Al	30	—	+	—	Al	56	+	+	+	Ac	82	—	—	—	Al
5	—	+	+	Al	31	—	+	+	Al	57	+	—	+	Ac	83	—	—	—	Al
6	—	+	+	Al	32	—	—	—	Al	58	+	+	+	Ac	84	—	—	—	Al
7	—	+	+	Al	33	—	+	+	Al	59	+	—	+	Ac	85	—	—	—	Al
8	—	+	+	Al	34	—	+	+	Al	60	+	+	+	Ac	86	+	—	—	Ac
9	—	+	+	Al	35	—	+	+	Al	61	+	—	+	Ac	87	+	—	—	Ac
10	—	+	+	Al	36	—	+	+	Al	62	+	—	—	Ac	88	+	—	—	Ac
11	—	—	+	Al	37	—	+	+	Al	63	+	—	+	Ac	89	+	—	—	Ac
12	—	+	+	Al	38	—	+	+	Al	64	+	—	+	Ac	90	+	—	—	Ac
13	—	—	—	Al	39	—	+	+	Al	65	+	+	+	Ac	91	+	—	—	Ac
14	—	—	—	Al	40	—	—	+	Al	66	+	—	+	Ac	92	+	—	—	Ac
15	—	+	+	Al	41	—	+	+	Al	67	—	+	—	Al	93	+	—	—	Ac
16	—	—	—	Al	42	—	—	+	Al	68	—	—	—	Al	94	+	—	—	Ac
17	—	+	+	Al	43	—	+	—	Al	69	—	—	—	Al	95	+	—	—	Ac
18	—	—	+	Al	44	—	+	—	Al	70	—	+	+	Al	96	+	—	+	Ac
19	—	+	+	Al	45	—	+	+	Al	71	—	—	—	Al	97	+	—	—	Ac
20	—	+	—	Al	46	—	+	—	Al	72	—	—	—	Al	98	+	+	—	Ac
21	—	+	—	Al	47	—	—	+	Al	73	—	—	—	Al	99	+	—	—	Ac
22	—	+	+	Al	48	—	+	+	Al	74	—	—	—	Al	100	+	—	—	Ac
23	—	—	+	Al	49	—	+	+	Al	75	—	—	—	Al	101	—	—	+	Al
24	—	+	+	Al	50	—	+	+	Al	76	—	—	—	Al	102	—	—	+	Al
25	—	+	+	Al	51	—	+	—	Al	77	—	—	—	Al					
26	—	+	+	Al	52	—	—	—	Al	78	—	—	—	Al					

mária de suas propriedades, se enquadram dentro do grupo *alkalescens*. Conseguimos reunir 102 amostras, aí incluindo as que nos foram enviadas por Arlindo de Assis, que nos serviram para as verificações que passamos a relatar.

Inicialmente, procedemos à verificação das propriedades bioquímicas de tôdas, utilizando os seguintes carboidratos: dextrose, lactose, sacarose, manita, maltose, xilose, dulcita, glicerina, sorbita e salicina em meio semi-sólido Hiss, com indicador de fenol vermelho, sendo a concentração do carboidrato de 1%, com exceção da glicerina, que usamos a 5%, conforme recomendação Assis (1939). Incubação de 20 dias, em estufa a 37.°C. Verificamos ainda a produção de indol (em água peptonada), hidrogênio sulfurado (papel acetato de chumbo), utilização do citrato (meio de Koser), capacidade de desdobrar uréia (meio de Stuart), ação sôbre o leite tornassolado, produção de acetilmetilcarbinol (Clark-Lubs) e verificação da motilidade em caldo comum, em sementeira de 24 horas à temperatura ambiente.

No quadro 8 estão tabelados os resultados obtidos.

No quadro, só foram anotados os carboidratos que apresentaram fermentação diversa para as várias amostras.

Tôdas as culturas acidificaram dextrose, manita, maltose, xilose e glicerina; não agiram sôbre a sacarose e a salicina, não utilizaram citrato, não desdobraram uréia, não produziram acetilmetilcarbinol e hidrogênio sulfurado; produziram indol e eram imóveis. Sendo estas propriedades comuns às shigelas, pensamos poder considerar tôdas as amostras como pertencentes ao gênero.

Analisando o quadro, verificamos que muitas das nossas amostras acidificaram a lactose e o leite tornassol, sendo também variável a ação dos germes sôbre a dulcita e a sorbita. No entanto, como já foi referido anteriormente, aceita-se, hoje em dia, que a *Sh. alkalescens* pode apresentar variantes acidificadoras da lactose, o que nos levou a completar a identificação por meio de provas de aglutinação, para depois comparar os resultados.

Preparamos 4 soros aglutinantes correspondendo aos 4 tipos sorológicos descritos por Neter; as amostras para o preparo dos soros nos foram fornecidas por Arlindo de Assis e tinham os números 53-648-2.193-9.734; as duas primeiras, isoladas por êle e as duas últimas, recebidas de E. Neter como sendo *Sh. alkalescens* tipo III e IV (Amostra 25, 74, 101 e 102).

O modo de preparação dos soros foi idêntico ao já descrito em capítulos anteriores. As provas de aglutinação foram feitas em estufa, a 37.°C, com incubação de 18 horas; a emulsão de germes usada como antígeno foi autoclavada por 1 hora, em vapor fluente. Esse método foi o que deu melhor resultado, em trabalho por nós realizado anteriormente (1942).

A diluição do sôro foi de 1/100 a 1/6.400.

No quadro seguinte, estão os resultados obtidos.

QUADRO 9

Amostra	Soro 53	Soro 648	Soro 2193	Soro 9731	Amostra	Soro 53	Soro 648	Soro 2193	Soro 9731	Amostra	Soro 53	Soro 648	Soro 2193	Soro 9731	Amostra	Soro 53	Soro 648	Soro 2193	Soro 9731
1	6400	0	0	0	27	6400	0	0	0	53	6400	0	0	0	79	0	6400	1600	0
2	6400	0	0	0	28	6400	0	0	0	54	6400	0	0	0	80	0	6400	1600	0
3	6400	100	0	0	29	6400	0	0	0	55	6400	0	0	0	81	0	6400	1600	0
4	6400	0	0	0	30	6400	0	0	0	56	6400	0	0	0	82	0	6400	3200	0
5	6400	0	0	0	31	6400	0	0	0	57	6400	0	0	0	83	0	6400	1600	0
6	6400	200	0	0	32	6400	0	0	0	58	6400	0	0	0	84	0	6400	1600	0
7	6400	0	0	0	33	6400	0	0	0	59	6400	0	0	0	85	0	6400	1600	0
8	6400	0	0	0	34	6400	0	0	0	60	6400	0	0	0	86	0	6400	1600	0
9	6400	0	0	0	35	6400	0	0	0	61	6400	0	0	0	87	0	6400	3200	0
10	6400	0	0	0	36	6400	0	0	0	62	6400	0	0	0	88	0	6400	1600	0
11	6400	0	0	0	37	6400	0	0	0	63	6400	0	0	0	89	0	6400	3200	0
12	6400	0	0	0	38	6400	0	0	0	64	6400	0	0	0	90	0	6400	1600	0
13	6400	100	0	0	39	6400	0	0	0	65	6400	0	0	0	91	0	6400	1600	0
14	6400	0	0	0	40	6400	0	0	0	66	6400	0	0	0	92	0	6400	1600	0
15	6400	0	0	0	41	6400	0	0	0	67	0	6400	1600	0	93	0	6400	1600	0
16	6400	0	0	0	42	6400	0	0	0	68	0	6400	1600	0	94	0	6400	1600	0
17	6400	0	0	0	43	6400	0	0	0	69	0	6400	3200	0	95	0	6400	1600	0
18	6400	0	0	0	44	6400	0	0	0	70	0	6400	1600	0	96	0	6400	1600	0
19	6400	0	0	0	45	6400	0	0	0	71	0	6400	1600	0	97	0	6400	1600	0
20	6400	0	0	0	46	6400	0	0	0	72	0	6400	1600	0	98	0	6400	1600	0
21	6400	0	0	0	47	6400	0	0	0	73	0	6400	1600	0	99	0	6400	1600	0
22	6400	0	0	0	48	6400	0	0	0	74	0	6400	1600	0	100	0	6400	1600	0
23	6400	0	0	0	49	6400	0	0	0	75	0	6400	1600	0	101	0	3200	6400	0
24	6400	0	0	0	50	6400	0	0	0	76	0	6400	3200	0	102	0	0	0	6400
25	6400	0	0	0	51	6400	100	0	0	77	0	6400	6400	0					
26	6400	0	0	0	52	6400	100	0	0	78	0	6400	3200	0					

Pelo quadro, verifica-se que o soro 53 aglutinou a maioria das amostras. Os soros 648 e 2.193 aglutinaram as mesmas amostras, se bem que em títulos diferentes, o que faz suspeitar não serem idênticos. O soro 9.731 só aglutinou a amostra que serviu para a sua preparação.

Tomamos 20 amostras pertencentes ao grupo 53, 10 lactose-positivas e 10 lactose-negativas; procedemos a absorções desse soro com cada uma das 20 amostras e, depois, testamos, novamente, frente a todas elas.

Verificamos que, apesar da ação variável sobre a lactose, todas as amostras testadas removeram as aglutininas do soro para si e para as outras. Todas as absorções feitas neste soro também removeram as aglutininas para a amostra que serviu para seu preparo, o que demonstra serem todas elas antigênicamente idênticas.

Nos quadros 10 e 11 estão os resultados das absorções feitas nos soros 468 e 2.193, com as amostras que foram aglutinadas por êles.

QUADRO 10

SÔRO 648

Absorvido com

Amostras	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	80	82	101	84	86	88	90	94	97
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	800	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1600	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	3200	0	0	0	0	0	0
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	3200	0	0	0	0	0	0

As absorções feitas com os soros 648 e 2.193 confirmaram a diferença já evidenciada pela aglutinação direta. As duas amostras possuem antígenos comuns, mas os antígenos principais são diferentes. Entre as amostras por nós estudadas, encontramos uma, de n.º 77, que parece constituir um tipo intermediário entre os grupos 648 e 2.193. Remove grande parte das aglutininas de ambos os soros, sem, entretanto, ser capaz de esgotar qualquer dos soros.

Comparando propriedades bioquímicas e sorológicas desses germes, verificamos que parece não ser acertado afastar, do grupo *alkalescens*, germes acidificadores da lactose, uma vez que são sorologicamente idênticos. Por outro lado, não existe um carboidrato de valor diferencial absoluto entre os grupos sorológicos. De todos utilizados por nós, foi a dulcita o que mostrou um comportamento mais constante e a maioria das amostras correspondentes ao grupo sorológico 53 acidificaram-na, ao passo que as do grupo 648 deixaram de fazê-lo.

QUADRO 11

SÔRO 2193

Absorvido com

Amostras	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	80	82	101	84	86	88	90	94	97
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
77	320	320	640	160	320	320	640	320	640	640	0	640	320	0	640	320	640	320	320	320
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	5120	5120	5120	5120	5120	5120	5120	5120	5120	5120	640	5120	5120	0	5120	5120	5120	5120	5120	5120
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Estas verificações, na parte referente à acidificação da lactose, estão de acôrdo com as anteriores de NABARRO e EDWARD (1939) e, principalmente, com as de ASSIS (1947).

Assim sendo, pudemos constatar a existência dos 2 tipos sorológicos de *Sh. alkalescens*, já descritos por Assis. Não encontramos, entre os germes por nós estudados, nenhum pertencente aos tipos III e IV.

Diante dessas propriedades bioquímicas variáveis e da regularidade no comportamento sorológico, acreditamos que o estudo do grupo *alkalescens* deva ser feito prevalecendo os caracteres antigênicos sôbre os biomorfológicos. Portanto o grupo sorológico I (sôro 53) representa o verdadeiro bacilo *alkalescens* e sua constituição antigênica, do que pudemos verificar, deve ser a que é descrita por STUART e colab. (1943).

O grupo sorológico II merece uma referência especial. Assis (1939), na descrição original, descreve um bacilo disenterico do grupo *alkalescens* acidificador da salicina, antigênicamente distinto do *B. alkalescens* clássico.

O fato de êsse germe acidificar a salicina e de ser constituído por uma só amostra fêz com que não fosse reconhecido como um bacilo disentérico e sim como possível coliforme. Ainda recentemente, EWING (1949) diz, textualmente, o seguinte: "It suffices to state that the so called *S. alkalescens* II is not a *Shigella alkalescens* type, nor, in fact, any *Shigella* type but is a member of the *Escherichia* group" (Ewing unpublished data; Kauffmann and Frantzen, personal communication).

Êsse ponto de vista parece-nos não concordar com os fatos. Em nosso laboratório, é freqüente o isolamento de germes identificáveis ao de Assis 648, com tôdas as características de *Shigella*. Já o isolamos de vários casos de disenteria bacilar aguda típica, tanto de adultos como de crianças e de casos de enterocolites crônicas.

As nossas amostras diferem das de Assis unicamente pela incapacidade de acidificar a salicina. Aliás, trabalhando com a amostra 648 e usando meio semi-sólido de Hiss, também não verificamos a acidificação da salicina.

Como já foi visto, apresentamos verificações feitas em 20 amostras isoladas por nós e que correspondem ao tipo II de Assis. Além dessas, já foram isoladas outras e sua freqüência, em S. Paulo, pode ser avaliada quando analisamos a incidência dos vários tipos de bacilos disentéricos, na parte final dêste trabalho.

Procuramos também estabelecer relações antigênicas entre êsse germe e outras shigelas; o componente antigênico comum entre as amostras 648 e tipo 2.193 já foi analisado. Não pudemos encontrar relações maiores com qualquer outro tipo de *Shigella*.

Assim sendo, estamos perfeitamente de acôrdo com ASSIS (1947a), que diz "... por enquanto, não existe ainda uma opinião geral bem aceita sôbre o que se deva chamar 'grupo alkalescens', o caminho mais lógico é individualizar o novo tipo por meio de uma denominação específica, baseada exclusivamente na sua constituição antigênica *major* e sem depender de possíveis divergências nos caracteres fermentativos das respectivas amostras individuais".

Em face dos fatos apresentados, achamos que essa bactéria deve ser considerada como um tipo de *Shigella*, sendo justa a denominação *Sh. tietê*, proposta por Assis.

WEIL e SLAFKOVSKY (1948) reconhecem também a *Sh. tietê* como um tipo válido de *Shigella*, encontrado, por enquanto, na Turquia e em localidades do Brasil, como se pode verificar pelo trabalho de Assis, anteriormente citado, assim como pelo relato de seu isolamento, em Belém do Pará, por VERNIN (1948).

Recentemente, CARPENTER e STUART (1950) são de opinião que *Sh. tietê* deve ser um tipo de *Sh. dispar* e que, para o futuro, se for reconhecida como tipo de *Sh. dispar*, tenha a denominação de *Proshigella tietê*.

Quanto ao grupo III e IV, nada fizemos além do que já foi referido; com relação ao grupo III, ASSIS (1947) mostra as vicissitudes por que tem passado êsse germe para ser incluído entre os bacilos disentéricos. Achamos que deva ser incluído no grupo da *Sh. tietê*, uma vez que possui antígenos

de grupo comuns e também pelo fato de existirem outros tipos nesse grupo, como nos faz suspeitar a nossa amostra 77.

Terminando, em nosso laboratório usamos somente as denominações de *Sh. alkalescens* para aqueles germes pertencentes ao tipo 53 e os correspondentes ao tipo 648 são classificados como *Sh. tieté*, tipo autônomo de *Shigella*, parecendo-nos serem os únicos germes desses tipos existentes entre nós.

SHIGELLA SONNEI

A primeira descrição do bacilo de Sonne como possível agente de disenteria bacilar foi feita por DUVAL (1904).

Sua ação patogênica foi confirmada, mais tarde, principalmente pelos trabalhos de Sonne, na Dinamarca (vide MONTEIRO FILHO, 1947); daí a razão de o bacilo trazer seu nome.

É *Shigella* do grupo acidificador da manita, capaz de desdobrar a lactose em geral em alguns dias. Os caracteres bioquímicos mais importantes para distingui-la de outras shigelas são: acidificação tardia da lactose, não agir sobre a xilose e não produzir indol de água peptonada.

Além das provas utilizadas para identificação bioquímica, é hoje de emprêgo corrente a identificação sorológica que, para estas bactérias, apresenta certas características interessantes.

O suposto dimorfismo que ocorreria com o bacilo de Sonne foi verificado desde muito tempo. Pensou-se que seria uma variação S-R que ocorreria com essa bactéria; entretanto, GLYNN e STARKEY (1939) mostraram a existência de pelo menos 2 tipos sorológicos independentes da variação S-R. O soro tipo I só teria ação sobre as colônias do tipo I, agindo fracamente sobre culturas do tipo II. O soro do tipo II aglutina culturas do tipo I e II. Encontraram ambos os tipos em placas de isolamento, sendo, entretanto, mais freqüente o tipo I.

WHEELER e MICKLE (1945), retomando o assunto, interpretaram esse tipo de variação antigênica de maneira diferente. Para eles, existem 3 tipos de colônias: I e II, que ocorrem naturalmente, e R, em culturas velhas. As duas primeiras seriam os dois tipos característicos de espécie; entretanto, as culturas em fase I tendem a progredir para fase II e perder suas características de fase I.

A variação da fase I para fase II aparece rapidamente e ambas podem ser isoladas do intestino, havendo também aglutininas anti-fase II no sangue de doentes portadores de bacilo *sonnei*, o que fala contra a variação S-R. Sorologicamente, as fases I e II são independentes, não havendo aglutinação cruzada entre os 2 tipos, concluindo que essa variação se enquadra mais no tipo de variação difásica, descrita por BOYD (1938) com relação à *Shigella paradysenteriae*.

Chamam ainda a atenção para a ação impediante de certos meios no aparecimento de colônias em fase II (desoxicolato-citrato e ágar S. S.). Por outro lado, colônias em fase I e fase II, ou até mesmo unicamente em fase II, podem aparecer nas placas de meios menos seletivos.

Conservamos em nosso laboratório culturas de *Sh. sonnei* que eram muito bem aglutinadas por um soro *sonnei* fase I. Depois de algum tempo, deixaram de ser aglutinadas por esse soro, passando a aglutinar com soro *sonnei* fase II. Estas culturas não apresentavam qualquer característica de variação S-R e essa mudança se apresentou com caráter irreversível, mesmo após várias passagens em camundongo.

É interessante observar que essa variação de fase nem sempre ocorre. Tivemos uma cultura de *Sh. sonnei* em fase I que conservou suas características por mais de 2 anos. Em outras amostras, a mudança foi rápida, passando, às vêzes, por uma fase intermediária, sendo aglutinadas por soros fase I e II. Não nos foi possível verificar diferenças entre colônias em fase I e fase II e, somente uma vez, isolamos um bacilo *sonnei* em fase II, de um caso de disenteria bacilar.

Diante dessa possibilidade, é necessário que os soros para diagnóstico possuam aglutininas para as duas fases. WHEELER e MICKLE (1945), examinando 7 soros diagnósticos, só encontraram um no qual os dois tipos de aglutininas estavam presentes.

A preparação de soros em fase I não apresenta dificuldade; em geral, são fáceis de serem obtidos e não têm aglutininas secundárias para outras shigelas. O soro mixto, ou fase II puro, é quase sempre de difícil preparo, dada a afinidade entre *Sh. sonnei* fase II e *Sh. paradysenterix* tipo XI. De 4 soros que preparamos só um conservou título aglutinante satisfatório para uso diagnóstico, depois de absorvido pela *Sh. paradysenterix* tipo XI.

Depois do grupo paradisentérico, a *Sh. sonnei* ocupa o 2.º lugar, como agente etiológico da disenteria bacilar. O quadro clínico pode variar desde enterite branda até a forma grave, muito tóxica. Entre nós, o seu achado é, aparentemente, menos comum do que ocorre nos outros países, segundo PACHECO e RODRIGUES (1928, 1930), PACHECO e MENDONÇA (1930) e RANGEL PESTANA e FARACO (1942). Temos a impressão de que esse fato é devido à indentificação incompleta do germe, sendo confundido com o grupo paradisentérico. Os nossos achados mostram que o bacilo *sonnei* é comum entre nós, ocupando o 2.º lugar em nossa estatística.

SHIGELLA DISPAR

ANDREWES (1918) denominou *Shigella dispar* o germe isolado das fezes com caracteres semelhantes aos do grupo disentérico, capazes de acidificar a lactose num período de 24 horas a 24 dias. Admitiu a possibilidade de não ser uma espécie homogênea, podendo ser constituída por diferentes tipos.

CASTELLANI (1907, 1911) já tinha observado o mesmo, descrevendo, detalhadamente, germes disenterígenos, idênticos à *Shigella dispar* de Andrewes. Chamou-os de *Eberthella ceylonensis* A, *Eberthella ceylonensis* B e *Eberthella madampensis*, designações essas adotadas em parte pelo Manual de Bergey, edição de 1948.

Para CASTELLANI (1937), esses germes são responsáveis por formas agudas de disenterias ou por colites crônicas de difícil tratamento, que se instalam com ou sem acidente disentérico inicial.

A importância desses germes como agentes de síndromes disentéricas ainda não está bem estabelecida, pelo fato de serem isolados com relativa frequência das fezes de indivíduos normais, exceção feita do bacilo *ceylonensis* A, que, mais tarde, foi identificado como sendo idêntico à *Sh. sonnei*.

Em trabalho anterior (1942), verificando uma série de amostras rotuladas como *Sh. dispar*, não fomos capazes de encontrar uma prova bioquímica que permitisse separar os 2 tipos descritos por Castellani; daí, preferirmos provas sorológicas para estudo desse grupo. Concluímos que a *Sh. dispar* seria constituída de pelo menos 2 tipos sorológicos, um deles muito semelhante à *Sh. alkalescens*.

CARPENTER (1943), estudando a estrutura antigênica da *Sh. dispar*, conclui que existem pelo menos 3 tipos sorológicos.

CARPENTER (1944) completou suas verificações achando que existem pelo menos 4 tipos sorológicos, não havendo provas bioquímicas capazes de separar tipos. Daí ser injustificada a divisão de *Sh. dispar* em *Sh. ceylonensis* e *Sh. madampensis*.

Atualmente, dos 4 tipos sorológicos descritos por Carpenter, a maioria é insubsistente. Assim, o tipo IV foi verificado como sendo idêntico à *Sh. sonnei* em fase II (WHEELER e MICKLE, 1945). O tipo II seria semelhante à *Sh. alkalescens* tipo III (COX e WALLACE, 1948). O tipo III, como foi encontrado uma só vez, dentro de centenas de amostras, não deve ser considerado como tipo sorológico (CARPENTER e STUART, 1950), restando, portanto, ser considerado como *Sh. dispar* o tipo I.

ASSIS (1948) descreveu um tipo novo de *Shigella*, *Sh. guanabara*, isolada de casos de disenteria aguda ou sub-aguda, no Rio de Janeiro (14 em crianças e 1 em adulto).

Esse germe possui caracteres bioquímicos semelhantes aos de *Sh. dispar* e, de um modo geral, pelas suas características biomorfológicas, se enquadra dentro do gênero *Shigella* (exceção feita da produção de hidrogênio sulfurado e acidificação da salicina). Sorologicamente, não possui antígenos relacionados com nenhum tipo de *Shigella* até hoje descrito.

As amostras classificadas como *Sh. dispar* que constam desta verificação foram as que aglutinaram somente como soro *dispar* tipo I. Não encontramos nenhuma amostra que correspondesse ao tipo *guanabara*, que, a nosso ver, deve, por enquanto, ser incluído no grupo *dispar*.

GRUPO NÃO ACIDIFICADOR DA MANITA

A acidificação ou não da manita é das provas mais usadas em laboratório para diferenciação dos bacilos disentéricos. Dentre os germes que não acidificam esse carboidrato, está colocado o bacilo de Shiga, que é a espécie tipo do gênero e o primeiro a ser descrito como agente da disenteria bacilar do homem.

Até bem pouco tempo, o grupo manita-negativa era constituído por 2 espécies: *Sh. dysenteriae* (bacilo de Shiga) e *Sh. ambigua* (bacilo de Schmitz), ambas reconhecidas como patogênicas para o homem.

Recentemente, SACHS (1943) descreveu uma série de bacilos que, segundo ele, devem ser considerados como pertencentes ao gênero *Shigella*;

são patogênicos para o homem, pertencem ao grupo não acidificador da manita, são sorolôgicamente heterogêneos e não têm aglutininas em comum com as duas espécies acima citadas. Segundo Sachs, alguns desses germes já tinham sido descritos, anteriormente, por Large e Sankaran.

Assim sendo, o grupo formado pelas shigelas não acidificadoras da manita ficou constituído pelos bacilos de Shiga, de Schmitz e pelo grupo conhecido como de Large-Sachs, a que se aduziram, posteriormente, tipos novos descritos por outros autores.

Shigella dysenteriae (bacilo de Shiga) — Como já foi dito, o bacilo de Shiga foi o primeiro bacilo disenterico descrito. Foi encontrado pela primeira vez por Shiga (1898), no Japão, que o isolou de casos de disenteria aguda. Mais tarde, verificações de Kruse, em 1900, confirmaram os trabalhos de Shiga, ficando o germe como espécie tipo do gênero, sendo o único bacilo disenterico capaz de produzir exotoxina de ação neuro-enterotóxica.

Esse tipo se caracteriza pela acidificação da dextrose, com incapacidade de agir sobre outros carboidratos. Assis (1930a) assinalou a capacidade do bacilo de Shiga de acidificar a lactose, fato este confirmado, recentemente, por WHEELER e STUART (1946), que verificaram o mesmo, principalmente com culturas conservadas em coleção por muitos anos.

A espécie *Sh. dysenteriae* é sorolôgicamente homogênea, possuindo aglutininas em comum para as outras shigelas em quantidade muito pequena, tendo sido relatadas aglutinações cruzadas com a *Sh. ambigua* (In TOPLEY e WILSON, 1946) e *Sh. alkalescens* (WHEELER e STUART, 1946).

A preparação dos soros aglutinantes para uso dianóstico não apresenta dificuldade. Bons soros são obtidos facilmente, devendo-se levar em conta que o germe é muito tóxico para os coelhos, motivo pelo qual se deve tatear a sensibilidade do animal ao se preparar o soro. É germe freqüentemente encontrado no Oriente e, raramente, nos outros países. Entre nós, existe certo desacôrdo quanto à freqüência desse germe. MENDONÇA (1931) dá uma incidência de 21%; ARAGÃO e LEITE RIBEIRO (1945), em crianças, de 13,8%; RANGEL PESTANA e FARACO (1942), em 1.356 exames positivos para bacilos disentericos, o encontraram em 8,2% dos casos. Nas nossas verificações, a incidência desse germe está muito abaixo de qualquer uma das acima citadas, sendo a freqüência por nós encontrada relatada na 2.ª parte deste trabalho.

Shigella ambigua (bacila de Schmitz) — Isolado pela primeira vez por Schmitz, na Rumânia, é bacilo muito semelhante ao bacilo de Shiga, dêle se diferenciando pela capacidade de acidificar a ramnose e de produzir indol de água peptonada. CARVALHO LIMA e QUEIROZ TELLES (1940) assinalam a capacidade desse germe de produzir hidrogênio sulfurado, conforme a peptona usada no meio. Sorolôgicamente, é homogêneo, tendo BOYD (1935) descrito a existência de 2 antígenos: tipo-específico e de grupo. Não resta, hoje em dia, a menor dúvida quanto à ação patogênica desse germe para a espécie humana e êle tem sido encontrado em várias partes do mundo. Em São Paulo, RANGEL PESTANA e FARACO (1942), em 1.356 exames positivos o encontraram 53 vezes; no Rio de Janeiro, ARAGÃO e LEITE RIBEIRO (1945), em 65 exames, encontraram 4 vezes e MENDONÇA (1931), em 1,8% dos casos.

GRUPO LARGE-SACHS — Todos que estão familiarizados com a bacteriologia intestinal frequentemente encontram germes com características biomorfológicas do gênero *Shigella*, incapazes de acidificar a manita, mas que não são aglutinados pelos soros diagnósticos Shiga ou Schmitz.

SACHS (1943), realizando estudo sistemático de todos bacilos manita-negativa isolados das fezes de indivíduos com perturbações gastrintestinais, chegou à conclusão de que, dentro deste grupo, existem pelo menos 8 tipos sorológicos, além dos clássicos bacilos Shiga e Schmitz. Alguns dos germes estudados por esse autor já tinham sido estudados, anteriormente, por Large; daí, o grupo ser conhecido como de Large-Sachs.

CRISTENSEN e GOWEN (1944) trabalhando no norte da África, e GOBER e colab. (1944), nos Estados Unidos, descrevem novos tipos de bacilos disentéricos, pertencentes ao grupo manita-negativa. MAC LENNAN (1945), revendo grande número de germes desse grupo, encontrou, além dos tipos de Sachs, outro tipo novo. WAHEELER e STUART (1946), fazendo a revisão nesse grupo, concluem que os tipos Large-Sachs Q771, Q1.167, Q454, Q1.030, Q902 possuem propriedades biomorfológicas que permitem sua inclusão no gênero *Shigella*; o tipo Sachs Q771 é idêntico à *Sh. arabinotarda* A de Cristensen e Gowen e à *Shigella sp.* G8.524; concluem ainda que o tipo Q1.167 é idêntico à *Sh. arabinotarda* B de Cristensen e Gowen. Os tipos Sachs I e B 105 não se incluem no gênero por serem móveis, produzirem gás, utilizarem radical citrato como fonte de carbono. O tipo A 12, produzindo gás somente na glicose, deve ser excluído do gênero, a não ser que sejam demonstradas as suas relações com tipos sorológicos já existentes, ou que se evidencie a existência de variantes anaerogênicas. Por sua vez, descrevem um novo tipo manita-negativa, indol-positivo, *Shigella sp.* 1.831.

Repetimos o trabalho de Wheeler e Stuart em nosso Laboratório com amostras que nos foram enviadas pelo primeiro e chegamos a conclusões idênticas.

Já, anteriormente, tínhamos verificado (1948b) que as provas bioquímicas para separação de tipos neste grupo, em geral, são insatisfatórias. Resultados rápidos e seguros foram obtidos com soros tipo-específicos, por meio de aglutinação em lâmina, para identificação dos vários tipos de shigelas do grupo manita-negativa.

É desnecessário encarecer a importância de usarmos os métodos de identificação sorológica sempre que tivermos de proceder à identificação de bacilos disentéricos do grupo manita-negativa. Como já assinalamos (1948b), reclassificando amostras rotuladas como bacilo de Shiga, somente 25% realmente eram *Sh. dysenteriae*, ao passo que as restantes foram classificadas como *Shigella* Sachs Q771. Igualmente, RANGEL PESTANA e QUEIROZ TELLES (1947), realizando um estudo com amostras de shigelas manita-negativa, só puderam separar o bacilo Shiga do tipo Q771, por meio de provas sorológicas. Tivemos também a oportunidade de verificar o mesmo em nosso laboratório, constatando, ao mesmo tempo, que o achado do bacilo Sachs Q771 coincidia com perturbações gastrintestinais, variando de enterite leve até forma aguda de disenteria bacilar.

Além do tipo Sachs Q771, isolamos, de 3 casos de disenteria bacilar típica, um germe que, pelos seus caracteres bioquímicos e sorológicos, foi identificado como sendo *Shigella* Sachs Q454. Dois desses pacientes resi-

diam na mesma localidade, sendo que de um nos foi dado acompanhar a evolução da moléstia. Apresentou todos os sintomas de disenteria bacilar aguda, com quadro muito tóxico, apesar de ser adulto muito bem constituído, tendo todos os sintomas regredido, rapidamente, com tratamento pela sulfaguanidina.

Num terceiro paciente, obtivemos sangue para provas de aglutinação, que foram positivas até a diluição de 1/160.

Três amostras, que nos foram enviadas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, também foram identificadas como sendo *Shigella* Sachs Q454.

Verificamos que, em São Paulo, além dos clássicos bacilos de Shiga e de Schmitz, existem pelo menos 2 tipos de *Shigella* Sachs, sendo, portanto, indispensável proceder, como rotina, à identificação sorológica de toda shigela manita-negativa.

Insistimos na identificação sorológica do grupo manita-negativa, ainda por razões de ordem terapêutica. De todas as formas de disenteria bacilar, a única que ainda é, até hoje, algumas vezes tratada pela soroterapia específica é a causada pelo bacilo de Shiga. Sabendo-se que esse germe pode se confundir com outros bacilos disentéricos do grupo manita-negativa, a administração do sôro, além de inútil, pode ser prejudicial. Além do mais, o conceito de maior toxicidade do bacilo de Shiga precisa ser revisto, uma vez que a confusão com os tipos Sachs Q771, Q454 e Q1.030 invalidam a maioria das conclusões sobre maior patogenicidade do bacilo Shiga.

Em nosso laboratório, admitimos como tipos de shigelas não fermentadoras da manita as seguintes:

Sh. dysenteriae

Sh. ambigua

Sh. Sachs Q771

Sh. Sachs Q1.167

Sh. Sachs Q454

Sh. Sachs Q902

Sh. Sachs Q1.030

O tipo *Shigella sp.* 1.831, assim como o descrito por Mac Lennan, não foi incluído porque ainda não houve confirmação de seu achado em outros lugares.

2.^a PARTE

MATERIAL DE ESTUDO

O material com que trabalhamos pode ser dividido em 3 grupos : 1.º fezes de crianças de 0 a 3 anos com perturbações intestinais ; 2.º fezes que nos foram enviadas para pesquisa de germes patogênicos e 3.º fezes de doentes com diagnóstico clínico de enterocolopatia crônica.

Todos os exames foram realizados na secção de Coprocultura do Instituto Adolpho Lutz (laboratório de Saúde Pública do Estado).

1.º GRUPO :

Foi nossa finalidade, ao estudar êsse grupo, não só analisar a incidência das shigeloses na primeira infância, como também comparar métodos e verificar a freqüência das shigeloses em crianças.

Cada exame era dividido em 3 partes, a saber :

- 1.º) Colheita direta no reto, por meio de bastão ; semeadura imediata em uma placa de ágar S. S. e uma placa de ágar eosina-azul de metileno.
- 2.º) Semeadura de fezes logo depois de emitidas, em solução salina glicerinada tamponada e assim transportadas para o laboratório.
- 3.º) Fezes transportadas "in natura" para o laboratório e passadas para placas, num tempo variável de 4 a 6 horas após a emissão.

Para cada material semeado, usamos 1 placa de ágar S. S. e 1 placa de ágar eosina-azul de metileno ; o isolamento e a identificação obedeceram ao critério descrito na parte de métodos.

Usando êsses processos, além de verificar incidência das shigeloses em crianças, pudemos coligir dados que nos são importantes :

- 1.º) Comparar o valor do exame, pelo bastão, com relação a fezes emitidas naturalmente.
- 2.º) Verificar se o transporte de fezes "in natura" prejudica o exame, desde que a semeadura seja feita num máximo de 6 horas após emissão.
- 3.º) Comparar o valor dos meios de cultura usados por nós.

Nesses 307 exames, conseguimos evidenciar a presença de bacilos disentericos em 28, o que nos dá uma porcentagem de 9,1% de exames positivos, assim distribuídos por espécie encontrada :

Shigella sonnei : 12
Shigella paradysenterix : 9
Shigella alkalescens : 6
Shigella ambigua : 1

Apesar de a pesquisa ter sido feita usando técnicas tão variadas, encontramos incidência baixa de bacilos disentericos. Trabalhos anteriores feitos no Brasil mostram maior freqüência da disenteria bacilar em crianças portadoras de afecções intestinais. ARAGÃO e LEITE RIBEIRO (1945), no Rio de Janeiro, em 265 casos suspeitos, puderam identificar o bacilo disenté-

rico como causa etiológica da doença entérica, em 32,82%. Em trabalho anterior (1945), em 200 casos de diarreias infantís, obtivemos porcentagem de 16,5% de casos positivos para bacilos disentéricos. FARIA e PACHECO (1923), em 20 crianças com perturbações intestinais, de 15 isolaram germes do grupo disentérico.

Essa porcentagem, relativamente baixa, de enterites por *Shigella* deve ser devida ao fato de têmos examinado fezes de crianças com qualquer perturbação entérica, mesmo quando, já de antemão, podíamos afastar, quase com certeza, a etiologia bacteriana, fato êste que nos permite considerar que nossa verificação mostra alta incidência da moléstia na primeira infância.

COLHEITA DIRETA : Usamos o processo preconizado por HARDY e WATT (1944), que consiste em se introduzir, no anus da criança, uma cânula de borracha, com a ponta em bisel, lubrificada em vaselina e passar, pelo orifício da cânula, um estilete metálico com a ponta envolvida em algodão; imprimir movimentos ao estilete de modo a fazer ligeira massagem na mucosa retal; retirar o bastão e passar a ponta engastada em algodão nas placas para isolamento.

As placas devem ser aproveitadas em tôda a superfície, evitando-se passar o estilete 2 vêzes pelo mesmo lugar, para que se obtenham colônias bem isoladas, semeando primeiro a placa de ágar S. S.

Os dados comparativos foram os seguintes :

Culturas positivas : colheita direta	75%
Culturas positivas : das fezes	57%

o que mostra uma grande superioridade para o método de colheita direta.

TRANSPORTE DE FEZES "IN NATURA" E EM SOLUÇÃO SALINA GLICERINADA TAMPONADA :

Dada a natureza de nosso laboratório, recebemos sempre fezes transportadas "in natura", o que é desaconselhado pela maioria dos autores. O exame é, em geral, iniciado numa média de 6 horas após a colheita, motivo pelo qual procuramos verificar se êsse lapso de tempo seria muito prejudicial. Comparamos as semeaduras feitas da glicerina tamponada (sol. glicerina 30%), onde as fezes eram colocadas, logo após serem emitidas, e as semeaduras das fezes transportadas para o laboratório e, aí, semeadas 4 a 6 horas após emissão.

Os resultados foram os seguintes :

fezes transportadas em glicerina 57% positivas
fezes transportadas "in natura" 57% positivos

o que mostra, dentro dêste período de tempo, não haver vantagem de um ou outro método.

VALOR DOS MEIOS DE CULTURA USADOS :

Comparamos exclusivamente os meios de ágar S. S. e eosina-azul de metileno de Holt-Harris-Teague.

Como era de esperar, o primeiro apresentou grande vantagem sobre o segundo. Obtivemos 89,3% de casos positivos do meio ágar S. S. e somente 57,1% do meio H. H. T.

Como é sabido, o meio de ágar S. S. possui substâncias bacteriostáticas que impedem o desenvolvimento da *Sh. alkalescens*. Na nossa verificação, por 2 vêzes, a *Sh. alkalescens* só foi isolada do meio H. H. T. dos 6 casos positivos para essa bactéria. Quanto às outras shigelas, só uma vez isolamos um bacilo *sonnei* do H. H. T. sem ter sido evidenciada sua presença no meio ágar S. S.

Sabemos que o número de casos por nós estudados, principalmente os positivos, é pequeno para que possamos tirar conclusões mais precisas. Nossos resultados levam-nos a acreditar que a colheita direta é muito superior ao exame de fezes emitidas naturalmente, apresentando ainda a grande vantagem de, dada sua simplicidade, poder ser realizada a qualquer momento.

Quanto à escolha de meios, sempre é necessário usarmos 2 tipos diferentes, o que justificamos na parte referente aos métodos.

Por último, a título de curiosidade, vamos transcrever os dados que nos foram fornecidos pelo Hospital da Cruz Vermelha de Indianópolis sobre a mortalidade no grupo portador da enterite bacilar :

De 28, faleceram 5 $\left\{ \begin{array}{l} \textit{Sh. paradysenteriae} \text{ 1} \\ \textit{Sh. sonnei} \text{ 2} \\ \textit{Sh. alkalescens} \text{ 2} \end{array} \right.$

sendo interessante notar que a mortalidade mais elevada foi no grupo *Sh. alkalescens*, considerando que o germe estava presente num número muito menor de casos.

2.º GRUPO :

O 2.º grupo analisado compreende exames realizados na secção de coprocultura do Instituto Adolpho Lutz, de 1946 até o 1.º semestre de 1950, para eventual diagnóstico de moléstia entérica de etiologia bacteriana.

O material não se prestava muito para avaliar, com exatidão, a freqüência da disenteria bacilar entre nós, porquanto grande número de exames feitos não tinha a menor suspeita de moléstia microbiana. A maioria das fezes examinadas não apresentava nenhuma das características comuns das fezes de doentes de disenteria bacilar (muco e sangue), sendo, em geral, fezes moldadas. No entretanto, dado o número razoável de exames que foram feitos, pensamos que os resultados são interessantes para avaliar a freqüência dos vários tipos de bacilos disentéricos, num período de 4 anos e meio para um total de 5.211 exames.

Infelizmente, dada a natureza de nosso serviço, difficilmente conseguimos obter dados referentes aos pacientes, de modo a poder relacionar o caso clínico ao exame de laboratório.

Examinamos fezes de indivíduos residentes na cidade de São Paulo e arrabaldes. O material para exame foi-nos enviado sem sabermos o tempo que mediou entre a emissão das fezes e o início do exame. Nunca recebemos fezes já semeadas em líquido conservador. A técnica que empregamos está descrita, detalhadamente, na parte referente aos métodos.

No quadro estão tabelados os resultados.

QUADRO 12

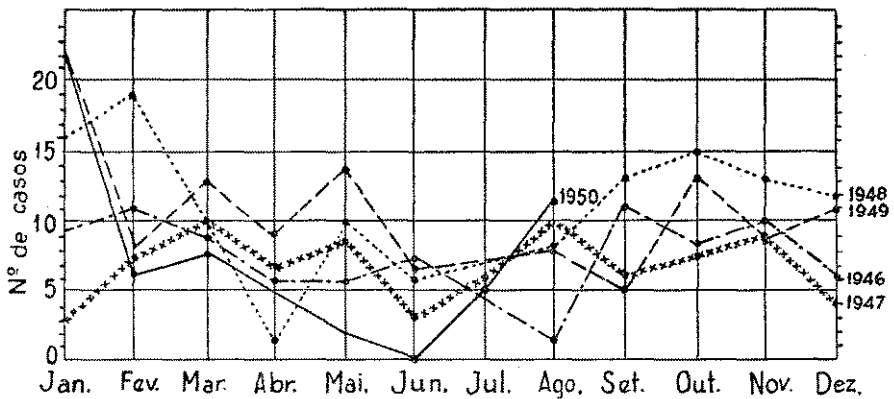
		1946		1947		1948		1949		1950		Total	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
<i>Sh. paradysenteriae</i>	Tipo I	5		0		4		2		5		16	
	Tipo II	9		20		29		28		11		97	
	Tipo III	3		2		3		15		7		30	
	Tipo IV	4		5		6		8		5		28	
	Tipo V	5		2		2		2		0		11	
	Tipo VI	2		0		4		12		2		20	
	Tipo VII	0		0		0		4		0		4	
	Tipo VIII	1		1		0		0		0		2	
<i>Sh. paradysenteriae</i> *		18*		0		0		0		0		18	
<i>Sh. alkalescens</i>		12		12		29		11		9		73	
<i>Sh. tieté</i>		5		3		18		15		9		50	
<i>Sh. sonnei</i>		9		30		30		19		12		100	
<i>Sh. dispar</i>		2		4		0		2		8		21	
<i>Sh. dysenteriae</i>		4		1		1		0		0		6	
<i>Sh. ambigua</i>		4		2		3		4		1		14	
<i>Sh. sp. Sachs</i> Q771		0		3		0		0		0		3	
<i>Sh. sp. Sachs</i> Q454		0		0		0		1		3		4	
Total		83	1040	85	935	129	1324	128	968	72	447	497	4714
Total de exames													5211

* 18 amostras de *Sh. paradysenteriae* que não foram tipadas.

O exame do quadro fornece dados interessantes : verificamos que foi encontrada a maioria dos tipos de bacilos disentéricos até agora descritos, inclusive alguns dos bacilos tipo Sachs. Como era de se prever, o maior número de casos positivos pertence ao grupo da *Sh. paradysenteriae* e, a seguir, ao da *Sh. sonnei* ; o bacilo de Shiga foi raramente encontrado.

Dentro do grupo paradysentérico, com exceção do tipo II, verificamos flutuações de ano para ano, notadamente nos tipos III e VI.

No quadro seguinte colocamos em gráfico a incidência por meses nos vários anos.



3.º GRUPO

O 3.º grupo refere-se a doentes internados no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, com diagnóstico de moléstia intestinal crônica. Ainda hoje se discute se, em certas afecções intestinais crônicas com exame positivo para bacilos disenterícos, o germe é o agente etiológico da afecção intestinal, ou se o doente é unicamente portador de germes, como é o caso do bacilo tífico. Na 3.ª edição da obra "Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity", revista por WILSON e MILES (1946), encontramos a afirmativa da existência de portadores sãos de bacilos disenterícos, admitindo eles também a existência de enterocolopatias crônicas, causadas por bacilos disenterícos. WATT, HARDY e DECAPIPO (1942) acham que, nas regiões onde a moléstia é endêmica, o número de portadores sãos pode ser relativamente alto, tendo os autores encontrado a cifra de 3,8%.

FELSEN (1945) não concorda com a existência de portadores sãos; para ele, todo portador de bacilos disenterícos é um doente e a ausência de sintomatologia clínica não é de valor absoluto, porquanto êsses indivíduos quase sempre apresentam hiperplasia dos nódulos linfáticos intestinais, inflamação ou ulceração da mucosa intestinal. Somente em alguns casos, em que o germe isolado foi a *Sh. alkalescens*, não encontrou lesões intestinais.

ASSIS (1937), em 163 pacientes portadores de retite crônica, isolou, de 38 dêles, bacilos do grupo Flexner. Chama a atenção para a alta porcentagem de exames positivos e para a melhora dêsses pacientes, com tratamento pela autovacina.

Praticamos exames de fezes seriados em 100 doentes internados no Serviço de Gastrenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sempre um mínimo de três, com intervalos de uma semana, em fezes emitidas normalmente, fezes purgadas e, quando possível, por colheita direta no reto, realizada segundo a técnica de FELSEN (1945) (42 vezes).

Em 23 doentes, pudemos evidenciar a presença de bacilos disenterícos nas fezes. Agrupamos, num quadro, todos os casos positivos, juntamente com os exames que foram realizados.

QUADRO 14

Nome	Diagnóstico Clínico	N.º ex.	Frequência do aparecimento do germe	Col. retal	Agglutinação sangue doente	Germe isolado
1) C.S.	Enterocolite fermentativa.	6	3.º-4.º-6.º	+	0	<i>Sh. alkalescens</i>
2) F.V.	Enterocolite fermentativa.	7	7.º	+	1/320	<i>Sh. flexner</i>
3) H.C.	Enterocolite fermentativa.	6	2.º-4.º	---	1/320	<i>Sh. flexner</i>
4) A.P.	Enterocolite fermentativa.	11	1.º Flexner 9.º-10.º-11.º- <i>Alkales.</i>	---	Flexner 1/40 <i>Alkales.</i> 1/80	<i>Sh. flexner</i> <i>Sh. alkalescens</i>
5) A.F.	Enterocolite fermentativa.	6	4.º	---	0	<i>Sh. dispar</i>
6) J.M.	Enterocolite fermentativa.	9	1.º-4.º	---	0	<i>Sh. alkalescens</i>
7) A.J.S.	Enterocolite fermentativa.	4	3.º	não	0	<i>Sh. alkalescens</i>
8) A.M.	Enterocolite fermentativa.	7	4.º	---	1/160	<i>Sh. flexner</i>
9) A.A.	Enterocolite psicogénica ..	9	3.º-4.º-5.º-6.º-7.º	---	1/160	<i>Sh. alkalescens</i>
10) T.M.	Enterocolite psicogénica ..	16	5.º-12.º 8.º	---	<i>Sh. alkal.</i> 1/640 <i>Sh. sonnei</i> não foi feito	<i>Sh. alkalescens</i> <i>Sh. sonnei</i>
11) T.S.	Enterocolite psicogénica ..	3	1.º-3.º	não	Não foi feito	<i>Sh. alkalescens</i>
12) S.B.	Enterocolite psicogénica ..	6	1.º-3.º-4.º	---	1/160	<i>Sh. dispar</i>
13) L.P.	Enterocolite psicogénica ..	4	1.º	não	Não foi feito	<i>Sh. dispar</i>
14) S.S.	Enterocolite psicogénica ..	6	3.º	não	Não foi feito	<i>Sh. sonnei</i>
15) E.R.	Enterocolite simples.....	3	1.º-2.º	não	Não foi feito	<i>Sh. flexner</i>
16) J.N.	Enterocolite simples.....	15	1.º-2.º-3.º-9.º-10.º 15.º	---	1/640	<i>Sh. flexner</i>
17) A.Z.	Enterocolite simples.....	5	3.º	não	0	<i>Sh. dispar</i>
18) A.A.S.	Schistozomose	7	6.º	+	Não foi feito	<i>Sh. flexner</i>
19) J.G.	Enterocolite alérgica	3	2.º-3.º	não	Não foi feito	<i>Sh. alkalescens</i>
20) R.F.	Enterocolite alérgica	3	2.º-3.º	não	Não foi feito	<i>Sh. alkalescens</i>
21) E.R.S.	Enterocolite alérgica	6	2.º-3.º-4.º-5.º-6.º	+	1/80	<i>Sh. dispar</i>
22) A.R.B.	Polipose intestinal	5	10.º	não	Não foi feito	<i>Sh. alkalescens</i>
23) E. J.	Enterocolite carencial	6	1.º-2.º	---	Não foi feito	<i>Sh. sonnei</i>

Analisando o quadro, verificamos que, por 2 vêzes, foram encontrados 2 tipos diferentes de bacilos disentéricos no mesmo paciente; em 60 dos casos, o achado do mesmo bacilo se repetiu por mais de uma vez, havendo períodos em que não era possível o isolamento do germe. Êsse fato foi muito característico com um paciente em que foram realizados 15 exames, sendo os 3 primeiros positivos, depois, uma série negativa, para tornar-se positivo, novamente, na 9.ª cultura; dêste paciente, nas 6 vêzes que foi isolado um bacilo disentérico, sempre foi do mesmo tipo (*Sh. paradysenterix* tipo II). A colheita direta no reto não trouxe vantagem. Sòmente em 2 casos o germe foi isolado do material colhido do reto, sem antes ter sido isolado das fezes.

Dos casos em que foi possível pesquisar aglutininas no sangue, encontramos, em alguns títulos, sangüíneos bastante significativos, principalmente quando o germe encontrado nas fezes pertencia ao grupo paradisentérico.

Diante desses resultados, mostrando porcentagem alta de bacilos disentéricos nas fezes de doentes com enterocolopatas crônicas e aglutininas no sangue, acreditamos que um bacilo disentérico pode ser responsável por moléstia intestinal crônica. Também não podemos excluir a hipótese de existirem portadores, seja em casos de doença intestinal ou de portadores sãos, como já nos foi dado observar num caso sem sintomatologia intestinal, no qual isolamos, por período de um ano, sempre o mesmo germe (*Sh. paradysenteriae* tipo IV). Essa verificação mostra a importância que esses doentes podem ter, como disseminadores da moléstia.

Desta pesquisa, achamos importante assinalar que um único exame não basta para avaliar a freqüência dos bacilos disentéricos em indivíduos com doença intestinal crônica; nossa experiência mostra que são necessários pelo menos 3 culturas seguidas, realizadas com intervalos de uma semana.

MEIOS DE CULTURA EMPREGADOS

GLICERINA-CLORETO DE SÓDIO TAMPANADA

Glicerina	300 cm ³
Cloreto de sódio	6,0 g
Fosfato dipotássico (anidro)	3,1 g
Fosfato monopotássico	1,0 g
Água destilada	700 cc
pH. 7,6.....	

(Connecticut Bureau of Laboratories)

HOLT, HARRIS E TEAGUE (ISOLAMENTO DE GERMES INTESTINAIS)

Extrato de carne	5,0 g
Peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000,0 cm ³
Sol. lactose-sacarose, esteril (10% de lactose e 10% de sacarose)	50,0 cm ³
Sol. de eosina amarela a 3%, esteril	13,3 cm ³
Sol. de azul de metileno a 0,5% esteril	20,0 cm ³

Dissolver o extrato, a peptona e o cloteto de sódio na água, aquecendo. Ajustar ao pH 7,4. Autoclavar, a 121.°C, 30 minutos. Filtrar em algodão. Completar o volume de 1.000 cm³. Distribuir 750cm³ em balões de um litro. Esterilizar a 120°C, 30 minutos. No momento de usar, fundir a base e ajuntar, para cada balão de 750cm³ de base: 37,5cm³ da solução lactose-sacarose, 10cm³ da sol. de eosina e 15cm³ da sol. de azul de metileno. (A solução de lactose-sacarose deve ser esterilizada por filtração e as soluções dos corantes, pelo aquecimento a vapor corrente, 20 minutos). Agitar e distribuir em placas.

J. Infect. Diseases 1916, **18**: 596.

S. S. AGAR

Extrato de carne Difco	5,0 g
Proteose peptona	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sal biliar (n.º 3) Difco	8,5 g
Citrato de sódio	8,5 g
Tiosulfato de sódio	8,5 g
Citrato férrico	1,0 g
Ágar	17,0 g
Solução verde brilhante 0,5%	0,066 cm ³
Vermelho neutro	0,025 cm ³
Água destilada	1000,0 cc

- 1.º) Junte todos os ingredientes, menos os corantes e o citrato férrico a 250 cc de água fria.
 - 2.º) Dissolva o citrato férrico e o vermelho neutro em pequena quantidade de água. Aqueça, se for necessário.
 - 3.º) Aqueça 750cc de água destilada até fervura e junte a mistura de ágar, com constante agitação.
 - 4.º) Aqueça até ferver, por 1 ou 2 minutos.
 - 5.º) Junte citrato férrico e corantes. Misture bem.
 - 6.º) Ajuste pH a 7,0.
 - 7.º) Distribua conforme necessidade.
- (Michigan Dept. of Health)

TRÍPLICE AÇÚCAR MODIFICADO

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sacarose	10,0 g
Dextrose	0,7 g
Sulfato ferroso	0,2 g
Cistina	0,15 g
Ágar Bacto	1,4 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Indicador Andrade	30,0 cm ³
Água destilada q. s. p.	1000,0 cm ³

PH 7,4.

Preparação : Dissolver o ágar, a peptona e o extrato de carne em 800 cm³ de água, em banho-maria. Dissolver o sulfato ferroso em 50 cm³ de água e a cistina em 2 cm³ de solução normal de ácido clorídrico, a quente. Ajuntar estas 2 soluções, os açúcares e o indicador à solução de ágar. Completar o volume com água destilada.
Ajustar o pH 7,4

(Modificação de E. Rugai — não publicada).

HISS-MEIO SEMI-SÓLIDO COM CARBOIDRATO E INDICADOR

Extrato de carne	1,0 g
Peptona	10,0 g
Gelatina	40,0 g
Cloreto de sódio	2,0 g
Gelose	8,0 g
Água destilada	1000,0 cm ³
Sol. fenol vermelho 0,2%	10,0 g
Carboidrato	10,0 g

Dissover o extrato de carne em 200 cm³ de água. Esterilizar a 121.°C, 20 minutos. Esfriar, semear com *B. coli* e incubar 24 horas, a 37.°C. Aquecer 10 minutos em autoclave, a 120.°C, para esterilizar. Ajuntar o resto da água e os outros ingredientes, menos o indicador e o carboidrato. Fundir em autoclave a 120.°C, 20 minutos. Ajustar o pH 7,4 com carbonato de sódio normal. Precipitar a 123.°C, 10 minutos. Filtrar em algodão. Completar o volume de 1.000 cm³. Ajuntar o indicador. Distribuir em balões. Esterilizar a vapor 121.°C, 30 minutos. No momento de usar, fundir e ajuntar o carboidrato sob a forma de solução a 20%, esterilizada por filtração.

MEIO STUART

Fosfato monopotássico	3,64 g
Fosfato dissódico	3,80 g
Uréia	8,00 g
Ext. de levedo	0,04 g
Fenol vermelho 0,02%	20,000 cm ³
Água	380,00 cm ³

Dissolver todos os elementos na água, menos o indicador. Ajustar o pH 6,8. Ajuntar o indicador e esterilizar por filtração. Distribuir assepticamente 2 cm³ ± em tubos 12x120.

J. Bacteriology 1945, 49 : 437.

SIMMONS — ÁGAR CITRADO DE SÓDIO (PARA DIFERENÇAR GERMES DE GRUPO COLI-AERÓGENES)

Água destilada	1000,0 cm ³
Ágar	20,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Sulfato de magnésio (cristalizado)	0,2 g
Fosfato de amônio	1,0 g
Fosfato de dipotássico	1,0 g
Citrato de sodium anidrol	1,0 g
Azul de bromotimol em sol. alcoólica a 1,5%	10,0 g

Dissolver todos os sais na água. Ajuntar o ágar. Fundir a 120.°C, 20 minutos. Filtrar em algodão. Ajustar ao pH 6, 8. Ajuntar o bromo-

timol. Distribuir em tubos de 16x160. Esterilizar a 120.°C, 20 minutos.

J. Infect. Diseases 1926, 39 : 209.

DUNHAM — ÁGUA POPTONADA (PES. DE INDOL)

Cloreto de sódio	2,5 g
Peptona P. Davis	10,0 g
Água destilada	1000,0 g

Dissolver a peptona na água, aquecendo. Ajustar ao pH 7, 6. Dar fervura e juntar o cloreto de sódio e filtrar em papel. Distribuir em tubos de 16x160. Esterilizar a 121.°C, 12 minutos.

J. Infect. Diseases 1905, 11 : 309.

REATIVO DE EHRLICH

Paradimetil-amino-benzoaldeído	4,0 g
Alcool etílico a 96.°	380 cc
Ácido clorídrico concentrado	80 cc

Cultivar o germe em água peptonada, por 24 horas. Estratificar o reativo sobre o caldo de cultura. Se a reação for positiva, há formação de um anel vermelho-violeta.

CLARK E LUBS

Peptona Difco.....	10,0 g
Dextrose	10,0 g
Fosfato de potássio bibásico	2,0 g
Água destilada	1000,0 cm ³

Dissolver os ingredientes na água. Dosar ao pH 7, 5. Filtrar. Distribuir em tubos de 16x160. Esterilizar a vapor corrente durante 30 minutos.

CLARK E LUBS (PESQUISA DO ACETILMETILCARBINOL)

Reação de Voges-Proskauer (pesquisa acetilmetilcarbinol)

A 1 cm³ da cultura de 5 dias no meio de Clark-Lubs, junte:

Solução alcoólica de alfa naftol a 5%	0,6 cm ³
Hidróxido de potássio (sol. 40%).....	0,2 cm ³

Agitar. A reação é positiva quando aparece uma coloração rósea, 2 a 5 minutos após agitação.

RESUMO

Depois de breve revisão sobre a literatura brasileira referente às shigeloses, o autor descreve os métodos e o material que usou na execução deste trabalho.

Usou, como meios de cultura para isolamento de bacilos disentéricos, o ágar S. S. e o ágar de Holt, Harris e Teague. Na identificação das bactérias isoladas, empregou provas bioquímicas usuais e, em seguida, aglutinação com soros polivalentes e, quando necessário, soros monovalentes. O método de obtenção desses soros assim como a técnica da aglutinação foram descritas detalhadamente.

Não pretendendo discutir questões de sistemática bacteriana, divide os bacilos disentéricos em 3 grupos.

- 1.º grupo : manita + lactose — { *Sh. paradysenterix*
Sh. alkalescens
Sh. tietê
- 2.º grupo : manita + lactose — { *Sh. sonnei*
Sh. dispar
- 3.º grupo : manita — lactose + { *Sh. dysenterix*
Sh. ambigua
Sh. sp. grupo Large-Sachs

Estudando cada grupo isoladamente, adota o critério de J. S. K. Boyd modificado por K. M. Wheeler para diferenciação dos vários tipos do grupo paradisentérico. Neste grupo, não conseguiu encontrar diferenças antigênicas entre *Sh. paradysenterix* tipo IV e com o tipo descrito como *Sh. saigon* e, posteriormente, como *Sh. rio*, a não ser em pequenas variações nos componentes antigênicos de grupo.

Adota o critério de Assis, separando a *Sh. tietê* da *Sh. alkalescens*, aceitando a existência, neste grupo, de variantes acidificadoras da lactose.

Estuda o grupo manita-negativa, aceitando, em parte, como bacilos disentéricos, os tipos descritos por Large e Sachs.

O material estudado pode ser dividido em 3 grupos : 1.º) Pesquisa de bacilos disentéricos em 307 crianças, comparando o método do bastão retal com o da sementeira das fezes. Os resultados foram os seguintes :

	Culturas positivas
Bastão retal.....	75%
Cultura de fezes	57%

As bactérias isoladas foram as seguintes :

<i>Sh. sonnei</i>	12
<i>Sh. paradysenterix</i>	9
<i>Sh. alkalescens</i>	6
<i>Sh. ambigua</i>	1

Dentre estes, houve 5 casos fatais :

<i>Sh. paradysenterix</i>	1
<i>Sh. sonnei</i>	2
<i>Sh. alkalescens</i>	2

2.º) Estuda os resultados de 5.211 coproculturas realizadas num período de 4 anos em fezes com suspeita ou não de shigelose. O número de exames positivos foi de 497 e as espécies encontradas foram as seguintes :

<i>Sh. paradysenterix</i>	{	tipo I	16
		" II	97
		" III	30
		" IV	28
		" V	11
		" VI	20
		" VII	4
		" VIII	2
		Não tipadas	18
<i>Sh. alkalescens</i>		73	
<i>Sh. tietê</i>		50	
<i>Sh. sonnei</i>		100	
<i>Sh. dysenterix</i>		6	
<i>Sh. ambigua</i>		14	
<i>Sh. sp.</i> Sachs Q 771		3	
<i>Sh. sp.</i> Sachs Q 454		4	

3.º) Estuda a incidência de bacilos disentéricos nas fezes de 100 doentes portadores de enterolites crônicas. Em 23 doentes, pôde evidenciar a presença de shigelas nas fezes ; as espécies isoladas foram as seguintes :

<i>Sh. paradysenterix</i>	7
<i>Sh. sonnei</i>	3
<i>Sh. alkalescens</i>	8
<i>Sh. dispar</i>	5

sendo que, em 2 casos, havia 2 bacilos disentéricos. O número de exames feitos nestes doentes variou de 2 a 15, com intervalos em geral de 1 semana, sendo interessante notar períodos longos em que o germe não podia ser evidenciado.

SUMMARY

In this paper there are given the results obtained in the bacteriologic diagnosis of organisms of the *Shigella* genera in São Paulo, Brazil, corresponding to the work of more than four years. The methods adopted are described and discussed, underlining the importance at the present state of knowledge regarding the antigenic structure of the organisms under consideration, with details about the methods for the obtention of the diagnostic sera used.

Without discussing details about the classification of the "Shigella", the author gives the 3 following groups :

1rst. group : manitol + lactose —	{	<i>Sh. paradysenterix</i>
		<i>Sh. alkalescens</i>
		<i>Sh. tietê</i>
2nd. group : manitol + lactose —	{	<i>Sh. sonnei</i>
		<i>Sh. dispar</i>
3rd. group : manitol — lactose —	{	<i>Sh. dysenterix</i>
		<i>Sh. ambigua</i>
		<i>Sh. sp. grupo Large-Sachs</i>

In the differentiation of the components of the *paradysenterix* group, the criterion used by J. S. K. Boyd, modified by K. M. Wheeler, is adopted. It has not been possible to find any antigenic difference between the *Sh. paradysenterix* type VI and the new type described as *Sh. rio*.

Like A. Assis, the author believes that *Sh. tietê* must be considered as a new shigella type and admits also the possibility of variants lactose positive in this group.

His personal observations refer to :

1rst.) The use of the swab method compared with the stool culture in 307 children with and without clinical diagnosis of diarrhea.

	Positive cultures
Swab	75%
Stool culture	57%

The positive cultures were :

<i>Sh. sonnei</i>	12
<i>Sh. paradysenterix</i>	9
<i>Sh. alkalescens</i>	6
<i>Sh. ambigua</i>	1

The death rate was :

<i>Sh. paradysenterix</i>	1
<i>Sh. sonnei</i>	2
<i>Sh. alkalescens</i>	2

2nd.) From 5,211 stool cultures made during a period of four years, 497 were positive for *Shigella*. The *Shigella* types encountered were :

<i>Sh. paradysenteriae</i>	{	type I	16
		" II	97
		" III	30
		" IV	28
		" V	11
		" VI	20
		" VII	4
		" VIII	2
		No typed	18
<i>Sh. alkalescens</i>		73	
<i>Sh. tietê</i>		50	
<i>Sh. sonnei</i>		100	
<i>Sh. dysenteriae</i>		6	
<i>Sh. ambigua</i>		14	
<i>Sh. sp.</i> Sachs Q 771		3	
<i>Sh. sp.</i> Sachs Q 454		4	

3rd). One hundred patients with chronical intestinal disease. In 23 the author was able to demonstrate the presence of a shigella organism in the stool :

<i>Sh. paradysenteriae</i>	7
<i>Sh. sonnei</i>	3
<i>Sh. alkalescens</i>	8
<i>Sh. dispar</i>	5

In two instances there was found more than one shigella type. The stool culture was made every week and for the same patient was a minimum of 2 to a maximum of 15. It was interesting that in the same patients the shigella was not found in the stool for long periods.

Desejo agradecer a colaboração do Dr. Mário Mursa, Dr. José Fernandes Pontes e Dr. José Roberto C. Novaes, assim como das auxiliares da Secção de Coprocultura do Instituto Adolpho Lutz D. Maria José Faraco, Ethel Sandoval Peixoto, Orlanda Branco, Renée C. Maugé e da Irmã Eppinghaus, do Hospital da Cruz Vermelha, que tornaram possível a execução dêste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, S. S. de, A. de E. TAUNAY, J. R. C. NOVAES e A. P. TRIGO — 1947 — Tipos sorológicos de *Sh. paradysenteriae* encontrados em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 7 : 75-84.
- ALMEIDA, S. S. de, A. de E. TAUNAY, J. R. C. NOVAES e A. P. TRIGO — 1948 — Bacilos disentéricos tipo Boyd 88 — Manchester — isolados em São Paulo. *Hospital* 33 (1) : 1-6.
- ANDO, K. — 1929 — A simple method of obtaining soluble specific substances from various bacteria (*Streptococcus viridans*, *B. dysenteriae* and *B. mallei*). *J. Immunology* 17 : 555-557.
- ANDREWES, F. W. — 1918 — Dysentery bacilli : the differentiation of the true dysentery bacilli from allied species. *Lancet* I : 560-563.
- ANDREWES, F. W. e A. C. INMAN — A study of the serological races of the Flexner group of dysentery bacilli. London, Med. Res. Council, 1919 ; Special Report n.º 42. Citado por J. Felsen in *Bacillary dysentery colitis and enteritis*. Philadelphia, Saunders, 1945.
- AOKI, K. — 1921 — Classification of dysentery bacilli by agglutination. *Tohoku J. Exp. Med.* 2 : 142.
- ARAGÃO, R. M. de e V. R. L. RIBEIRO — 1945 — Estudo sobre as shigeloses em crianças do Rio de Janeiro. *Hospital* 28 (1) : 345-376.
- ASSIS, A. de — 1930 — Observações sobre a fermentação da maltose pelos bacilos disentéricos e paradysentéricos. (Flexner-Hiss). *Bol. Inst. Vital Brasil* 13 : 3-19.
- ASSIS, A. de — 1930 a — Sobre o comportamento do bacillo de Shiga em relação a alguns hydratos de carbono. *Brasil-Medico* 44 : 1353-1357.
- ASSIS, A. de — 1935 — Shigeloses crônicas. *Arch. Bras. Med.* 25 : 133.
- ASSIS, A. de — 1937 — Contribuição ao estudo das infecções crônicas por bacilos disentéricos. *Arq. Higiene* 7 : 9-26.
- ASSIS, A. de — 1939 — Estudos sobre *Shigella alkalescens* Andrewes. I. Comportamento fermentativo. *Hospital* 15 (3) : 447-456.
- ASSIS, A. de — 1939 a — Estudos sobre *Shigella alkalescens* Andrewes. II. Comportamento sorológico. *Hospital* 15 (4) : 655-666.
- ASSIS, A. de — 1947 — A propósito de *Shigella alkalescens* tipo III Neter. *Hospital* 31 (5) : 671-684.
- ASSIS, A. de — 1947 a — *Shigella tietê*, novo tipo sorológico de bacilo disentérico. *Hospital* 32 (5) : 667-671.
- ASSIS, A. de — 1948 — *Shigella guanabara*, tipo sorológico destacado do grupo do *B. ceylonensis-dispar*. *Hospital* 33 (4) : 505-519.
- ASSIS, A. de, A. MONTEIRO FILHO e V. R. L. RIBEIRO — 1946 — Tipos sorológicos de *Shigella paradysenteriae* no Rio de Janeiro. *Hospital* 30 (3) : 367-374.
- ARAGÃO, R. M. de — 1943 — Da ação impediante de certos meios seletivos sobre o crescimento do *B. alkalescens*. *Hospital* 23 : 387-392.
- BANGXANG, E. e C. P. ELIOT — 1940 — An investigation of preserving solutions for the recovery of dysentery bacilli from fecal specimens. *Am. J. Hyg.* 31 (Section B) : 16-30.
- BOIVIN, A. e L. MESROBEANU — In Topley and Wilson's principles of Bacteriology and Immunity. 3. ed. rev. por Wilson and Miles, Baltimore, Williams & Wilkins, 1946 ; p. 693.
- BOJLEN, K. — Dysentery in Denmark. Copenhagen, Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S, 1934. Citado por J. Felsen in *Bacillary dysentery Colitis and enteritis*. Philadelphia, Saunders, 1945.

- BORNSTEIN, S., I. SAPHRA e J. B. DANIELS — 1941 — The occurrence of Salmonella antigens in dysentery bacilli. *J. Immunology* 42 : 401-404.
- BOYD, J. S. K. — 1935 — Bacillus dysenteriae, Shmitz, with brief note on certain other non-mannite fermenting bacilli. *J. Roy Army Med. Corps* 64 : 289-299.
- BOYD, J. S. K. — 1938 — The antigenic structure of the mannitol-fermenting group of dysentery bacilli. *J. Hygiene* 33 : 477-499.
- BOYD, J. S. K. — 1940 — The laboratory diagnosis of bacillary dysentery. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33 : 553-571.
- BREED, R. S., E. G. D. MURRAY e A. P. HITCHENS — BERGEY'S manual of determinative Bacteriology. 6. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1948.
- BROWN, M. H. e E. A. ANDERSON — 1936 — B. Alkalescens (Andrewes) : Its relation to members of the typhoid-dysentery group. *Canad. Pub. Health J.* 27 : 560-562.
- CARPENTER, P. L. — 1943 — Antigenic relationships of the species Shingella dispar. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 53 : 129-130.
- CARPENTER, P. L. — 1944 — Biochemical and serological properties of Shigella dispar. *J. Bacteriology* 47 : 419-420.
- CARPENTER, P. L. e C. A. STUART — 1950 — Relationships of Proshigella to other members of the enterobacteriaceae. *J. Immunology* 64(3) : 237-244.
- CASTELLANI, A. — 1907 — Notes on cases of fever frequently confounded with typhoid and malaria in the tropics. *J. Hygiene* 7 : 1-12.
- CASTELLANI, A. — 1911 — Reports of the Advisory Committee for the Tropical Diseases Research Found.
- CASTELLANI, A. e M. DOUGLAS — 1937 — Biochemical characters and agglutinative reactions of the metadysentery bacilli. *J. Trop. Med. Hyg.* 40 : 197-200.
- CHRISTENSEN, W. B. e G. H. GOWEN — 1944 — An arabinose-fermenting bacterium of the lactose-negative, mannitol-negative Shigella group. *J. Bacteriology* 47 : 171-176.
- CLAYTON, F. H. A. e S. H. WARREN — 1929 — Further study of unusual bacillus recovered from cases presenting symptoms of dysentery. *J. Hygiene* 29 : 191-200.
- COX, C. D. e G. I. WALLACE — 1948 — A study of Shigella isolated in India and Burma, with special reference to two previously undescribed sero-types. *J. Immunology* 60 : 465-473.
- DAVISON, W. C. — 1920 — Divisions of the so called flexner group of dysentery bacilli. *J. Exp. Med.* 32 : 651-663.
- DENIER, A. — 1915 — La dysenterie bacillaire à Saïgon. *Bull. Soc. Path. Exot.* 8 : 720-725.
- DENIER, A. e HUET — 1912 — La dysenterie à Saïgon. *Bull. Soc. Path. Exot.* 5 : 263-265.
- DOWNIE, A. W. e E. WADE — 1933 — An organism resembling the newcastle type of dysentery bacillus associated with cases of dysentery. *J. Hygiene* 33 : 196-203.
- DUVAL, C. W. — 1904 — Another member of the dysentery group. *J. A. M. A.* 43 : 381-383.
- EWING, W. H. — 1946 — An additional Shigella paradysenteriae Serotype. *J. Bacteriology* 51 : 433-445.
- EWING, W. H. — 1949 — The relationship of Shigella dispar to certain coliform bacteria. *J. Bacteriology* 53 : 497-500.
- EWING, J. O. e TAYLOR, J. — 1945 — Variations in the fermentative reactions of antigenically identical strains of Bact. Newcastle. *Month. Bull. Min. Health Emerg. Publ. Health Lab. Serv.* 4 : 130-133 e *Bull. Hygiene* 20 : 576.
- FARIA, G. de e G. PACHECO — 1923 — Ainda duas palavras sobre a dysentaria bacillar no Rio de Janeiro. *Brasil-Medico* 37 : 313-314.
- FELSEN, J. — Bacillary dysentery colitis and enteritis. Philadelphia, Saunders, 1945.
- FERGUSON, W. W. e W. E. WHEELER — 1946 — Two paracolon cultures related antigenically to Shigella paradysenteriae. *J. Bacteriology* 51 : 107-112.
- FERGUSON, W. W., M. BRANSTON, G. L. MCCALLUM e M. J. CARLSON — 1947 — Rapid identification of Shigella in a public health laboratory. *J. Lab. Clin. Med.* 32 : 349-359

- FICKER, M. — 1915 — Sobre a dysenteria em São Paulo. *An. Paul. Med. Cir.* 5 : 335-339.
- FLEXNER, S. — 1900 — On the etiology of tropical dysentery. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 11(115) : 231-242.
- GESTEIRA, M. — 1930 — A dysenteria bacillar no lactente. *Pediatria Pratica* 3 : 1-10.
- GILBERT, R. e M. B. COLEMAN — 1934 — Evidense that *B. alkalescens* (Andrewes) may be a variant of *B. typhosus*. *Am. J. Pub. Health* 24 : 449-452.
- GLYNN, J. H. e D. H. STARKEY — 1939 — The cultural and antigenic properties of *Shigella sonnei*. *J. Bacteriology* 37 : 315-331.
- GOBER, M., V. STACY e M. WOODROW — 1944 — A probably new type of nonmannitol-fermenting *Shigella*. *Am. J. Hyg.* 40 : 209-211.
- GODINHO, V. — 1917 — Dysenteria bacillar. *Ann. 1.º Cong. Med. Paul.* 2 : 119-124.
- GOEBEL, W. F., F. BINKLEY e E. PERLMAN — 1945 — Studies on the Flexner group of dysentery bacilli. I. The specific antigens of *Shigella paradysenteriae* (Flexner). *J. Exp. Med.* 81 : 315-330.
- GONZALEZ, L. M. e P. M. OTERO — 1945 — Antigenic and biochemical studies of *Sh. paradysenteriae* isolated in Puerto Rico. *J. Immunology* 50 : 373-376.
- GUIMARÃES, A. — 1922 — Epidemia de dysenteria bacillar. *Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo* 4 (2.ª série) : 293-295.
- GUIMARÃES, A. — 1922a — Bacteriologia e vacinoterapia da dysenteria. *Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo* 4 (2.ª série) : 342-343.
- GUIMARÃES, A. G. e M. CORTEZ — 1918 — Dysenteria bacillar. *Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo* 1 (2.ª série) : 67-76.
- HARDY, A. V., J. WATT e T. DECAPITO — 1943 — Studies of the acute diarrheal diseases. XI. The typing of *Shigella dysenteriae* Flexner. *Pub. Health Rep.* 58 : 696-699.
- HARDY, A. V. e J. WATT — 1944 — Newer procedures in laboratory diagnosis and therapy in the control of bacillary dysentery. *Am. J. Pub. Health* 34 : 503-509.
- HELLER, G. e S. G. WILSON — 1946 — A new species of *Shigella*. *J. Path. Bact.* 58 : 98-100.
- HISS JR., P. H. — 1904 — On fermentative and agglutinative characters of bacilli of the dysentery group. *J. Med. Research* 13 (1) : 1-51.
- HISS JR., P. H. e F. F. RUSSEL — 1903 — A study of a bacillus resembling the bacillus of Shiga, from a case of fatal diarrhea in a child; with remarks as the serognition of dysentery, typhoid, and allied bacilli. *Medical News N. Y.* 32 : 289-295.
- KLIGLER, I. J., E. OLEINIK e I. CZAZKES — 1943 — Improved tecnic for isolation of dysentery bacteria from stools by formaldehyde inactivation of bacteriophage. *Am. J. Pub. Health* 33 : 682-684.
- KRUSE, RITTERSHAUS, KEMP e METZ — 1907 — Dysenterie und pseudodysenterie. *Ztschr. f. Hygiene* 57 : 417-488.
- LAVINGTON, R. J., A. J. MATHESON, J. TAYLOR e W. J. D. FLEMING — 1946 — An institutional outbreak of diarrhoea due to a hitherto undescribed dysentery bacillus. *J. Path. Bact.* 58 : 101-103.
- LENTZ, O. e R. PRIGGE — Dysentery. *In Handbuch der pathogenen mikroorganismen.* 3. ed., Jena, Gustav Fischer, 1931 ; 3 : 1377-1584.
- LIMA, J. P. C. e L. Q. TELLES — 1940 — Produção de hidrogênio suflorado pela *Shigella ambigua* (Andrewes) Weldin. *Hospital* 17 (5) : 823-831.
- LUTZ, A. — 1898 — Relatório dos trabalhos do Instituto Bacteriologico durante o ano de 1897. *Rev. Med. S. Paulo* 1 : 177-178.
- MACLEANNAN, J. D. — 1945 — The non-mannitol-fermenting bacilli. *J. Path. Bact.* 57 : 307-315.
- MENDONÇA, F. C., de — 1931 — Investigações nas dysenterias do Rio de Janeiro no anno de 1930. *Brasil-Médico* 45 : 124-129.
- MONTEIRO FILHO, A. — 1946 — Nota sobre shigelose produzida por bacilo Manchester. *Hospital* 30 (5) : 797-801.

- MONTEIRO FILHO, A. — Contribuição ao estudo da bacteriologia das shigeloses. Tese de Concurso Faculdade Fluminense de Medicina, Rio de Janeiro, Gráfica Olímpica, 1947; p. 1-90.
- NABARRO, D. e D. G. EDWARD — 1939 — The pathogenicity of *Bacterium alkalescens*. *J. Path. Bact.* **49**: 515-528.
- NELSON, M. G. — 1947 — Non-mannitol-fermenting *Shigella flexneri*, type 103. *J. Path. Bact.* **59**: 316-318.
- NETER, E. — 1938 — The antigenic structure of *Shigella alkalescens* (Andrewes) and the demonstration of antibodies in the serum of patient with *Shigella alkalescens* infections. *J. Immunology* **35**: 339-350.
- NETER, E. — 1942 — The genus *Shigella* (dysentery bacilli and allied species). *Bact. Reviews* **6**: 1-36.
- NETER, E. — 1944 — Antigenic types of *Shigella alkalescens*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **57**: 200-203.
- NETER, E. e F. RAPOLLE — 1938 — Pathogenicity and antigenic structure of *Shigella alkalescens* (Andrewes). *Arch. Pathology* **25**: 298.
- PACHECO, G. — 1925 — A dysentria bacillar na cidade da Bahia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **18**: 5-41.
- PACHECO, G. e F. C. MENDONÇA — 1930 — Um anno de investigações nas dysenterias do Rio de Janeiro. *Arch. Hygiene* **4**: 5-39.
- PACHECO, G. e C. RODRIGUES — 1928 — Sobre as características bacteriológicas dos bacillos dysentéricos. *Arch. Inst. Biol.* **1**: 217-233.
- PACHECO, G. e C. RODRIGUES — 1930 — Sobre as características bacteriológicas dos bacillos dysentericos. *Arch. Inst. Biol.* **3**: 145-176.
- PERLMAN, E. e W. F. GOEBEL — 1946 — Studies on the Flexner group of dysentery bacilli. IV. The serological and toxic properties of the somatic antigens. *J. Exp. Med.* **84**: 223-234.
- PESTANA, B. R. e M. J. FARACO — 1940 — Do emprego de agar-desoxycholato de sodium-citrato (Leifson) para isolar bacilos disentéricos. *An. Paul. Med. Cir.* **40**: 307-314.
- PESTANA, B. R. e M. J. FARACO — 1942 — Exame bacteriológico de fezes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2**: 269-287.
- PESTANA, B. R. e L. Q. TELLES — 1947 — Membros manita-indol-negativos do gênero *Shigella*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **7**: 8-40.
- PLANET DO AMARAL, J. — Antígenos de *Salmonella* em bacilo Flexner II. Trabalho apresentado na III.ª Reunião Conjunta das Sociedades de Biologia do Brasil. Bahia, agosto de 1949.
- RIBEIRO, V. R. L. — 1946 — Verificação de bacilos disentéricos do grupo Newcastle-Boyd-88 no Rio de Janeiro. *Hospital* **29** (3): 383-391.
- SACHS, A. — 1943 — Report on investigation into characteristics of new types of non-mannitol-fermenting bacilli isolated from cases of bacillary dysentery in India and Egypt. *J. Roy. Army Med. Corps* **80**: 92-991.
- SHIGA, K. — 1898 — Ueber den Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Centralblatt f. Bacteriologie*, I. Abt. Orig. **24**: 817-828.
- SMOLENS, J., S. P. HALBERT, S. MUDD, B. W. DOAK e L. M. GONSALES — 1946 — Studies with the somatic antigen of *Shigella paradysenteriae* (Flexner). *J. Immunology* **52**: 41-58.
- STRONG, R. P. e W. E. MUSGRAVE — 1900 — Reports on the etiology of the dysenteries of Manila-Report of the Surgeon General of the Army 251, Washington, D. C. Citado por J. Felsen in *Bacillary dysentery colitis and enteritis*, Philadelphia, Saunders, 1945.
- STUART, C. A., R. RUSTIGIAN, A. ZIMMERMAN e F. V. CORRIGAN — 1943 — Pathogenicity, antigenic relationships and evolutionary trends of *Shigella alkalescens*. *J. Immunology* **47**: 425-437.
- TAUNAY, A. de E. e M. J. FARACO — 1942 — Comportamento sorológico da *Shigella alkalescens*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2**: 248-252.

- TAUNAY, A. de E. e M. J. FARACO — 1943 — Contribuição ao estudo da *Shigella* dispar. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 3 : 236-243.
- TAUNAY, A. de E., G. A. CORRÊA e C. T. FLEURY — 1945 — Frequência de alguns agentes microbianos nas chamadas diarréias infantis em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 5 : 331-336.
- TAUNAY, A. de E., S. S. de ALMEIDA e J. R. C. NOVAES — 1948 — Sorologia da *Sh. paradysenteriae*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 8 : 31-40.
- TAUNAY, A. de E., S. S. de ALMEIDA, J. R. C. NOVAES e M. J. FARACO — 1948a — Bacilo Flexner com um componente antigênico de salmonela. *Hospital* 33 (2) : 211-214.
- TAUNAY, A. de E., J. R. C. NOVAES, S. S. de ALMEIDA e R. C. MAUGÉ — 1948b — Tipos de shigelas não fermentadoras da manita encontradas em São Paulo. *Hospital* 33 : 49-56.
- TOPLEY, W. W. C. e G. S. WILSON — Principles of Bacteriology and Immunity. 3. ed. rev. por Wilson and Miles, Baltimore, Williams & Wilkins, 1946.
- VEAZIE, L. — 1949 — A new type of phase variation in the 103 race of *Shigella paradysenteriae*. *J. Immunology* 61 : 307-314.
- VERNIC, C. S. — 1948 — Verificação de portadores de bacilo Manchester e de *Shigella tietê* em Belém, Pará. *Rev. Serv. Esp. Saúde Púb.* 1 (4) : 967-976.
- WATT, J., A. V. HARDY e T. DeCAPITO — 1942 — Studies of the acute diarrheal diseases. VII. Carriers of *Shigella dysenteriae*. *Pub. Health. Rep.* 57 : 524-529.
- WEIL, A. J. — 1943 — Review. Progress in the study of bacillary dysentery. *J. Immunology* 46 : 13-46.
- WEIL, A. J. — 1947 — Dysentery. A progress report for the years 1942 to 1946. *J. Immunology* 55 : 363-405.
- WEIL, A. J., J. BLACK e K. FARSETTA — 1944 — The serological types of *Shigella paradysenteriae* (Flexner). I. Types with single primary antigen. *J. Immunology* 49 : 321-340.
- WEIL, A. J. e H. SLAFKOVSKY — 1948 — *Shigella tietê*. *J. Bacteriology* 55: 759-762.
- WEIL, A. J., A. ASSIS e H. SLAFKOVSKY — 1948 — *Shigella rio*, a new type of *Shigella*. *J. Immunology* 58 : 23-26.
- WELCH, H. e F. L. MIKLE — 1934 — Relationship of *Shigella alkaescens* to other members of the *Shigella* group. *Am. Pub. Health* 24 : 219-228.
- WHEELER, K. M. — 1944 — Antigenic relationships of *Shigella paradysenteriae*. *J. Immunology* 48 : 87-101.
- WHEELER, K. M. — 1944a — Serological identification of dysentery bacilli. *Am. J. Pub. Health* 34 : 621-629.
- WHEELER, K. L. e F. L. MIKLE — 1945 — Antigens of *Shigella sonnei*. *J. Immunology* 51 : 257-267.
- WHEELER, K. M. e C. A. STUART — 1946 — The mannitol-negative *Shigella* group. *J. Bacteriology* 51 : 317-325.

RAÇÃO ALIMENTAR PURIFICADA COMO FATOR DE APARECIMENTO DE MICROSPORIA EM GATOS

por

FLORIANO DE ALMEIDA

Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo :

A. CARVALHO SILVA

Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

C. HABERBECK BRANDÃO

Do Instituto Adolfo Lutz

E. LEMOS MONTEIRO

Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

e da

Fundação Andréa e Virginia Matarazzo

R. ALMEIDA MOURA

Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Ao Quinto Congresso Internacional de Microbiologia, realizado em agosto de 1950, no Rio de Janeiro, apresentamos um trabalho intitulado: "Saprotitismo do *Microsporium canis* em gatos". Neste estudo, focalizamos várias questões, que foram amplamente discutidas no referido Congresso. Admitiu-se, como possível, a existência saprofítica de esporos, não só do *Microsporium*, como de outros fungos produtores de tinhas. Tal fato explicaria o aparecimento de certos parasitos dessas micoses, em regiões onde, anteriormente, não haviam sido assinalados.

O seu transporte seria feito por portadores humanos, ou mesmo animais, no decurso de migrações de povos.

A imigração seria também uma modalidade desse fato. Em São Paulo, por exemplo, durante muitos anos, só se conheciam casos de favo importados. Depois, começaram a surgir casos autóctones. Um de nós (F. A.) pôde, certa ocasião, estudar 3 meninos portadores de lesões favosas, brasileiros de nascimento, porém filhos de pais italianos. A mãe dos meninos, quando ainda em seu país de origem, tivera favo e fôra curada, nunca mais apresentando qualquer lesão. Para explicar as lesões dos filhos, poder-se-ia admitir, então, que ela se manteve como portadora dos esporos do *Trichophyton Schoeleini* durante muitos anos.

Um fato também interessante, assinalado no mesmo trabalho, foi a perda do cio por parte dos animais doentes, cio esse que reaparecia quando o animal sarava de suas lesões.

Este fato nos leva a considerar os animais em dieta fisiologicamente em condições semelhantes às das crianças impúberes, quando então são sujeitas a infecções por *Microsporum* e *Trichophyton*, agentes das tonsurantes infantís, cujas lesões desaparecem, espontâneamente, com a puberdade.

Nos animais, com a supressão da dieta purificada, surgem, novamente, os hormônios sexuais e as lesões desaparecem.

Nas crianças com tonsurantes, está sendo, atualmente, empregado um tratamento eficiente com hormônios, fato que estabelece uma nítida relação antagonica entre homônio e fungo.

Nestes últimos tempos, muitos e interessantes estudos vêm sendo feitos, permitindo-nos fazer várias suposições. Assim, observações de diversos pesquisadores, entre os quais ROTHMAN e colab. (1947), mostraram que os cabelos dos adultos são ricos em um ácido graxo, o ácido pelargônico que possui ação fungistática. Os cabelos das crianças, ao contrário, têm esse ácido em pequena quantidade, insuficiente talvez para exercer a referida ação, o que explica, em parte, o aparecimento das tonsurantes infantís.

Esses dois fatores, hormônios e ácido pelargônico, existentes nos adultos, possuem, indiscutivelmente, ação impediante contra as tinhas tonsurantes.

Qual déles, porém, apresenta maior importância? Dificil dizer, pois, se o ácido pelargônico teve sua ação provada experiementealmente, como demonstraram também os trabalhos de VILLANOVA e colab. (1948), o outro, o hormônio, vem demonstrando seu valor terapêutico já há vários anos. Verdade que sua aplicação não é completamente inofensiva, pois, em diversos casos, tem sido observado um estímulo dos caracteres sexuais secundários, traduzidos pelo aparecimento de manifestações para o lado dos órgãos genitais e glândulas mamárias, reações essas que obrigam a suspensão temporária do tratamento.

Ainda como sugestão ou lembrança para novos estudos, podemos citar a possível ação do ácido hialurônico, existente na substância intercelular do tecido mesodérmico, a qual deve sua consistência viscosa ao referido ácido.

As questões acima lembradas são muito recentes e constituem assunto de intensas investigações, razão porque sôbre elas apenas fazemos considerações muito ligeiras.

Num futuro próximo, certamente, teremos uma explicação da razão porque só há lesões tonsurantes nos cabelos das crianças antes da puberdade.

RESUMO

Como continuação do trabalho "Saprotitismo do *Microsporum canis*", apresentado ao Quinto Congresso Internacional de Microbiologia, realizado em 1950, no Rio de Janeiro, os autores fazem agora novas considerações sôbre as possíveis causas do aparecimento de casos de tinhas tonsurantes e do favo. Admitem a possibilidade da existência dos fungos responsáveis por essas micoses em estado saprofitico em homens e animais.

Aventam depois, como prováveis causas naturais de cura dessas micoses na puberdade, não só o aparecimento dos hormônios sexuais, mas também um ácido graxo, o ácido pelargônico que, nos cabelos dos adultos, é 4 a 5 vêzes mais abundante que nos cabelos das crianças e que surge com a puberdade.

A qual dos 2 fatores deverá ser atribuída a cura do processo micológico e que relação apresentam eles entre si é o que deverá ser esclarecido pelos pesquisadores que dêsse assunto se ocuparem.

SUMMARY

In continuation to the paper entitled "Saprophytismo do *Microsporium canis*" presented at the Fifth International Congress for Microbiology, in Rio de Janeiro, in 1940, there are made here new considerations about the probable causes of the appearance of *tinea tonsurans* and *favus*. The authors admit the possibility of the existence of the fungi responsible for these mycoses, in saprophytic condition, both in man and animal.

They admit, as probable natural causes for the cure of these mycoses in puberty, not only the occurrence of the sexual hormones, but also a fatty acid, the pelargonic acid, which is from 4 to 5 times more abundant in the hair of adults than in those of children and which appears with puberty.

It is up to the research workers, who are studying this subject, to prove to which of these two agents there is to be attributed the cure of the mycological process and to demonstrate the relation which exists between them.

RÉSUMÉ

Comme suite du travail nommé "Saprophytismo do *Microsporium canis*", présenté au Cinquième Congrès International de Microbiologie, qui avait eu lieu à Rio de Janeiro, en 1950, les auteurs font maintenant de nouvelles considérations à sujet des causes possibles de l'apparence de *tinea tonsurans* et du *favus*. Ils admettent la possibilité de l'existence des champignons responsables pour ces mycoses en état saprophytique dans l'homme et les animaux.

Ils présentent, comme causes naturelles probables de la guérison de ces mycoses dans la puberté non seulement l'apparence des hormones sexuels, mais aussi un acide gras, l'acide pélargonique qui, dans les cheveux des adultes, est 4 à 5 fois plus abondant que dans les cheveux des enfants et que surgit avec la puberté.

C'est aux pesquisadores qui s'occuperont de ce sujet d'expliquer à quel des deux facteurs devra être attribuée la guérison du procès mycologique et quelle relation existe entre eu.

BIBLIOGRAFIA

- FONZARI, M. — 1951 — Micoses cutâneas e ácidos graxos. *Arq. Biologia (S. Paulo)* **35** (303): 54-57.
- POTH, D. O. e S. R. KALISKI — 1942 — Estrogen therapy of Tinea capitis. Preliminary Reports. *Arch. Dermat. Syph.* **45**: 121-128.
- ROTHMAN, S., A. M. SMILJANIC, A. L. SHAPIRO e A. W. WEITKAMP — 1947 — The spontaneous cure of Tinea capitis in puberty. *J. Invest. Dermat.* **3** (2): 81-98.
- TOPPLEY, W. W. C. e G. S. WILSON — Principles of Bacteriology and Immunity. 3. ed. rev. por Wilson and Miles, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1946; **2**: 1013.
- VILLANOVA, X., F. G. VALDECASA, M. CASANOVAS e P. PUIG MUSSET — 1948 — Investigaciones sobre los efectos fungicidas e fungistáticos de los ácidos grasos obtenidos del cabello humano del adulto. *Med. Clínica* **10** (6): 380-382.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE BELLIER EM ÓLEOS VEGETAIS ; SUA APLICAÇÃO NA DOSAGEM DE ÓLEO DE AMENDOIM EM MISTURAS

CLEMENTINA AMATO

e

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA

Do Instituto Adolfo Lutz

O Índice de Bellier vem sendo usado, ultimamente, como um precioso auxiliar para a determinação da porcentagem de óleo de amendoim, não só em mistura com óleo de oliva, como também em mistura com outros óleos comestíveis.

Índice de Bellier de um óleo é, segundo MARCILLE (1939), a temperatura na qual se inicia a cristalização dos ácidos graxos e de seus sais de potássio, ao ser o óleo submetido à técnica de Bellier.

Já FRANZ e ADLER (1912) mostraram que o método qualitativo de Bellier dava resultados quantitativos aproximados na determinação de óleo de amendoim em mistura com óleo de oliva. Publicaram, conjuntamente, uma tabela, na qual uma determinada temperatura de cristalização correspondia a uma certa porcentagem de óleo de amendoim.

ISSOGLIO (1927) e SERNAGIOTTO (1936) aconselham o Índice de Bellier para a determinação quantitativa aproximada de óleo de amendoim adicionado ao óleo de oliva.

O cálculo aproximado, pelo Índice de Bellier, do óleo de amendoim presente em óleo de oliva também é adotado pelo "Manuel Suisse de Denrées Alimentaires".

EVERS (1937), fazendo uma pequena modificação na técnica de Bellier, também afirma que a temperatura de turvação é uma medida digna de confiança da quantidade de óleo de amendoim em mistura com óleo de oliva. Evers ainda afirma que, numa mistura, quando a proporção de óleo de amendoim está acima de 10%, a temperatura de turvação do óleo de oliva componente da mistura não tem influência apreciável no resultado. Este mesmo pesquisador ainda apresenta uma tabela de temperaturas de turvação de misturas de óleo de amêndoa com óleo de amendoim, temperaturas estas crescentes com a quantidade de óleo de amendoim.

MARCILLE (1939), em minucioso trabalho, além de determinar a porcentagem de óleo de amendoim em óleo de oliva, também utiliza o Índice de Bellier para a dosagem de óleo de amendoim em óleo de linho.

Trabalho apresentado ao V Congresso Sul-Americano de Química realizado em Lima, maio de 1951. Entregue para publicação em 20 de agosto de 1951.

YALOUR (1943) afirma que o método de Bellier permite avaliar, não só o conteúdo de óleo de amendoim em óleo de oliva, como também em outros óleos como de algodão, nabo, girassol, milho e apresenta vários quadros com os Índices de Bellier de diferentes misturas.

NARAYANAIAER (1945) também determina, por meio do Índice de Bellier, a porcentagem de óleo de amendoim em mistura com diferentes óleos, entre eles o óleo de gergelim.

KIRSTEN (1949) conclui, de suas experiências, que o Índice de Bellier pode ser utilizado na obtenção aproximada da quantidade de óleo de amendoim em misturas.

Com a citação destes dados da literatura, queremos salientar que o Índice de Bellier, primitivamente usado como constante característica do óleo de amendoim, tornou-se, com o desenrolar das experiências e aperfeiçoamento de sua técnica, um método capaz de dosar, embora aproximadamente, a porcentagem de óleo de amendoim em outros óleos.

MATERIAL

Determinamos o Índice de Bellier em óleos de amendoim, oliva, algodão, gergelim, milho, patauá, soja, castanha de caju e semente de uva e em misturas, por nós preparadas, de óleo de amendoim com diferentes óleos comestíveis.

MÉTODO

O método original de Bellier tem sofrido modificações por parte de diferentes pesquisadores. Adotamos a técnica seguida por SILVEIRA L. (1941), do Laboratório Bromatológico do Rio de Janeiro.

Reagentes :

Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 8% (álcool etílico a 95%)

Ácido acético (1+3) — Ajustar, convenientemente, esta solução, de modo que 1,25 ml neutralizem 5 ml da solução de hidróxido de potássio.

Álcool etílico a 70% — Ajustar o grau alcoólico a 15°C.

Técnica :

Transferir, com o auxílio de uma pipeta, 1 ml do óleo para um frasco Erlenmeyer de 125 ml (medir em pipeta com 2 traços e escoar o óleo lentamente). Adicionar 5 ml de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 8%. Adaptar ao frasco Erlenmeyer um refrigerante de refluxo. Aquecer em banho-maria fervente, por 10 minutos. Esfriar a 30-40°C. Adicionar 50 ml de álcool etílico a 70%. Agitar. Adicionar 1,5 ml de ácido acético (1+3). Agitar. Adaptar ao frasco um termômetro de 50°C, dividido em décimos de grau, de maneira que o bulbo mergulhe no líquido. Se houver turvação, aquecer, lentamente, em banho-maria, até cerca de 10°C acima do índice suposto. Resfriar, gradualmente, o frasco em banho de água, da seguinte maneira : mergulhar, sucessivamente, o frasco, durante alguns segundos, sempre agitando, retirar e agitar por 10 a 20 segundos. A temperatura deve baixar lentamente. Tomar, como Índice de Bellier, a temperatura na qual se notar o início de uma turvação.

RESULTADOS

O Índice de Bellier foi determinado em óleos do comércio enviados, para análise, ao Instituto Adolpho Lutz. Dêstes óleos, selecionamos os que se apresentavam com características normais ao serem submetidos às provas usuais de pureza de um óleo.

a — Óleo de amendoim

Determinamos o Índice de Bellier em 62 amostras de óleo de amendoim. Os resultados estão reunidos na tabela 1.

TABELA 1
ÓLEO DE AMENDOIM

Amostra n.º	Índice de Bellier	Amostra n.º	Índice de Bellier
1.....	41,3	32.....	40,5
2.....	41,2	33.....	41,0
3.....	41,3	34.....	40,0
4.....	42,0	35.....	41,5
5.....	42,0	36.....	40,2
6.....	40,8	37.....	39,7
7.....	40,2	38.....	39,9
8.....	40,7	39.....	40,0
9.....	41,0	40.....	41,0
10.....	41,3	41.....	40,6
11.....	41,4	42.....	40,0
12.....	42,2	43.....	41,0
13.....	41,4	44.....	40,1
14.....	42,2	45.....	40,3
15.....	42,0	46.....	40,1
16.....	42,2	47.....	39,8
17.....	41,5	48.....	40,0
18.....	41,0	49.....	40,2
19.....	41,0	50.....	40,0
20.....	41,0	51.....	40,0
21.....	42,0	52.....	40,2
22.....	41,4	53.....	40,5
23.....	40,2	54.....	42,5
24.....	41,4	55.....	41,5
25.....	42,5	56.....	42,3
26.....	41,2	57.....	41,7
27.....	40,9	58.....	41,3
28.....	41,2	59.....	42,0
29.....	42,3	60.....	41,6
30.....	42,5	61.....	40,0
31.....	41,4	62.....	41,7

Média 41,0

Desvio padrão $\pm 0,80$

Vemos, por êstes dados, que os valores máximo e mínimo do Índice de Bellier em óleo de amendoim são, respectivamente, 42,5 e 39,7, sendo a média 41,0 e o desvio padrão $\pm 0,80$.

Consultando a literatura ao nosso alcance, verificamos que MARCILLE (1939) apresenta, para o Índice de Bellier de óleo de amendoim, uma variação de 38 a 41°; Yalour dá, para óleos argentinos, o mínimo de 39,5 e o

máximo de 42°; em "The Extra Pharmacopœia" de MARTINDALE (1943), a variação é de 38-41°. Os nossos resultados são ligeiramente mais altos, aproximando-se mais dos dados de Yalour. Este autor, porém, apresenta o resultado de 8 amostras, ao passo que o número de determinações por nós realizadas permite uma apreciação mais significativa. Quanto aos outros autores, apresentam apenas os valores máximo e mínimo, não especificando o número de amostras.

b — Óleo de oliva

O Índice de Bellier foi determinado em 77 amostras de óleos de oliva, estando os resultados englobados na tabela 2.

TABELA 2
ÓLEO DE OLIVA

Amostra n.º	Índice de Bellier	Amostra n.º	Índice de Bellier
1.....	14,2	40.....	17,7
2.....	14,2	41.....	14,1
3.....	14,8	42.....	15,1
4.....	13,6	43.....	14,2
5.....	15,8	44.....	16,4
6.....	18,4	45.....	17,5
7.....	14,5	46.....	14,2
8.....	14,9	47.....	16,1
9.....	13,2	48.....	13,4
10.....	13,2	49.....	16,0
11.....	15,0	50.....	14,4
12.....	17,0	51.....	15,2
13.....	18,0	52.....	12,5
14.....	17,4	53.....	16,4
15.....	17,8	54.....	16,7
16.....	19,5	55.....	14,6
17.....	19,0	56.....	14,7
18.....	18,5	57.....	16,7
19.....	16,8	58.....	17,0
20.....	16,6	59.....	18,0
21.....	17,6	60.....	14,6
22.....	18,2	61.....	14,5
23.....	17,5	62.....	18,5
24.....	17,5	63.....	19,3
25.....	15,4	64.....	18,6
26.....	17,6	65.....	18,7
27.....	18,0	66.....	17,7
28.....	14,2	67.....	19,4
29.....	13,0	68.....	17,6
30.....	17,8	69.....	17,2
31.....	16,0	70.....	14,5
32.....	16,0	71.....	15,2
33.....	16,7	72.....	15,8
34.....	14,3	73.....	15,4
35.....	14,1	74.....	16,3
36.....	17,8	75.....	14,8
37.....	14,7	76.....	17,0
38.....	14,8	77.....	15,2
39.....	15,0		

Média 16,1

Desvio padrão $\pm 1,71$

De acôrdo com as nossas determinações, o Índice de Bellier de óleos de oliva apresentou o valor máximo de 19,5, o mínimo de 12,5, a média 16,1 e o desvio padrão de $\pm 1,71$.

MARCILLE (1939) apresenta o resultado de um grande número de amostras com os valores extremos de 9,5 e 19. Apesar de MARCILLE (1939) e L. SILVEIRA (1941) acharem excepcional o índice 19, encontramos, além de uma amostra com êsse valor, mais 3 acima dêle (19,3 ; 19,4 e 19,5). Em contra-posição, o nosso mínimo 12,5 é bem mais elevado que o encontrado por Marcille (9,5).

Já Yalour dá, para 18 amostras de óleo de oliva, os valores máximo e mínimo de 17 e 14, respectivamente.

c — Óleo de algodão

Determinamos o Índice de Bellier em 32 amostras de óleo de algodão, estando os resultados reunidos na tabela 3.

TABELA 3
ÓLEO DE ALGODÃO

Amostra n.º	Índice de Bellier	Amostra n.º	Índice de Bellier
1.....	18,7	17.....	18,6
2.....	19,3	18.....	19,9
3.....	19,3	19.....	20,0
4.....	19,3	20.....	20,6
5.....	20,6	21.....	19,7
6.....	20,8	22.....	20,7
7.....	21,3	23.....	20,4
8.....	21,2	24.....	19,5
9.....	19,8	25.....	19,0
10.....	20,8	26.....	18,6
11.....	21,4	27.....	18,6
12.....	19,3	28.....	19,6
13.....	19,6	29.....	19,3
14.....	19,4	30.....	20,4
15.....	20,7	31.....	21,2
16.....	18,9	32.....	21,0

Média 19,9

Desvio padrão $\pm 0,86$

Obtivemos, para o Índice de Bellier em óleos de algodão, a média 19,9, o desvio padrão $\pm 0,86$ e os valores máximo e mínimo 21,4 e 18,6, respectivamente.

YALOUR (1943), para 2 amostras de óleo de algodão, dá os valores 20 e 22 e L. SILVEIRA (1941), para 4 amostras, o valor 18,5, enquanto que as nossas determinações oscilam entre os valores extremos dêstes dois pesquisadores.

d — Outros óleos

Determinamos, ainda, o Índice de Bellier em algumas amostras de outros óleos comestíveis, estando os resultados englobados na tabela 4.

TABELA 4

Óleos	Amostra n.º	Índice de Bellier	Média
Gergelim	1	20,4	19,9
	2	20,0	
	3	19,6	
	4	19,2	
	5	20,4	
Patauá	1	14,2	14,7
	2	15,6	
	3	16,0	
	4	13,2	
Soja	1	20,0	19,7
	2	19,4	
	3	19,7	
Milho	1	21,2	22,9
	2	26,6	
	3	20,9	
Castanha de caju	1	21,8	21,2
	2	20,6	
Semente de uva	1	12,6	

De 5 amostras de óleo de gergelim (sésamo) obtivemos a média 19,9, estando todos os valores bem próximos da média. Apenas em NARAYANAIER (1945) encontramos uma referência ao Índice de Bellier de óleo de gergelim com o valor 19-20.

Quanto ao nosso óleo de patauá, que tanto se assemelha ao óleo de oliva, encontramos, para 4 amostras, a média 14,7; é esta, pois, mais uma característica do óleo de patauá idêntica à do óleo de oliva.

Para 3 amostras de óleo de soja, obtivemos a média 19,7, valor êste de acôrdo com os dados conhecidos.

De 3 amostras de óleo de milho, obtivemos os índices 21,2, 20,9 e 26,6, estando o mais alto dêles concorde com os de YALOUR (1943): 25 a 26,5.

Quanto aos óleos de castanha de caju e de semente de uva, não encontramos, na literatura, indicação alguma no que se refere ao Índice de Bellier. Obtivemos, para a única amostra de óleo de semente de uva que tivemos a oportunidade de analisar, o valor 13,2 e, para 2 amostras de óleo de caju, os valores 21,8 e 20,6.

e — Misturas de óleos

Empregamos o Índice de Bellier para dosar o óleo de amendoim em mistura com diferentes óleos comestíveis. Não foram preparadas misturas com óleos de oliva, por já existir, na literatura, um grande número de observações. Preparamos misturas de óleo de amendoim, variando de 10 em 10%, com óleos de algodão, gergelim, milho e semente de uva.

Os resultados estão reunidos nas tabelas 5, 6, 7 e 8; com êstes dados, construímos as respectivas curvas reunidas no gráfico I.

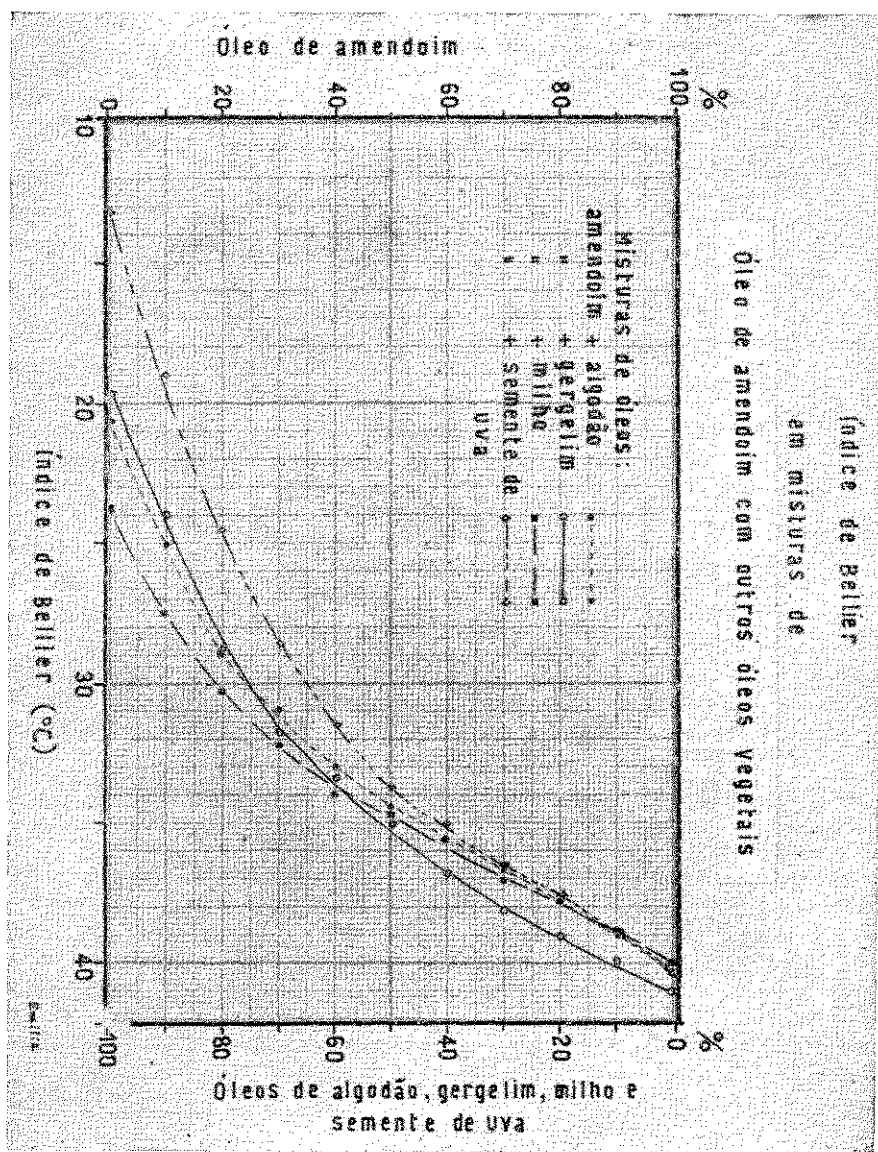


TABELA 5

Óleo de		Índice de Bellier
Amendoim %	Algodão %	
100	0	40,2
90	10	38,9
80	20	37,7
70	30	36,6
60	40	35,5
50	50	34,4
40	60	33,0
30	70	30,9
20	80	28,7
10	90	25,0
0	100	20,6

TABELA 6

Óleo de		Índice de Bellier
Amendoim %	Gergelim %	
100	0	41,0
90	10	39,9
80	20	39,0
70	30	38,1
60	40	36,8
50	50	35,0
40	60	33,4
30	70	31,8
20	80	28,8
10	90	24,0
0	100	19,6

TABELA 7

Óleo de		Índice de Bellier
Amendoim %	Milho %	
100	0	40,0
90	10	38,7
80	20	37,8
70	30	36,5
60	40	35,5
50	50	34,7
40	60	34,0
30	70	32,2
20	80	30,2
10	90	27,5
0	100	23,8

TABELA 8

Óleo de		Índice de Bellier
Amendoim %	Semente de uva %	
100	0	40,2
90	10	38,8
80	20	37,6
70	30	36,3
60	40	35,0
50	50	33,7
40	60	31,5
30	70	28,5
20	80	24,5
10	90	19,0
0	100	13,2

Dos resultados obtidos, concluímos que o Índice de Bellier das misturas depende diretamente da quantidade de óleo de amendoim presente.

Assim, uma determinada temperatura de turvação corresponde a uma porcentagem de óleo de amendoim. Não nos esqueçamos de ponderar sobre a variação dos índices de uma mesma espécie de óleo; observamos, porém, que a influência do óleo componente diminui com o aumento da proporção de óleo de amendoim, sendo que, acima de 50%, não tem influência apreciável no resultado.

O método, embora aproximado, mostrou-se prático, seguro e apropriado para a determinação da porcentagem de óleo de amendoim em mistura com outros óleos comestíveis.

f —

Como já observamos atrás, o primitivo método de BELLIER (1899) tem sofrido modificações :

I) Em primeiro lugar, surge o problema da tomada da amostra, para a qual vários autores propõem a pesada de 1 g, em vez de pipetar 1 ml.

Na 7.^a edição (1950) de "Methods of Analysis of Assoc. of Of. Agric. Chem.", em que o método modificado de Bellier é tornado oficial, a tomada da amostra é indiferente : pesar 0,92 g ou medir 1 ml da amostra.

KIRSTEN (1949) acha que os resultados provenientes da medida de 1 ml da amostra concordam com os da pesagem de 0,92 g, não havendo vantagem no uso de pesadas de amostras.

LACERDA (1947) propõe pesar 1 g e apresenta, ao mesmo tempo, causas de erro na medida de 1 ml.

Apresentamos, na tabela 9, os resultados do Índice de Bellier de alguns óleos, pesando 1 g e medindo 1 ml.

TABELA 9

Óleos	1 ml	1 g	Óleos	1 ml	1 g
Amendoim	40,3	41,0	Oliva	14,5	14,8
Amendoim	40,1	40,8	Oliva	17,6	18,0
Amendoim	40,0	41,0	Oliva	19,3	20,0
Amendoim	39,9	40,2	Algodão	19,0	19,9
Amendoim	40,0	40,7	Algodão	20,4	21,1
Amendoim	39,9	40,7	Milho	21,2	21,5

Observamos, por estes resultados, que, quando se toma 1 g da amostra, a temperatura de turvação é mais elevada do que quando se trabalha com 1 ml. Nas nossas experiências, o aumento da temperatura de turvação variou de 0,3 a 1°C.

LACERDA (1947) dá, para 3 amostras analisadas, a diferença de 1°C. Este aumento constante deve, por certo, ter sido encontrado dado o pequeno número de amostras analisadas pelo autor. Mais lógico é a obtenção de aumentos variáveis, pois que um aumento constante implicaria na igualdade da densidade, viscosidade e de outras propriedades que influem na medida de volume de óleos.

Na verdade, também achamos que a tomada da amostra por pesagem é de melhor técnica ; entretanto, desde que se faça a medida com determinadas precauções, como : usar pipeta aferida de dois traços, com ponta larga, e escoar o óleo lentamente, os resultados obtidos também são comparáveis ; o que tem importância, porém, é que se trabalhe sempre nas mesmas condições.

II) Outra modificação a ressaltar na técnica de Bellier é a que se refere aos reagentes. Este ponto é de importância capital, visto como o Índice de Bellier varia conforme os reagentes empregados.

Na tabela 10, reunimos os resultados dos Índices de Bellier obtidos empregando-se a técnica usada pelo Instituto Adolpho Lutz, a proposta por LACERDA (1947) e a adotada pelo A. O. A. C..

TABELA 10
ÍNDICE DE BELLIER — COMPARAÇÃO DE RESULTADOS

ÓLEOS	MÉTODOS		
	Inst. Adolfo Lutz	Lacerda	A. O. A. C.
Amendoim	40,3	43,5	36,0
Amendoim	40,1	43,1	35,7
Amendoim	40,0	43,2	35,2
Amendoim	39,9	43,1	35,4
Amendoim	40,0	43,3	37,0
Amendoim	39,9	43,7	36,4
Oliva	14,5	16,6	6,8
Oliva	17,6	20,2	9,8
Oliva	19,3	22,0	12,5
Algodão	19,0	21,8	12,5
Algodão	20,4	23,8	13,8
Milho	21,2	23,1	14,9

Na técnica por nós adotada, empregamos solução alcoólica de hidróxido de potássio a 8% (álcool etílico a 95%) para saponificar o óleo e ácido acético (1+3) para acidificar o meio.

Alguns analistas acham inconveniente o emprêgo desta solução alcoólica de potassa porque, 3 dias depois do seu preparo, ela vai adquirindo côr amarela, mesmo quando guardada em frasco escuro. Partindo-se de uma solução nestas condições, obtemos, na diluição final com álcool etílico a 70%, uma solução amarelada, porém límpida e perfeitamente transparente. A coloração da solução não impede que se perceba nitidamente o início da cristalização. A solução de potassa é rejeitada quando se inicia o depósito de algum precipitado.

LACERDA (1947) propõe uma solução de ácido acético mais concentrada e também a substituição do álcool etílico pelo metílico; com este solvente, a solução de potassa se mantém incolor, sem haver, também, formação de precipitado. Trabalhando nestas condições, a solução alcoólica final é incolor; notamos, porém, em cêrca de metade dos casos que, ao diluirmos com álcool a 70°, a solução se torna ligeiramente opalescente, o que dificulta a observação do início da turvação.

O que achamos vantajoso nesta técnica é o fato de fornecer temperaturas de turvação mais elevadas, o que torna o método mais rápido e simples.

Na técnica adotada pelo "Methods of Analysis of the Association Official Agricultural Chemists", o ácido acético é substituído pelo ácido clorídrico e a solução de potassa é um pouco mais concentrada; recomenda-se, ainda, purificar o álcool etílico. Tal purificação, porém, não resolve o problema, pois, 6 dias após o preparo da solução de potassa, esta também começa a adquirir côr amarela.

Com este processo, o início da cristalização é mais nítido e mais fácil de ser percebido, porém tem o inconveniente de apresentar temperaturas de cristalização bem mais baixas. Tal fato, principalmente em nosso meio de clima quente, acarreta a desvantagem do processo se tornar mais demorado e de execução mais difícil.

Em resumo, os três processos, se não são totalmente perfeitos, também não apresentam inconvenientes graves. O que se torna necessário, imprescindível mesmo, é que tôdas as determinações sejam feitas por um só processo, a fim de que os resultados sempre possam ser comparáveis.

RESUMO

O Índice de Bellier foi determinado numa série de óleos vegetais comestíveis e utilizado para a dosagem do óleo de amendoim em mistura com outros óleos.

a) O Índice de Bellier, nos óleos de amendoim analisados, variou de 39,7 a 42,5°C (média 41,0 e desvio padrão $\pm 0,80$); nos óleos de oliva, a variação foi de 12,5 a 19,5°C (média 16,1 e $\sigma \pm 1,71$); nos óleos de algodão, o índice variou de 18,6 a 21,4°C (média 19,9, $\sigma \pm 0,86$). Determinamos, ainda, o Índice de Bellier em algumas amostras de óleo de gergelim, patauá, soja, milho, castanha de caju e semente de uva.

b) Preparamos uma série de misturas de óleo de amendoim com óleo de algodão, de gergelim, de milho e de semente de uva. Nestas misturas, verificamos que o Índice de Bellier depende da quantidade de óleo de amendoim presente. Assim, pode-se dosar, aproximadamente, o teor de óleo de amendoim, pois a cada temperatura de turvação corresponde uma porcentagem de óleo de amendoim.

c) São também apresentados resultados comparativos tomando-se 1 g ou 1 ml da amostra e ainda resultados comparativos da técnica do Instituto Adolpho Lutz, da proposta por LACERDA (1947) e da adotada pelo A. O. A. C..

SUMMARY

The turbidity temperature (Bellier test) was performed for vegetable edible oils and it was also used for the percentual determination of peanut oil in oil mixtures.

Sixty-two samples of peanut oil were analysed (table 1) and the turbidity temperature ranged from 39,7 to 42,5°C (arithmetical average 41,0°C; standard deviation $\pm 0,80$). Seventy-seven samples of olive oil (table 2) presented a turbidity temperature varying from 12,5 to 19,5°C ($m = 16,1$; $\sigma = \pm 1,71$). For 32 samples of cotton-seed oil (table 3) we get a range from 18,6 to 21,4°C ($m = 19,9$; $\sigma = \pm 0,86$). The turbidity temperature was also determined in 18 samples of other vegetable edible oils: sesame, "patauá", soya-bean, corn, cashew-nut and grape-seed (table 4).

Oil mixtures containing peanut oil were made and the turbidity temperature determined in such mixtures (table 5, 6, 7 and 8). The turbidity temperature depends on the amount of peanut oil present. Thus, through this figure, we can determine roughly the amount of peanut oil in oil mixtures.

We also compared the results obtained with three different technics: the "Instituto Adolfo Lutz", the Lacerda of the "Laboratório Bromatológico do Rio de Janeiro" and the "A. O. A. C." processes (table 10).

RÉSUMÉ

L'indice Bellier fut déterminé dans une série d'huiles végétales comestibles et utilisé pour doser l'huile d'arachide mélangée avec d'autres huiles.

a) L'indice Bellier dans les huiles d'arachide analysées varia de 39,7 à 42,5°C (moyenne 41,0 et écart-type $\pm 0,80$); dans les huiles d'olive, la variation fut de 12,5 à 19,5°C (moyenne 16,1 et $\sigma \pm 1,71$); dans les huiles de coton, l'indice varia de 18,6 à 21,4°C (moyenne 19,9, $\sigma \pm 0,86$). Nous avons déterminé, encore, l'indice Bellier en quelques échantillons d'huiles de sésame, "patauí", soja, maïs, "castanha de caju" et pepin de raisin.

b) Nous avons préparé une série de mélanges d'huile d'arachide avec de l'huile de coton, de sésame, de maïs et de pepin de raisin. Dans ces mélanges, nous avons constaté que l'indice Bellier dépend de la quantité d'huile d'arachide présente. Ainsi, nous pouvons doser, à peu près, la teneur d'huile d'arachide, parce qu'à chaque température de trouble correspond un pourcentage d'huile d'arachide.

c) On présente aussi des résultats comparatifs en prenant 1 g et 1 ml d'échantillon et encore des résultats comparatifs de la technique de l'Institut Adolpho Lutz, de la technique proposée par LACERDA (1947) et de celle adoptée par l'A. O. A. C.

BIBLIOGRAFIA

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS — Methods of Analysis. 7. ed. Washington, A.O.A.C., 1950; p. 444.
- EVERS, N. — 1937 — The detection of arachis oil in olive and almond oils. *Analyst* **62**: 96-101.
- FRANZ e ADLER — 1912 — *J. Soc. Chem. Ind.* **30**: 69. Citado em Commercial Organic Analysis 5. ed., Philadelphia, Blakiston, 1924; **2**: 129.
- ISSOGGIO, G. — La Chimica degli Alimenti. Torino, Unione Tipografica, 1927; **2**: 275.
- KIRSTEN, G. — 1949 — Report on peanut oil. *J. Assoc. Off. Agr. Chem.* **32**: 363-366.
- LACERDA, A. — 1947 — A determinação do índice de Bellier. *Rev. Soc. Bras. Quím.* **16**: 153-163.
- MARCILLE, R. — 1939 — L'indice Bellier. *Ann. Chim. Anal.* **21**: 311-321.
- MARTINDALE, W. — The Extra Pharmacopeia. 22. ed., London, Pharmaceutical Press, 1943; **2**: 278.
- NARAYANAIAH, S. — 1945 — The Bellier figure as an analytical constant of vegetable oils and its use in detecting adulteration. *Current Science* **14**: 177-178. Resumo em *Chem. Abstracts* 1946, **40**: 747.
- ROMANO YALOUR, JUAN G. — 1943 — El problema del contralor analítico de las mezclas de aceites comestibles que circulan en el comercio. Contribución a su estudio. Trabalho realizado na Oficina Química de la Dirección General de Higiene de la Provincia de Buenos Aires. Cópia datilografada.
- SERNAGIOTTO DI CASAVECCHIA, E. — La Bromatologia. Torino, Rosenberg & Sellier, 1936.
- SILVEIRA, L. — 1941 — Do índice de Bellier dos óleos comestíveis brasileiros. *Rev. Soc. Bras. Quím.* **10**: 146-152.
- SOCIÉTÉ SUISSE DES CHIMISTES ANALYSTES — Manuel Suisse des Denrées Alimentaires. 4. ed., Berne, Zimmermann, 1939; p. 188.

APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE BENGTSON AO DIAGNÓSTICO DAS RIQUETSIOSES BENIGNAS EM SÃO PAULO

por

PLÍNIO M. RODRIGUES
Do Instituto Adolfo Lutz

e

J. TRAVASSOS
Da Secção de Virus e Riquetsias do Instituto Butantan

No Brasil, o estudo das riquetsioses só veio a despertar o interêsse da classe médica em geral a partir de 1929. Naquele ano, foram observados, em São Paulo, vários casos duma doença tifo-exantemática grave, de elevada mortalidade e com caraterísticos epidemiológicos evidentes de entidade nosológica autóctone.

Os casos de tifo exantemático por vêzes observados, anteriormente àquela data, entre recém-chegados ao país e que ocorriam, geralmente, ou a bordo de navios, ou nos serviços de quarentena de nossos portos de mar, haviam atraído a atenção tão somente dos técnicos incumbidos da inspecção de saúde dos imigrantes.

Muito antes de 1929, porém, casos esporádicos de tifo exantemático já haviam sido assinalados, mesmo entre brasileiros, não só na capital, como nos municípios do interior do Estado de S. Paulo. Dados colhidos nos relatórios de Adolpho Lutz, então diretor do Instituto Bacteriológico de S. Paulo, informam terem ali sido autopsiados 2 casos da enfermidade em 1900, 1 em 1905 e 2 em 1906. Do registro do Hospital do Isolamento da Capital, hoje Hospital Emílio Ribas, constam 7 casos diagnosticados como tifo exantemático e tifo petequial, anteriores a 1929, dos quais 2 ocorridos entre naturais do país. Igualmente, nos registros de óbitos verificados em municípios do interior do Estado, encontram-se referências a vários casos de tifo exantemático, a partir de 1906.

Quase todos êsses casos foram diagnosticados clinicamente, pois só de 1920 em diante o Instituto Bacteriológico começou a proceder à reação de Weil-Felix, o que deu lugar à primeira publicação sôbre o assunto, por parte de ULHÔA CINTRA e PIZA (1920).

O caráter de doença autóctone, revelado pelo estudo epidemiológico dos casos ocorridos desde 1929, levou as diferentes instituições científicas de S. Paulo a encetar pesquisas em tórno do assunto. Não podendo, de início, identificar a doença tifo-exantemática, então endêmica na cidade, a qualquer outro tipo de riquetsiose conhecida, PIZA e colab. (1931) deram-lhe, a título provisório, o nome de "tifo exantemático de S. Paulo". Mais tarde, veio a enfermidade a ser conhecida, na literatura médica anglo-americana, sob a designação de "S. Paulo typhus". Pesquisas ulteriores levadas a efeito em S. Paulo por L. MONTEIRO (1933), FRÓES (1935) e TRAVASSOS (1939) e nos Estados Unidos, por PARKER e DAVIS (1933, 1933a), DYER (1933) e DAVIS e PARKER (1933), porém, identificaram a riquetsia isolada do sangue dos doentes à *Rickettsia (Dermacentroxenus) rickettsi*, agente etiológico da "Rocky Mountain spotted fever", que ocorre na América do Norte. Estudos epidemiológicos intensivamente realizados, tanto na capital como no interior do Estado por VIEIRA e MESQUITA (1934) e PASCALE (1949), estabeleceram o caráter rural ou semi-rural da infecção. Desde logo, algumas espécies de ixódidas do gênero *Amblyomma*, encontradas naturalmente infectadas (SALLES GOMES, 1933 e TRAVASSOS, 1938) foram incriminadas como transmissoras da doença ao homem.

De outro lado, já desde 1939, vinham sendo esporadicamente observados, na cidade de S. Paulo, casos de uma infecção tifo-exantemática, com reação de Weil-Felix positiva a altos títulos e cuja evolução benigna contrastava com a malignidade dos casos provenientes da zona semi-rural.

A história dessa infecção benigna, de caráter essencialmente urbano, excluía, em numerosos casos, qualquer possibilidade de exposição do paciente à picada por ixódidas nas duas semanas que precediam a doença. Tais fatos chamaram a atenção dos técnicos do Serviço de Epidemiologia do Departamento de Saúde do Estado, os quais logo iniciaram estudos mais detalhados sôbre êsses casos. Alguns doentes eram pessoas que tinham contato freqüente com pulgas e ratos, por força de suas atividades em armazéns de cereais, onde os murídeos eram abundantes. Havia, em geral, uma relação entre o índice pulicidiano dos ratos e a ocorrência dêsses casos benignos de tifo-exantemático. Era nas zonas em que êsse índice ultrapassava o valor 7 que apareciam, com mais freqüência, os casos da doença.

Quatro casos foram constatados entre funcionários do Serviço de Controle da Peste, encarregados da captura de ratos na cidade de S. Paulo, assim como da manipulação dêsses roedores no laboratório (comunicação pessoal de SAMPAIO CORREA). No entanto, as tentativas então, 1937, realizadas por um de nós (J. T.) no Instituto Butantan, com o fim de identificar a riquetsia em causa, não foram coroadas de êxito. SALLES GOMES (1941) estudou 3 dêsses casos e os considerou como "casos prováveis de tifo endêmico ou murino".

Já, anteriormente, MONTEIRO e FONSECA (1932) haviam isolado, do cérebro de ratos capturados em uma casa da zona urbana de S. Paulo, várias amostras de riquetsias. Aventaram aquêles autores, então, a hipótese de ocorrer, em S. Paulo, casos humanos de uma outra riquetsiose que não a febre maculosa, a qual seria de origem murina e por cuja transmissão seriam responsáveis os pulicídeos. Serviram de base para essa hipótese argumentos de ordem diversa. De um lado, os resultados das pesquisas levadas a efeito com as amostras isoladas dos ratos, as quais, por seu comportamento experimental na cobaia e mediante provas de imunidade, se distinguiam da *Rickettsia brasiliensis*, designação então adotada para o agente etiológico do "tifo exantemático de S. Paulo"; de outro lado, a observação de ter ocorrido, na mesma casa em que os ratos haviam sido capturados, um caso de doença febril exantemática, de evolução benigna, com reação de Weil-Felix positiva a alto título.

Tendo o Instituto Adolpho Lutz passado a praticar, a partir de 1933, a reação de Weil-Felix, com o material que lhe era remetido para a reação de Widal pelos numerosos Postos e Centros de Saúde da capital e do interior do Estado, foram encontrados vários soros que aglutinavam o *Proteus* OX19, alguns dêles em diluições mais elevadas que 1/1.000. Reações realizadas com soros de diferentes sangrias efetuadas em um mesmo paciente, durante a evolução da enfermidade, mostravam, em vários casos, elevação gradual dos títulos de aglutinação do *Proteus* OX19.

Êsses soros positivos eram de pessoas residentes quer em zonas urbanas da capital ou do interior do Estado, quer em zonas rurais. O inquérito feito pelo Serviço de Epidemiologia do Departamento de Saúde, Diretoria da Capital, mostrou que a maioria dos pacientes residia ou trabalhava em locais ou próximo a locais em que os ratos eram abundantes. Nos inquéritos epidemiológicos, levados a efeito pelos sanitaristas da Diretoria do Interior do mesmo Departamento (PASCALE e CRUZ, 1945 e PASCALE e PRADO, 1945), ficou constatada a ocorrência dêsses casos com Weil-Felix positivo, tanto em zonas urbanas, como rurais, em diversos municípios do interior paulista. Em vários dêsses municípios não haviam, até então, sido assinalados casos graves ou mortais de doença tifo-exantemática.

Ao considerar o diagnóstico específico dêsses casos benignos de enfermidade tifo-exantemática, afigurava-se, de um lado, — para os que haviam ocorrido em zonas urbanas, tanto da capital como do interior do Estado — plausível a hipótese de tifo murino; de outro lado, a hipótese de febre maculosa não poderia explicar todos os casos verificados em zonas rurais, nem mesmo todos os ocorridos em locais onde haviam sido, anteriormente, observadas infecções pela *Rickettsia rickettsi*. Realmente, em plena zona rural, ratos e pulgas são, por vêzes, tão abundantes nos paióis e depósitos de cereais quanto os carrapatos nos campos e macegas.

A reação de Weil-Felix — dada a precocidade do aparecimento das aglutininas anti-*Proteus* no sangue dos pacientes — era o recurso técnico de maior valor de que dispúnhamos para a descoberta das riquetsioses. É sabido, porém, que pode alcançar títulos mais ou menos elevados em outras infecções.

PASCALE e CRUZ (1945), em seu estudo crítico sôbre os resultados da reação de Weil-Felix, praticada com soros provenientes de diversos municípios do interior do Estado de S. Paulo, dizem o seguinte, quanto à reação: "vem, no entanto, se apresentando positiva em um grande número de casos de febre tifóide e em outros tantos de rickettsiose. Mas o inverso também não é incomum, havendo casos de febre tifóide com hemocultura positiva e casos de rickettsioses com inoculação também positiva em que a reação de Weil Felix se mostra negativa com todos os tipos de proteus examinados".

As observações feitas, no município de S. José do Rio Pardo, foram, por aquêles autores, assim resumidos:

1 — Aparecimento de reações de Weil Felix positivas a título baixo, acompanhando ou não reações de Widal também positivas, com hemocultura negativa; sem sintomatologia clínica para rickettsiose e sem letalidade.

2 — Aumento do título do Weil Felix com persistência do Widal positivo com hemocultura ainda negativa; sem sintomatologia clínica e sem letalidade.

3 — Persistência do título alto do Weil Felix, com Widal e hemoculturas negativas; com sintomatologia clínica suspeita e ainda sem letalidade".

A prova de inoculação em cobaia, que poderia prestar grande auxílio para o esclarecimento desses casos, não é, infelizmente, de fácil realização, na prática, dadas as grandes distâncias a percorrer pelo material a analisar, do interior do Estado para o laboratório na Capital.

Foi só a reação da fixação do complemento que nos veio trazer auxílio de valor para o esclarecimento do problema das riquetsioses benignas em S. Paulo. Em 1943, Avendaño, do Instituto Bacteriológico do Chile, visitava o Butantan, trazendo-nos amostra do cocto-antígeno que Palácios e êle haviam preparado, a partir de pulmão de ratos infectados, por via respiratória, com a *Rickettsia mooseri*. Já pela utilização desse antígeno foi possível afastar o diagnóstico de febre maculosa em um grupo de casos benignos de riquetsiose verificados no Estado de S. Paulo.

Pouco tempo após, um de nós (J. T.) teve a oportunidade, nos Estados Unidos, de se pôr a par dos progressos consideráveis realizados naquele país, durante a guerra, no que se refere às técnicas de pesquisa no campo das riquetsioses. Entre essas técnicas, sobressaía, pelo seu valor diagnóstico, a reação de fixação do complemento, intensamente estudada por BENGTON (1941, 1941a, 1944, 1945), BENGTON e TOPPING (1941, 1942) e PLOTZ e colab. (1942, 1943, 1944).

Utilizando antígenos e soros-padrão, gentilmente cedidos pelo Dr. Topping, do National Institute of Health, de Bethesda, pudemos (RODRIGUES e TRAVASSOS, 1948) verificar, em Butantan, que, pela reação de Bengtson, é possível chegar-se ao diagnóstico dos casos de febre maculosa separando-os, nitidamente, dos do grupo "tifo" (incluindo, nessa expressão, o tifo murino e o epidêmico).

Passamos então, a partir de 1945, a praticar a nova reação com uma série de soros que haviam dado Weil-Felix positivo, em exame realizado no Instituto Adolpho Lutz. Conseguimos estabelecer, desde logo, de maneira definitiva, em firme base sorológica, a presença, em S. Paulo, de uma outra riquetsiose, além da febre maculosa, já reconhecida entre nós, como vimos acima, desde 1929.

Redobramos, a seguir, os nossos esforços para esclarecer, definitivamente, qual a espécie de riquetsia responsável por êsses casos de infecção benigna com Weil-Felix positivo — se não de todos, pelo menos de parte ponderável deles. E foi ainda a reação de Bengtson que veio em nosso auxílio, facilitando-nos, consideravelmente, identificar, pela primeira vez, com segurança, no Brasil, uma amostra ("Vollet") de *Rickettsia mooseri* (TRAVASSOS, RODRIGUES e CARREJO, 1948).

Aplainada parte das dificuldades técnicas que, tanto a nós como a outros experimentadores, haviam, durante longo tempo, tornado impossível o esclarecimento de casos similares ao "Vollet", conseguimos diagnosticar a infecção, em uma série de outros pacientes, não só pela fixação do complemento, como pelo isolamento e pela identificação da riquetsia responsável.

O trabalho realizado para o diagnóstico dêsses casos e o estudo dos seus focos de origem, assim como pesquisas correlatas sobre a epidemiologia das riquetsioses benignas em S. Paulo, constituirão o assunto de notas cuja publicação iniciamos com a presente comunicação, onde abordamos apenas o aspecto sorológico do problema.

MATERIAL E TÉCNICA

Dentre os resultados de numerosas reações de fixação do complemento praticadas, desde 1945, no nosso laboratório no Instituto Butantan, selecionamos os dados que nos parecem suficientes para comprovar a existência, em caráter endêmico, em S. Paulo, de uma riquetsiose do grupo "tifo", assim como para exemplificar as dificuldades encontradas na interpretação da reação.

Os resultados adiante analisados foram obtidos em reações praticadas com soros de indivíduos residentes tanto na capital como no interior do Es-

tado de S. Paulo. Em boa parte desses casos, a positividade da reação de Weil-Felix, praticada no Instituto Adolpho Lutz, foi o motivo que determinou a remessa dos soros ao nosso laboratório. Várias amostras de sangue foram obtidas também de 4 casos de infecção acidental de laboratório.

Os restantes soros foram de funcionários de um armazém de cereais da Secretaria da Agricultura, localizado no bairro das Perdizes, na capital de S. Paulo, onde se havia verificado o caso humano ("Vollet") de tifo murino acima referido. Foi sangrada a maioria dos empregados, em número de 75, tendo sido colhida apenas uma amostra de soro de cada um. Os resultados obtidos com a totalidade desses soros serão reproduzidos mais abaixo, sem qualquer seleção.

A reação de fixação do complemento foi realizada em 7 casos, com o antígeno preparado, no Chile, por Palácios e Avendaño, a partir de pulmão de ratos infectados com a *Rickettsia mooseri*. Provocada a pneumonia experimental, eram os pulmões retirados e triturados; feita, a seguir, uma suspensão a 10% em soro fisiológico, era a mesma aquecida em banho-maria em ebulição, durante uma hora. Após centrifugação, o sobrenadante era usado como antígeno. A diluição do antígeno era feita, por ocasião do emprêgo, em soro fisiológico ao qual havia sido adicionado, na proporção de 4%, soro inativado de cobaia normal.

Utilizamos-nos de antígenos Bengtson para praticar a reação com os restantes soros analisados neste trabalho. Além das partidas de antígeno murino, epidêmico e de febre maculosa que recebemos do National Institute of Health, preparamos, no Butantan, antígenos com as seguintes amostras de riquetsias: *Rickettsia (Dermacentroxenus) rickettsi*, amostra "Favorita", por nós isolada de *Amblyomma cajennense*, naturalmente infectado e capturado em uma égua, no foco de febre maculosa de Loreto, Araras, Estado de S. Paulo; *Rickettsia mooseri*, amostra "Wilmington", recebida do "N. I. H." e amostra "Vollet", já mencionada.

Em quase todos os casos, foi praticada, em nosso laboratório, a reação de Weil-Felix, com antígeno alcoólico preparado pela técnica de BRIDGES (1944) a partir de culturas lisas do *Proteus* OX19, previamente selecionadas quanto ao seu poder aglutinante.

RESULTADOS

As nossas primeiras investigações sobre o problema das infecções tifo-exantemáticas benignas foram realizadas com o antígeno de Palácios e Avendaño. Demos preferência a casos ocorridos em plena zona rural do Estado de S. Paulo e que, durante a infecção, haviam apresentado Weil-Felix positivo a título elevado com o *Proteus* OX19 e, às vezes, também com o OX2. Praticamos ainda a reação de fixação do complemento com soros de comunicantes das mesmas zonas, em geral residentes nas mesmas casas em que ocorreram os casos de infecção benigna.

Como testemunhos, foram utilizados o soro de um convalescente de febre maculosa, com diagnóstico confirmado pela prova de inoculação em cobaia, e soros de coelhos e cobaias infectados pela *Rickettsia rickettsi*, assim como soros humanos de tifo murino e tifo epidêmico ocorridos no Chile.

O quadro 1 resume os resultados obtidos.

QUADRO 1

Fixação de complemento com o cocto-antígeno de Palácios e Avendaño.

SOROS	DATA DA SANGRIA (1)	WEIL-FELIX (Antígenos alcoólicos, a não ser indicação em contrário)			Fixação de complemento
		OX 19	OX 2	OX K	
Ro. C. ...	Fim doença	2560	1280	80	—
	12 dias após	1280	640	40	160
	3 ½ meses após	640	80	20	270
R. C. ...	2.ª semana doença	80	1280	160	—
	12 dias após	640	160	20	160
	3 ½ meses após	neg.	20	20	90
S. C. ...	2.ª semana doença	20	80	80	—
	12 dias após	160	20	80	80
	3 ½ meses após	20	20	40	160
A. B.	2 meses após doença	20	20	neg.	—
	10 dias após	40	40	20	810
D. G. ...	Meses após doença	20	160	20	270
S. T. ...	Início doença	1600 (2)	—	—	—
	Convalescença	3200 (2)	—	—	—
	Meses após	neg.	—	80	90
J. O. ...	1 mês após doença	25600 (2)	—	—	—
	1 ½ mês após	neg.	40	160	270
Comunicantes :					
R. C.		neg.	neg.	40	negativo
D. C.		neg.	neg.	80	negativo
A. B. S.		20	neg.	20	negativo
P. S.		20	neg.	20	negativo
J. B. S.		neg.	20	40	30
N. A.		neg.	40	neg.	10
A. S. A.		40	40	20	negativo
J. A.		neg.	neg.	80	negativo
Testemunhos positivos :					
Sêro humano de tifo epidêmico		—	—	—	810
Sêro humano de tifo murino		—	—	—	1600
Testemunhos negativos :					
Caso humano de febre maculosa (convalescente) ..		3500 (2)	—	—	negativo
8 cobaias infectadas (febre maculosa)		—	—	—	negativo
8 coelhos hiperimunes (febre maculosa)		—	—	—	negativo
6 cobaias normais		—	—	—	negativo

Legenda: No quadro acima, em lugar das frações habitualmente utilizadas para indicar o título das reações, empregamos os respectivos denominadores. O título da reação de fixação do complemento é dado pela mais elevada diluição de sêro com a qual foi obtido total (4 cruzeiros) ou quase total (3 cruzeiros) impedimento de hemólise.

1) Para a segunda e terceira amostras de sêro, os tempos são contados, em cada caso, a partir da sangria anterior.

2) Weil-Felix feito no Instituto Adolpho Lutz, com antígeno não alcoólico.

Em 56 dos 135 casos em que praticamos a reação de Bengtson, os pacientes apresentavam, por ocasião da colheita do sangue, ou haviam apresentado, meses ou mesmo anos antes, uma infecção benigna com Weil-Felix positivo. Das 79 pessoas restantes, 75 — sangradas em plena saúde — eram empregados do armazém de cereais onde trabalhava o paciente "Vollet" e 4 haviam contraído tifo murino, acidentalmente, no laboratório. Dêsses 4 casos, 2 evoluíram de maneira acentuadamente grave.

Em alguns dos 56 casos de infecção benigna, a mesma pessoa foi sangrada duas ou mais vezes, tendo, ao todo, sido examinadas 65 amostras de sêro. Dos 56 pacientes, 26 residiam em zona urbana e 22 em zona rural, ignorando-se o domicílio dos restantes.

QUADRO 2
REAÇÃO DE BENGTON

GRUPO A

SÓROS	Tempo entre sangria e início da doença	Anti-geno Murino	Anti-geno Epidêmico	Anti-geno de febre maculosa	Rural ou cidade	
723.....	21 meses	neg.	neg.	20	R	Inoc. cob.: positiva para febre maculosa; W.F.: Neg.; Hem.: Neg.
1044.....	11 meses	neg.	neg.	40	R	Inoc. cob.: Neg.; W.F. (L.): 800; Hem.: Neg.; Wid.: 100

GRUPO B

586.....	3 meses	40		neg.	R	Inoc. cob.: Neg.; W.F. (L.): 3200; Hem.: Neg.; Vid.: Neg.
587.....	1 ½ meses	160		neg.	R	W.F. (L.): 25.600
622.....	16 meses	40	80	neg.	?	W.F. (L.): 3200; Wid.: 200; Hem.: Neg.
691.....	17 dias	neg.	10	neg.	R	W.F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
692.....	13 dias	20	320	neg.	R	W.F.: 160
693.....	11 dias	40	160	neg.	R	Inoc. cob.: Neg.; W.F.: 320
701.....	14 ½ meses	neg.	10	neg.	R	W.F. (L.): 1600; Wid.: Neg.
702.....	22 dias	neg.	320	neg.	R	W.F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Vid.: 200
703.....	12 dias	20	80	neg.	C	W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
718 1.ª amostra ...	18 dias	40	320	neg.	C	W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: 400
718 2.ª amostra ...	43 dias	20	10	neg.	C	W. F.: Neg.
719 1.ª amostra ...	24 dias	neg.	320	neg.	R	W. F. (L.): 1600; Wid.: 100
719 2.ª amostra ...	3 ½ meses	neg.	10	neg.	R	W. F.: Neg.
720 1.ª amostra ...	12 dias	20	10	neg.	C	W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
720 2.ª amostra ...	100 dias	10	10	neg.	C	W. F.: Neg.
722 1.ª amostra*...	5 meses	20	10	neg.	R	Inoc. cob.: Neg.; W. F. (L.): 1600; Wid.: 400
725 1.ª amostra ...	180 dias	80	40	neg.	R	W. F. (L.): 800; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
725 2.ª amostra ...	180 dias	20	20	neg.	R	
727 1.ª amostra ...	4 meses	neg.	160	5	R	Inoc. cob.: Neg.; W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
727 2.ª amostra ...	6 meses	neg.	40	neg.	R	
731.....	20 dias	neg.	10	neg.	R	W. F. (L.): 3200; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.

QUADRO 2 (continuação)

SÓROS	Tempo entre sangria e início da doença	Antígeno Murino	Antígeno Epidêmico	Antígeno de febre maculosa	Rural ou cidade	
763.....	20 dias	neg.	320	neg.	C	Inoc. cob.: Neg.; W.F. (L.): 12800
767.....	1 mês	10	40	neg.	R	W. F. (L.): 3200; Hem.: Neg.
871.....	1 ½ meses	5	40	neg.	C	W. F. (L.): 1600; Wid.: Neg.
881.....	8 anos	5	5	neg.	C	Inoc. cob.: Neg.; W. F. (L.): 6400
2401.....	1 ½ meses	20**	10**	neg.	C	W. F. (L.): 400; Hem.: Neg.; Wid.: 200
2402.....	14 dias	20**	80**	neg.	C	W. F. (L.): 12800; Hem.: Neg.; Wid.: 100
2403.....	7 dias	40**	80**	neg.	C	W. F. (L.): 6400; Hem.: Neg.; Wid.: 100
2426.....	3 meses	40	10	neg.	C	W. F. (L.): Neg.
2621.....	1 ½ meses	320	20	neg.	R	W. F. (L.): 6400; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
2711.....	?	40	10		?	W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
2735.....	?	40	10		?	W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
2763.....	?	80	20**		?	W. F.: 2560

GRUPO C

721.....	8 ½ meses	10	40	20	R	W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
----------	-----------	----	----	----	---	--

GRUPO D

722 2. ^a amostra*...	7 meses	neg.	neg.	neg.	R	W. F.: Neg.
1804.....	20 dias	neg.	neg.	neg.	C	W. F.: 1280; Wid.: 100
1805.....	doença	neg.	neg.	neg.	R	W. F.: 640
1852.....	14 dias	neg.	neg.	neg.	C	W. F. (L.): 1600; Hem.: Neg.; Wid.: Neg.
2797.....	?	neg.	neg.		?	W. F.: 2560; Hem.: Neg.; Wid.: 400

Legenda : No quadro acima, em lugar das frações habitualmente utilizadas para indicar as diluições de soro, empregamos os respectivos denominadores. Salvo indicação em contrário, o título da reação aí consignado foi dado pela mais elevada diluição de soro com a qual foi obtido total (4 cruzeiros) ou quase total (3 cruzeiros) impedimento de hemólise.

Nesse quadro, foram ainda incluídas, como positivas, reações nas quais foi obtido impedimento parcial (2 cruzeiros) com mais de uma diluição (e às vezes até com diluição bastante elevada) de soro, sem que, no entanto, em tubo algum o impedimento tenha alcançado 3 cruzeiros.

Inoc. cob. = Prova de inoculação em cobaia para isolamento de riquetsias.

W. F. = Reação de Weil-Felix, praticada no "Instituto Butantan", com antígenos alcoólicos.

W. F. (L.) = Reação de Weil-Felix, praticada no "Instituto Adolpho Lutz", com antígenos vivos.

Hem. = Hemocultura (em meios especiais para germes do grupo tifo-paratífico).

Wid. = Reação de Widal.

* Foram examinadas 2 amostras do soro n.º 722: uma está incluída no grupo b e a outra no grupo d.

** Fixação parcial (2 cruzeiros) desde a diluição a 1/10 até a indicada no quadro.

De acôrdo com os resultados obtidos no quadro 2, podemos dividir essas 65 amostras de sôro em 4 grupos :

a) positivos, com o antígeno de febre maculosa e negativos, com os antígenos do grupo "tifo" (murino e epidêmico) : 2 (soros 723 e 1.044).

b) positivos, com um dos dois ou com ambos os antígenos do grupo "tifo" e negativos com o antígeno de febre maculosa (ou então positivos com êste último, a título consideravelmente inferior ao obtido com um dos antígenos do grupo "tifo"): a grande maioria das amostras de soros incluídos neste trabalho, em número de 57.

c) positivos, com os 3 antígenos : 1 (sôro 721).

d) negativos com os antígenos do grupo "tifo" ou com todos os 3 antígenos utilizados: 5 (segunda amostra do sôro 722, soros 1.804, 1.805, 1.852 e 2.797). Com êste último sôro não foi empregado o antígeno de febre maculosa.

Foi feita uma primeira série de reações, com todos os 75 soros colhidos no foco "Vollet", diluídos a 1/5, tendo sido utilizado um dos antígenos do grupo "tifo" (o antígeno epidêmico). As reações positivas ou duvidosas, em número total de 5, foram repetidas, usando-se diluições progressivas de sôro a partir de 1/10, com ambos os antígenos do grupo "tifo" : o murino e o epidêmico. A reação foi negativa a 1/10, em presença dos 2 antígenos, com 72 dos 75 soros examinados. Os resultados obtidos com os 3 soros restantes estão consignados no quadro 3.

QUADRO 3

Reação de Bengtson com o sôro de 75 funcionários do armazém da rua Guaiacurus (São Paulo), onde trabalhava o paciente (Vollet) do qual foi isolada a 1.ª amostra de *Rickettsia mooseri*.

		Denominador da Diluição do sôro :				
		10	20	40	80	160
Sôro 1653	Antígeno { Murino	4	3	0	0	0
	{ Epidêmico	2	0	0	0	0
	{ Testem.	0	0	0	0	0
Sôro 1700	Antígeno { Murino	4	4	3	±	0
	{ Epidêmico	4	2	0	0	0
	{ Testem.	0	0	0	0	0
Sôro 1709	Antígeno { Murino	4	4	2	±	0
	{ Epidêmico	3	1	±	0	0
	{ Testem.	0	0	0	0	0

Os restantes soros, em número de 72, foram negativos na diluição de 1/10, com ambos os antígenos.

Legenda : Os resultados acima estão expressos, como habitualmente, em número de cruces, indicando graus de impedimento de hemólise.

Praticado o Weil-Felix com os 75 soros, encontrou-se apenas um que, na diluição de 1/100, aglutinava o *Proteus* OX19. Trata-se do caso 1709, um dos 3 em que a reação de Bengtson foi positiva.

Os resultados das reações praticadas com várias amostras de sangue de cada um dos 4 casos de infecção acidental de laboratório constam do quadro 4.

QUADRO 4

REAÇÃO DE BENGTON

Casos em que foram examinadas mais de uma amostra de sangue do mesmo paciente.

SÓROS	Tempo entre sangria e início da doença	Anti-geno Murino	Anti-geno Epidêmico	Anti-geno de febre maculosa	Rural ou cidade		
718 1.ª amostra ...	18 dias	40	320	Neg.	C	W. F. (L.): 1600; Wid.: 400; Hem.: Neg.	
718 2.ª amostra ...	60 dias	20	10	Neg.	C		
719 1.ª amostra ...	24 dias	40	320	neg.	R	W. F. (L.): 1600; Wid.: 100; Hem.: Neg.	
719 2.ª amostra ...	3 ½ meses	20	10	neg.	R		
720 1.ª amostra ...	12 dias	20	160	neg.	C	W. F. (L.): 1600; Wid.: Neg.; Hem.: Neg.	
720 2.ª amostra ...	100 dias	10	10	neg.	C		
722 1.ª amostra ...	5 meses	20	10	neg.	R	W. F. (L.): 1600; Wid.: Neg.; Hem.: Neg.	
722 2.ª amostra ...	7 meses	neg.	neg.	neg.	R		
725 1.ª amostra ...	130 dias	80	40	neg.	R	W. F. (L.): 800; Wid.: 400; Hem.: Neg.	
725 2.ª amostra ...	190 dias	20	20	neg.	R		
727 1.ª amostra ...	4 meses	neg.	160	5	R	W. F. (L.): 1600; Wid.: Neg.; Hem.: Neg.	
727 2.ª amostra ...	6 meses	neg.	40	neg.	R		
1081	1.ª amostra..	14 dias	10	320	10		
	2.ª amostra..	83 dias	160	40	neg.	C	
	3.ª amostra..	139 dias	40	10	neg.		
2281	1.ª amostra..	10 dias	20	40	neg.	C	W. F.: 640
	2.ª amostra..	17 dias	80	40	neg.		
3000*	1.ª amostra..		10	10	neg.		W.F. { Durante a doença: 320 1 mês após: 160
	2.ª amostra..		10	80	20		
	3.ª amostra..		160	320		C	
	4.ª amostra..	33 meses	40	20			
3001*	1.ª amostra..		neg.	neg.			W.F. { Durante a doença { 1.º Neg. 2.º Neg. 3.º 80 1 mês após: 40
	2.ª amostra..		neg.	neg.			
	3.ª amostra..		neg.	neg.	neg.	C	
	4.ª amostra..		1280	640	neg.		
	5.ª amostra..		320(1)	320(1)			

QUADRO 4 (Continuação)

SÓROS	Tempo entre sangria e início da doença	Antígeno Murino	Antígeno Epidêmico	Antígeno de febre maculosa	Rural ou cidade		
3002*	1.ª amostra..	neg.	neg.	neg.		W.F. { durante a doença: 80	
	2.ª amostra..	80	40		C		
	3.ª amostra..	80	40		C		1 mês após: 40
3003*	1.ª amostra..	neg.	neg.			W.F. { Durante a { 1.ª 40 doença { 2.ª 20	
	2.ª amostra..	neg.	neg.				
	3.ª amostra..	neg.	neg.		C		
	4.ª amostra..	neg.	neg.	neg.			
	5.ª amostra..	160	40				1 mês após: Neg.

* De todos os casos (3000 a 3003) de infecção acidental foi isolada a *Rickettsia mooseri*.

Legenda: Em lugar das frações habitualmente utilizadas para indicar o título das reações, empregamos os respectivos denominadores. O título foi dado pela mais elevada diluição de soro com a qual foi obtido total (4 cruzeiros) ou quase total (3 cruzeiros) impedimento de hemólise.

COMENTÁRIO

O intuito de relatar, de maneira tão completa quanto possível, as nossas pesquisas sobre o problema das riquetsioses do grupo "tifo" em S. Paulo levou-nos a comunicar, neste trabalho, os resultados das reações de fixação do complemento com o cocto-antígeno de Palácios e Avendaño, apesar do caráter preliminar das investigações realizadas.

Na ocasião (janeiro de 1944), conseguimos obter apenas um número reduzido de soros de casos de infecção benigna suspeita de riquetsiose e, por outro lado, não pudemos dispor de antígenos outros — de tifo epidêmico e de febre maculosa — necessários para o completo controle da reação.

A infecção, nesses casos, caracterizava-se por febre, de 2 a 3 semanas de duração, com acentuada cefaléia inicial, dores musculares e exantema. Até a data da colheita dos soros, não se conhecia nenhum caso mortal da enfermidade. Segundo informações colhidas "in loco", nos anos anteriores, haviam sido verificados casos de doença similar nos arredores. Carrapatos, assim como ratos e pulgas, eram encontrados, com freqüência, nas proximidades do domicílio dos pacientes.

O caráter rural da infecção e os títulos elevados do Weil-Felix por vezes observados com o *Proteus* OX2 pareciam falar a favor da hipótese de febre maculosa benigna. Até a data, no entanto, não haviam sido observados casos graves, típicos, de febre maculosa, nas zonas de onde provinham os soros.

O exame dos resultados consignados no quadro I levou-nos a excluir, para os casos de infecção benigna clinicamente suspeita de doença tifo-exantemática (soros Ro. C., R. C., S. C., A. B., D. G., S. F. e J. O.), o diagnóstico de febre maculosa e a considerar, como provável, a hipótese de riquetsiose do grupo "tifo". Vê-se, realmente, que os soros desses casos fixaram

o complemento em presença do cocto-antígeno de Palácios e Avendaño, alcançando altos títulos, tal como os soros chilenos, enquanto que os soros típicos de febre maculosa foram negativos.

Dos soros de comunicantes examinados, dois fixaram o complemento. Num desses casos, o título da reação atingiu 1/30, tendo o paciente declarado haver tido "tifo" 8 meses antes da colheita do sangue. Da história pregressa do outro — no qual a reação foi positiva a 1/10 — não constava referência a doença febril alguma. Por outro lado, entre os comunicantes para os quais foi negativa a reação de fixação do complemento, um deles (A. S. G.) havia tido, algum tempo antes da sangria, doença febril prolongada, durante a qual foram, por duas vezes, praticados exames de laboratório. O Weil-Felix foi positivo a 1/1.600, com ambas as amostras de sôro, enquanto que a reação de Widal passou de negativa, com a primeira, a positiva a 1/400, com a segunda. Parece, assim, mais provável tratar-se de um caso de febre tifóide, pois, como é sabido, a elevação, durante a doença, do título, quer do Widal quer do Weil-Felix, possui, em regra, maior valor diagnóstico do que um resultado positivo único, por mais alto que seja o título. Haja vista o ocorrido com os dois casos citados por PASCALE e CRUZ (1945), nos quais, apesar de não haver dúvida sobre o diagnóstico de febre tifóide, confirmado por hemocultura positiva, o Weil-Felix atingiu o título de 1/800.

Na ocasião, a falta de antígeno de febre maculosa necessário para o completo controle da reação impediu que os resultados acima, conquanto significativos, fossem considerados como prova definitiva da existência entre nós de uma riquetsiose do grupo "tifo".

Em trabalho anterior, constatamos a especificidade da reação de Bengtson no que diz respeito ao diagnóstico da "Rocky Mountain spotted fever" e às riquetsioses do grupo "tifo". Vê-se, assim, pelo exame do quadro 2, que esse recurso técnico, de emprêgo recente mas já generalizado no estudo das doenças tifo-exantemáticas, possibilitou firmar o diagnóstico de febre maculosa para 2, dentre os 58 casos de infecção benigna examinados neste trabalho. Ambos foram verificados em zona rural, havendo, tanto um como o outro, apresentado reação de Weil-Felix positiva. O diagnóstico sorológico foi confirmado, em um dos pacientes, pela prova de inoculação em cobaia. Residiam ambos em área onde haviam sido, anteriormente, constatados casos de febre maculosa.

De maior significação se revestem, no entanto, os resultados obtidos com os soros do grupo "b". Com efeito, ainda que não permitisse o diagnóstico específico da riquetsia em causa, a reação de Bengtson veio trazer, pela primeira vez, em um número ponderável de casos (51), a certeza de existir, entre nós, em forma endêmica, além da febre maculosa, uma outra doença tifo-exantemática.

Já de há muito, como vimos na introdução deste trabalho, vinha sendo suspeitado que o *Dermacentor rickettsi* não poderia ser incriminado como o agente etiológico em todos os casos de riquetsiose observados no Estado de S. Paulo, desde 1929. Os argumentos apresentados para justificar essa suspeita tinham base, quer na clínica, quer na epidemiologia dos casos observados, quer ainda em trabalhos experimentais realizados com o sangue dos doentes. Faltava, no entanto, um recurso técnico de valor diag-

nóstico mais seguro, para se poder concluir, com segurança, que ocorresse mais de uma riquetsiose entre nós. Se as razões de ordem epidemiológica impressionavam, na clínica tornava-se sobremaneira difícil, senão impossível, distinguir, dentre os chamados casos de "tifo exantemático benigno", os que seriam casos benignos de uma doença geralmente (?) grave e de evolução mortal, a febre maculosa.

Prosseguindo no exame dos casos acima discriminados, vemos que um único sôro (721) reagiu com os 3 antígenos a títulos que não permitem firmar o diagnóstico específico. O Weil-Felix, praticado com essa amostra de sôro, havia sido positivo a 1/1.600.

Finalmente, dos 58 casos aqui examinados, 4 foram negativos com todos os antígenos. A segunda amostra de sôro do caso 722, também negativa com os 3 antígenos, foi obtida de doente residente em zona rural, o qual, como se vê pelo exame do quadro 2, apresentara fixação do complemento positiva com material retirado 2 meses antes. Uma primeira reação de Weil-Felix havia sido positiva a 1/800 e uma segunda, com 3 dias de intervalo, a 1/1.600. A prova de inoculação do seu sangue em cobaia havia sido negativa. Dado o baixo título da primeira reação, explica-se, facilmente, terem os anticorpos fixadores desaparecido do sangue do paciente no espaço de 3 meses.

No paciente 1.804, temos, possivelmente, um exemplo de tardia reação à infecção pela produção de anticorpos fixadores. Considerada negativa a reação para efeito de registro, não deixou, contudo, de haver muito ligeira inibição de hemólise nos três primeiros tubos correspondentes às diluições de 1/10, 1/20, e 1/40 do sôro.

Os restantes casos negativos (1.805, 1.852 e 2.797) com os 3 antígenos haviam, como quase todos os casos aqui examinados, apresentado uma reação de Weil-Felix positiva. Os títulos obtidos foram, respectivamente, 1/640, 1/1.600 e 1/2.560. A prova de inoculação do sangue do paciente em cobaia foi praticada apenas no caso 1.852, tendo sido negativa.

Sabendo-se que a reação de Weil-Felix pode ser positiva em outras infecções, há a possibilidade, para êsses 3 casos, de um outro diagnóstico que não o de doença tifo-exantemática. Outra hipótese, porém, pelo menos para os soros 1.805 e 1.852, se não também para o sôro 2.797 (pois que se ignora o período em que êste último foi obtido) é o diagnóstico de riquetsiose na qual teria sido tardia ou nula a produção de anticorpos fixadores específicos.

O valor da reação de Bengtson para o diagnóstico retrospectivo das riquetsioses do grupo "tifo" ficou bem evidenciado pelos resultados obtidos com os soros dos funcionários do armazém de cereais da Secretaria da Agricultura, situado no bairro das Perdizes, na capital de S. Paulo.

Em trabalho anterior, já examinamos o considerável auxílio que a fixação do complemento nos trouxe para a descoberta desse foco de tifo murino, permitindo não só firmar o diagnóstico de riquetsiose do grupo "tifo" para o caso "Vollet", como ainda orientar e controlar as pesquisas que nos levaram a identificar, de maneira segura, a *Rickettsia mooseri*. Além da amostra obtida do caso humano, foram isoladas, de ratos e pulgas que infestavam o armazém, várias outras amostras, as quais serão estudadas em trabalho ulterior desta série.

O exame do sôro dos companheiros de trabalho do paciente "Vollet" completa o estudo do foco. Mostram os resultados que a reação de Bengtson permite a descoberta de focos, ou de casos isolados de tifo murino, mesmo após a cura da infecção. Como se vê pelo quadro 3, a reação foi positiva com o sôro de 3 das 75 pessoas sangradas. Dada a benignidade usual da doença, nenhum dos 3 conseguiu precisar quanto tempo havia decorrido entre o início da infecção e a colheita de sangue.

Os resultados obtidos em numerosos casos, dentre os 51 que apresentavam uma história de infecção benigna com Weil-Felix positivo, permitem, no entanto, afirmar que o diagnóstico retrospectivo de riquetsiose do grupo "tifo", mediante a reação de Bengtson, poderá ser feito meses e mesmo anos após a infecção (reação positiva a 1/40 cêrca de 3 anos após a doença nos casos 3.000 e 3.001, de infecção acidental de laboratório).

Visto o auxílio que a reação de Bengtson nos trouxe no que diz respeito ao diagnóstico de febre maculosa, de um lado, e de riquetsiose do grupo "tifo" de outro, abordaremos agora a questão do diagnóstico da espécie da riquetsia responsável pelos casos dêste último grupo.

Só pela purificação dos antígenos pela técnica de Plotz é que se conseguiria, em boa parte dos casos do grupo "tifo", estabelecer o diagnóstico de espécie da riquetsia em causa. Com os antígenos Bengtson, dada a intensa reação cruzada observada, habitualmente, entre o tifo murino e o epidêmico, não é possível, na maioria dos casos, obter o diagnóstico diferencial entre essas duas infecções.

Ainda mais, como vimos em trabalho anterior e veremos, novamente, linhas adiante, há casos em que o sôro do paciente de tifo murino reage inicialmente com o antígeno heterólogo (o epidêmico) a título mais alto do que com o homólogo. Torna-se evidente a impossibilidade de se chegar a um diagnóstico específico com os antígenos de Bengtson, pelo menos quando se examina só uma amostra de sôro.

Eliminando, por lavagens e centrifugações sucessivas, grande parte do componente antigênico solúvel, comum à *Rickettsia mooseri*, Plotz consegue obter antígenos que seriam dotados de maior especificidade.

Tentaremos, no entanto, por meio de uma análise mais detalhada dos resultados obtidos com a reação de Bengtson, chegar a um diagnóstico específico de probabilidade, pelo menos nos casos em que foram praticadas mais de uma sangria.

Em 12 casos, dos quais 4 de infecção acidental de laboratório, foram examinadas 2 ou mais amostras de sôro do mesmo paciente. No quadro 4, reproduzimos, com detalhes, os resultados dêsses exames.

Dêsses 12 casos, o de n.º 1.081 é especialmente ilustrativo da intensa reação cruzada observada entre o tifo murino e o epidêmico. Já tendo pormenorizadamente discutido, em trabalho anterior, as particularidades sorológicas dêsse caso, limitar-nos-emos a chamar a atenção para o fato de que só tardiamente, após a cura da doença, o título da fixação com o antígeno homólogo (murino) se elevou, acentuadamente, ultrapassando o da fixação heteróloga, que havia então declinado.

Já PLOTZ e colab. (1948) e SCOVILLE e colab. (1948) assinalaram que o anticorpo específico contra cada uma das riquetsias, murina e epidêmica,

é de aparecimento mais tardio no sangue do que o anticorpo correspondente ao antígeno comum a ambas. Segue-se, daí, o auxílio que o exame dos resultados das reações praticadas em série pode trazer para o esclarecimento da etiologia específica de alguns casos de riquetsiose benigna. A se aceitar, como de valor diagnóstico, a elevação progressiva do título da fixação com o antígeno murino, vemos que, no caso "Vollet", poderíamos chegar, só pela reação de Bengtson, a reconhecer, conquanto tardia, retrospectivamente, a espécie da infecção em causa. Nesse caso, aliás, como dissemos, foi possível chegar a um diagnóstico de certeza pelo isolamento da riquetsia responsável.

O caso 2.281 é outro exemplo em que a alteração do nível do anticorpo murino se processou nitidamente no mesmo sentido que no caso "Vollet". Parece razoável aceitar-se, também para esse caso, com base apenas na reação de Bengtson, o diagnóstico provável de tifo murino. Infelizmente, não pudemos dispor de uma terceira amostra de soro desse paciente, para constatar se a modificação havida, no intervalo de 7 dias, durante a doença, continuou a se realizar no mesmo sentido, durante a convalescença e após a cura.

O caso 718 mostra, igualmente, ter-se invertido, na amostra de soro obtida 60 dias após o início da infecção, a predominância alcançada, na amostra colhida aos 18 dias de doença, pelo nível do anticorpo epidêmico sobre o do anticorpo murino. Nesta segunda amostra, no entanto, já por demais tardia, ambos os títulos haviam caído consideravelmente, não podendo ser constatada, pela falta de soro de períodos intermediários, se houve ou não, em certa fase da doença ou da convalescença, uma elevação gradual do título da fixação com o anticorpo murino. O comportamento sorológico desse caso, tal como revela a análise das 2 amostras de soro obtidas, poderia enquadrá-lo tanto entre os casos de tifo murino, como entre os de tifo epidêmico.

Nos casos restantes de infecção natural, 719, 720, 722, 725 e 727, as sangrias foram feitas em períodos tardios demais para permitir sequer uma conjectura sobre a sua etiologia específica. Chama a atenção, no entanto, num deles, 727, o fato da persistência dos anticorpos epidêmicos em níveis apreciáveis nas amostras de soro, colhidas 4 a 6 meses após o início da infecção, quando não foi verificada a presença de anticorpos murinos, senão em nível insignificante.

De cada um dos 4 casos de infecção acidental de laboratório, foi isolada uma amostra de *Rickettsia mooseri*, perfeitamente identificada pelo seu comportamento experimental e por provas de imunidade.

Entre esses casos, há pelo menos um, o de n.º 3.000, com o qual obtivemos resultados que não se explicam pelos conhecimentos atuais sobre a reação de fixação do complemento. Constata-se, com efeito, nesse caso, a predominância mantida, durante perto de 2 meses após a infecção, pelo nível do anticorpo epidêmico sobre o do murino.

Nem mesmo com o emprego de antígenos purificados pôde ser feito o diagnóstico específico da riquetsiose em causa pela fixação do complemento. A reação praticada com os antígenos de Plotz no Laboratório de Virus e Riquetsias da Army Medical School, em Washington, alcançou título mais alto para o tifo epidêmico do que para o murino. O título da aglutinação

realizada no mesmo laboratório foi, no entanto, significativamente mais alto com a riquetsia murina do que com a epidêmica.

É sabido que a vacinação prévia com um dos antígenos, murino ou epidêmico, vem trazer nova dificuldade à interpretação, pela reação de fixação do complemento, dos casos de riquetsiose do grupo *typhus*.

No caso n.º 3.000, no entanto, havia apenas história prévia de vacinação com uma dose única de vacina Spencer-Parker contra a "Rocky Mountain spotted fever". Encontrar-se-ia, aí, a explicação do comportamento sorológico anômalo, ou estaria este em relação com a gravidade inteiramente excepcional da infecção? Caso também muito grave foi o de n.º 3.001, no qual se verificou, igualmente, a impossibilidade de um diagnóstico específico pela reação de Bengtson. Também desse paciente foi isolada e, a seguir, identificada a *Rickettsia mooseri*. Os 2 outros casos de tifo murino acidental foram bem menos graves que os anteriormente citados. Nêles se constata a predominância dos títulos do anticorpo homólogo nas várias amostras de sangue. Ora, êstes 3 últimos casos eram de indivíduos que, há anos, vinham sendo, repetidamente, vacinados contra a febre maculosa. Não parece provável, pois, que o comportamento sorológico anômalo do caso n.º 3.000 seja conseqüência da inoculação da vacina Spencer-Parker.

RESUMO

Em comunicação anterior, os autores trataram de um caso humano de tifo exantemático murino observado na capital de S. Paulo. O diagnóstico do caso foi feito pelo isolamento e pela identificação de uma amostra de *Rickettsia mooseri*. Já, anteriormente, haviam sido observados, no Estado de S. Paulo, casos benignos de doença tifo-exantemática semelhantes ao estudado pelos autores. Durante anos, porém, não se conseguiu estabelecer o diagnóstico específico desses casos, os quais, com os casos graves de riquetsiose, eram englobados sob a designação de "tifo exantemático de S. Paulo". Mais tarde, receberam muitos desses casos benignos o diagnóstico de tifo murino, feito apenas com base em dados clínicos e epidemiológicos.

No presente trabalho, os autores prosseguem no relato das pesquisas feitas para esclarecer a etiologia de tais casos. A reação de fixação do complemento foi praticada com um certo número de soros com Weil-Felix positivo. Uma grande parte das amostras de sangue foi obtida de indivíduos que sofriam, ou haviam sofrido, uma infecção benigna e que residiam em zonas quer rurais quer urbanas do Estado de S. Paulo.

Na parte preliminar do trabalho, realizada em janeiro de 1944, foi utilizado um antígeno, preparado no Instituto Bacteriológico do Chile, por Palácios e Avendaño, com a *Rickettsia mooseri*. A partir de novembro de 1945, foram empregados antígenos Bengtson, preparados com a riquetsia da febre maculosa das Montanhas Rochosas e com as do tifo murino e tifo epidêmico.

Em 1944, foi praticada a prova, em presença do cocto-antígeno, com o sôro de 7 casos verificados em zona rural do Estado de S. Paulo. Naquela ocasião, a falta de antígeno para o diagnóstico da febre maculosa tornou impossível o contrôle perfeito da reação. Não se pôde, assim, concluir, com

certeza, pela existência em S. Paulo de uma doença exantemática do grupo "tifo" (tifo murino e tifo epidêmico). Contudo, os resultados falavam fortemente a favor da hipótese de ocorrer, em S. Paulo, mais de um tipo de infecção tifo-exantemática.

Cêrca de 2 anos mais tarde, as reações realizadas com antígenos Bengtson vieram trazer a prova definitiva de que uma parte dos assim chamados casos de "tifo exantemático de S. Paulo" ou de "febre maculosa" eram realmente casos de uma infecção exantemática do grupo "tifo".

De todos os casos clínicos, nos quais foi praticada a reação com os antígenos Bengtson, 58 foram selecionados para serem discutidos nesta comunicação. Em dois dêles, conseguiu-se firmar, pela fixação de complemento, o diagnóstico de febre maculosa das Montanhas Rochosas. Em 51 casos, a reação foi positiva, quer com o antígeno murino, quer com o epidêmico. Em muitos dêsses 51 casos, não houve uma diferença significativa entre os títulos observados com o antígeno murino e com o epidêmico; o título foi, ora mais alto com o murino, ora com o epidêmico.

Devido à intensa reação de fixação cruzada, verificada entre o tifo murino e o epidêmico, só foi possível chegar-se, pela primeira vez, a um diagnóstico seguro de tifo murino pela identificação de uma amostra de *Rickettsia mooseri*, isolada do caso humano ("Vollet") acima referido. Em uma nota a ser publicada, relataremos o isolamento da *Rickettsia mooseri* de mais 10 casos humanos de tifo murino, alguns dêles provenientes de zona rural.

Foi praticada ainda a reação de fixação do complemento com o sôro de 75 empregados de um armazém de cereais, onde trabalhava o paciente "Vollet", tendo sido utilizados os antígenos Bengtson. Em 3 dêsses casos, a reação foi positiva com o antígeno murino ou o epidêmico. Nenhuma dessas 3 pessoas havia apresentado sintomas de infecção nos 30 dias anteriores à sangria.

A reação foi também aplicada ao diagnóstico de 4 casos de infecção acidental de laboratório. Verificaram-se todos os 4 entre o pessoal técnico do Laboratório de Riquétsias do Instituto Butantan, onde o trabalho relatado nesta comunicação foi realizado. A reação foi positiva nos 4 casos com os antígenos Bengtson, murino e epidêmico. Posteriormente, foi isolada, de cada caso, uma amostra de *Rickettsia mooseri*.

Em um dêsses casos, nem pelo emprêgo dos antígenos de Plotz foi possível chegar-se ao diagnóstico diferencial entre tifo murino e epidêmico. O título da reação realizada na Army Medical School, em Washington, com uma amostra de sangue colhida 4 meses após a infecção, foi mais alto com o antígeno murino do que com o epidêmico. Mas o título de aglutinação de riquétsias foi significativamente mais alto com a *Rickettsia mooseri* do que com a *Rickettsia prowazeki*.

SUMMARY

In a previous paper, the authors reported a human case of murine typhus that occurred in the city of S. Paulo, Brazil. The diagnosis of the case was made by the isolation and identification of a strain of *Rickettsia mooseri*. For a time, similar mild cases of infection observed in the State of S. Paulo

had not been distinguished from cases of the so-called S. Paulo typhus. They were later diagnosed as cases of murine typhus although only on clinical grounds.

In this paper, further work done to clear up the etiology of such cases is reported. Complement fixation tests with rickettsial antigens were carried out with a number of positive Weil-Felix sera. Many of the blood samples were taken during or after the course of a mild infection from people living in either urban or rural areas of the State of S. Paulo.

At first a cocto-antigen was used, which was prepared from a strain of *Rickettsia mooseri* isolated in Santiago, Chile. Later, Bengtson antigens were employed, which were prepared either with Rocky Mountain spotted fever, murine or epidemic typhus rickettsiae.

In 1944, sera from 7 cases reported in a rural area of S. Paulo State were tested with the cocto-antigen. At that time, the lack of a Rocky Mountain spotted fever antigen made it impossible to prove conclusively the occurrence of cases of an exanthematic disease of the typhus group in the State of S. Paulo. Two years later, complement fixation tests performed with Bengtson antigens provided definite evidence that part of the so-called "S. Paulo typhus" actually were cases of an infection of the typhus group.

Of the clinical cases tested with Bengtson antigens for complement fixing antibodies, 58 were selected for discussion in this paper. They were all mild cases with a positive Weil-Felix reaction. In two of them, a serologic diagnosis of R. M. s. f. was established. A positive test with either the murine or the epidemic antigen was obtained in 51 cases. In many of them there was not a significant difference between the murine and the epidemic antibody titers. Sometimes the titer was higher with the murine, at others with the epidemic antigen.

From one of those 51 cases, a strain of *Rickettsia mooseri* was isolated and identified. Sera of 75 employees of the grain store where this patient worked were tested with Bengtson antigens. A positive test with the murine antigen was obtained in three of these people. None of them had shown any sign of infection for a period of at least a month previous to the bleeding for the test.

The test was also used for the diagnosis of 4 cases of laboratory infection. All 4 were accidentally infected in the Rickettsial Diseases Laboratory of the Instituto Butantan, where the work reported in this paper was done. Complement fixing antibodies against the rickettsiae of the typhus group were found in the serum of all cases when tested with Bengtson antigens. Later, a strain of *Rickettsia mooseri* was isolated from each case and identified.

In one of these accidental cases, not even using Plotz antigens could a specific serologic diagnosis be made. A blood sample taken 4 months after the infection from this case was tested for complement fixing antibodies at the Army Medical Center, Washington, D. C., U. S. A. The titer was slightly higher with the epidemic than with the endemic antigen. However, the agglutination titer with the murine was significantly higher than with the epidemic rickettsiae.

BIBLIOGRAFIA

- BENGTSON, I. A. — 1941 — Complement fixation in "Q" fever. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **46** : 665-668.
- BENGTSON, I. A. — 1941a — Complement fixation in endemic typhus fever. *Pub. Health Rep.* **56** : 649-653.
- BENGTSON, I. A. — 1944 — Complement fixation in the rickettsial diseases. Technique of the test. *Pub. Health Rep.* **59** : 402-405.
- BENGTSON, I. A. — 1945 — Applications of the complement-fixation test in the study of rickettsial diseases. *Am. J. Pub. Health* **35** : 701-707.
- BENGTSON, I. A. e N. H. TOPPING — 1941 — The specificity of the complement fixation test in endemic typhus fever using a rickettsial antigen. *Pub. Health Rep.* **56** : 1723-1727.
- BENGTSON, I. A. e N. H. TOPPING — 1942 — Complement-fixation in rickettsial diseases. *Am. J. Pub. Health* **32**:48-58.
- BRIDGES, R. F. — 1944 — Note on the preparation of suspensions for the Weil-Felix test. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **37** : 343-344.
- CINTRA, P. ULHÔA e J. TOLEDO PISA — 1920 — Sobre um caso de typho exanthematico em São Paulo. *Brasil-Medico* **34** : 714-718.
- DAVIS, G. E. e R. R. PARKER — 1933 — Additional studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus. *Pub. Health Rep.* **48** : 1006-1011.
- DYER, R. E. — 1933 — Relationship between Rocky Mountain spotted fever and exanthematic typhus of São Paulo. *Pub. Health Rep.* **48** : 512-522.
- FRÓES, H. P. — 1935 — Leishmaniose visceral no Brasil e especialmente na Bahia. *Brasil-Medico* **49** : 109-112.
- GOMES, L. S. — 1935 — Typho exanthematico de São Paulo. *Brasil-Medico* **47** : 919-922.
- GOMES, L. S. — 1941 — Sobre a presença do tifo exantemático do tipo murino ou endêmico em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **1** (1) : 21-39.
- MONTEIRO, J. LEMOS — 1933 — O typho exanthematico de S. Paulo e suas relações com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, à luz das provas de imunidade cruzada. *Brasil-Medico* **47** : 437-442.
- MONTEIRO, J. LEMOS e F. FONSECA — 1932 — Typho exanthematico de S. Paulo. XII. Sobre um virus isolado de ratos da zona urbana da cidade e suas relações com o do typho de S. Paulo. *Mem. Inst. Butantan* **7** : 41-50.
- PARKER, R. R. e G. E. DAVIS — 1933 — Protective value of convalescent sera of São Paulo exanthematic typhus against virus of Rocky Mountain spotted fever. *Pub. Health Rep.* **48** : 501-507.
- PARKER, R. R. e G. E. DAVIS — 1933a — Further studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus. *Pub. Health Rep.* **48** : 859-843.
- PASCALE, H. — 1949 — Rickettsioses em São Paulo. *Arq. Hig. Saúde Púb. (S. Paulo)* **14** : 5-37.
- PASCALE, H. e E. CRUZ — 1945 — Considerações sobre rickettsioses nos municípios de Itapiratiba, São João da Boa Vista e São José do Rio Pardo. *Arq. Hig. Saúde Púb. (S. Paulo)* **10** : (24) : 297-304.
- PASCALE, H. e W. S. PRADO — 1945 — Investigação epidemiológica sobre três casos suspeitos de tifo murino no município de Araraquara. *Arq. Hig. Saúde Púb. (S. Paulo)* **10** (24) : 307-310.
- PISA, J., L. S. GOMES, J. MEYER, J. P. FLEURY, O. CASTRO, C. RODRIGUES e H. ROCHA LIMA — 1931 — Le typhus exanthématique à São Paulo. *C. R. Soc. Biol.* **106** : 1020-1022.
- PLOTZ, H. — 1943 — Complement fixation in rickettsial diseases. *Science* **97** : 20-21.
- PLOTZ, H. e K. WERTMAN — 1942 — The use of the complement fixation test in Rocky Mountain spotted fever. *Science* **95** : 441-442.

- PLOTZ, H., R. L. REAGAN e K. WERTMAN — 1944 — Differentiation between fièvre boutonneuse and Rocky Mountain spotted fever by means of complement fixation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55 : 173-176.
- PLOTZ, H., B. L. BENNETT, K. WERTMAN, M. J. SNYDER e R. L. GAULD — 1948 — The serological pattern in typhus fever. I. Epidemic. *Am. J. Hyg.* 47 (2) : 150-165.
- RODRIGUES, P. M. e J. TRAVASSOS — 1948 — A reação de Bengtson no diagnóstico da febre maculosa das Montanhas Rochosas. *Hospital* 34 (1) : 55-69.
- SAMPAIO CORRÊA, H. — (Comunicação pessoal).
- SCOVILLE JR., A. B., B. L. BENNETT, K. WERTMAN e R. L. GAULD — 1948 — The serological pattern in typhus fever. II. Murine. *Am. J. Hyg.* 47 (2) : 166-176.
- TRAVASSOS, J. — 1938 — La tique *Amblyomma striatum* Koch, 1844, comme vecteur du typhus exanthématique de São Paulo. Infection naturelle en spécimens recueillis sur des chiens, dans un foyer de la Capitale (São Paulo). *C. R. Soc. Biol.* 127-1377-1380.
- TRAVASSOS, J. e E. DIAS — 1939 — Febre maculosa. Identidade imunologica dos virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 34 : 149-179.
- TRAVASSOS, J., P. M. RODRIGUES e L. N. CABRILHO — 1948 — Tifo murino em São Paulo. I. Identificação da *Rickettsia mooseri* isolada de um caso humano. *Mem. Inst. Butantan* 21 : 77-106.
- VIEIRA, F. B. e M. MESQUITA — 1934 — Estudo epidemiológico do tifo exantemático de S. Paulo. *Inst. Hig. S. Paulo. Boletim n.º 51* : 1-20.



AGENTES ACIDULANTES UTILIZADOS EM ALIMENTOS

por

GERMÍNIO NAZÁRIO

do

Instituto Adolfo Lutz

Desde remotos tempos, têm sido utilizados o ácido tartárico extraído do mosto da uva e o ácido cítrico extraído de frutas do gênero *Citrus* como agentes acidulantes em alimentos. Durante longo tempo, empregaram-se, na indústria alimentícia, quase que exclusivamente êstes ácidos. Todavia, com o crescente aumento de consumo de alimentos acidificados e em consequência da procura de agentes acidificantes mais econômicos, observou-se um acentuado esforço industrial no sentido de fornecer, ao mercado consumidor dêsses ácidos, outros, quer orgânicos quer não, que tivessem paladar apropriado para o consumo como alimento e que fossem destituídos de toxicidade nas quantidades utilizadas habitualmente pelo homem. Dois caminhos apresentavam-se então : 1.º — extrair ou sintetizar ácidos comumente presentes em alimentos naturais ; 2.º — procurar obter outros agentes acidificantes não presentes usualmente nos frutos comestíveis e destituídos de toxicidade. Verdade é que muitos ácidos orgânicos existentes, abundantemente, nos frutos ou outras partes comestíveis do vegetal são tóxicos aos animais, acarretando mesmo efeitos nocivos pronunciados, como é o caso do ácido oxálico.

Um ácido encontrado, abundantemente, nos frutos do gênero *Pirus* é o ácido málico, cuidadosamente estudado quanto à sua industrialização por via sintética, já que seus efeitos eram mais ou menos conhecidos. Temos hoje, ao lado de pequenas quantidades disponíveis de ácido L. málico natural, o ácido D L málico sintetizado em grandes quantidades. Também o ácido glicólico, contido em muitos frutos, foi proposto, desde a segunda grande guerra, como agente acidificante, pois que sua preparação por via sintética é facilmente exeqüível a partir do ácido acético.

O ácido láctico, outro dos que ocorrem em muitos frutos e órgãos animais, encontrou enorme aplicação como agente acidificante em alimentos. Deve-se a difusão do seu uso à manufatura economicamente realizada por fermentação da sacarose.

No campo econômico, enormes progressos foram feitos com a produção de ácido cítrico por via fermentativa do açúcar, levando a que tal ácido tivesse seu consumo grandemente aumentado.

Por fim, entre os ácidos orgânicos que têm sido propostos e bem aceitos, destaca-se o ácido glicônico, fornecido comercialmente na forma de solução aquosa xaroposa. Este ácido é encontrado também em muitos frutos, sendo facilmente preparado pela fermentação oxidativa da glicose. O ácido em si, bem como seus sais (de Ca, Fe, Cu), é extensivamente aplicado na terapêutica moderna de sais minerais.

O único ácido proposto como agente acidificante de alimentos, não orgânico, foi o ácido fosfórico. Este, bem como os demais ácidos enumerados, tem sabor ácido agradável e é tido como atóxico nas quantidades usadas, apresentando, além disso, a vantagem de poder ser fabricado em alto grau de pureza.

A primeira questão que se levanta a tóda e qualquer proposição de um novo agente acidificante utilizado na alimentação é saber o grau de toxicidade desse novo agente, desde que outras propriedades sejam favoráveis ao seu uso na alimentação, como sejam grau de pureza, sabor, aroma, etc.

Os dados de toxicidade encontrados na literatura científica foram reunidos no presente trabalho, sempre que possível ao lado de outras informações de interesse farmacológico. Ácidos há que foram minuciosamente estudados em diversos animais de laboratório, quanto a seus efeitos, toxicidade aguda ou crônica, doses letais, etc. Outros, porém, apesar de muito conhecidos, não foram convenientemente abordados sob esse prisma.

Passaremos, a seguir, a examinar, isoladamente, cada ácido.

ÁCIDO CÍTRICO

A literatura científica registra trabalhos que, por vêzes, depoem contra o uso indiscriminado desse ácido.

ZIPKIN (1947), do Instituto Nacional de Saúde de Maryland, estudando o conteúdo de ácido cítrico na saliva humana, revelou que, no homem adulto, cada 100 cm³ de saliva contém de 0,6 a 2,0 mg de ácido cítrico. Zipkin sugere existir uma relação entre o ácido cítrico salivar e a erosão e cárie dentárias. A descalcificação do tecido dentário pelo ion cítrico é sugerida pela observação de que este ion forma com o de cálcio um complexo solúvel e fracamente ionizado, segundo SHEAR, KRAMER e RESNIKOFF (1929). Mc CLURE e RUZICKA (1946) observaram, em laboratório, que o citrato, em bebida praticamente neutra, tem pronunciada ação destrutiva sobre o tecido dentário "in vivo".

Em contraposição aos achados de STAFNE e LOVESTEDT (1947), NEWMAN (1948), verificou que não se observa nenhuma evidência de que a destruição de dentes possa ser atribuída aos efeitos do ácido cítrico de frutas cítricas. Experiências foram executadas entre portorriquenhos que consomem, em média, 4,24 laranjas ou "grapefruit" por dia, durante 5 a 6 meses do ano.

LESCHKE (1932) relata que, como efeito impediante da circulação sanguínea, o ácido cítrico assemelha-se bastante ao ácido oxálico, levando, ocasionalmente, a intoxicações graves e até mesmo letais. É particularmente grave em crianças, nas quais, após a ingestão de mesmo 1 a 2 limões, podem ocorrer deficiências de circulação e desmaios. Menciona esse autor o caso

de uma jovem que ingeriu, de uma só vez, 25 g de ácido cítrico para efeito laxante; apesar de ter vomitado abundantemente, veio a falecer.

Quanto ao destino do ácido cítrico ingerido, SHERMAN, MENDEL e SMITH (1936) realizaram estudos em animais de laboratório, observando que o cão tem a possibilidade de destruir grandes doses de ácido cítrico. Pela administração oral de 0,5 a 2,0 g do ácido por quilo de animal, cerca de 0,7% não é oxidado, aparecendo na urina. A ingestão daquele ácido não afetou nem o pH nem o nitrogênio total na urina coletada em 24 horas. No homem, KUIPER e MATTILL (1933) concluem que o ácido cítrico, quando ingerido de 2 a 20 g, é rapidamente oxidado no organismo, restando somente 1,5 a 2,5%, que é excretado pela urina.

O efeito tóxico do ácido cítrico e de seus sais foi, recentemente, determinado por GRUBER Jr. e HALBEISEN (1948). Verificaram esses autores que os sintomas provocados pela administração de grandes doses de ácido cítrico e citratos assemelham-se aos da deficiência de íon de cálcio, isto é, aumenta a atividade geral, aparece hiperpnéia, vaso-dilatação periférica, salivação, convulsões clônicas e tônicas, cianose e, às vezes, morte. A dose letal média, em milimoles por quilo de animal, foi determinada em animais diversos. Os resultados estão resumidos na tabela abaixo:

	D.L. ₅₀ : milimoles/quilo				
	Coelhos intravenosa	Camun- dongos intravenosa	Camun- dongos intraperit.	Ratos intraperit.	Coelhos intravenosa
Ácido cítrico ...	1,72	0,22	5,0	4,6	0,331
Citrato de sódio	1,76	0,23	7,6	6,3	
Citrato bissódico	1,77	0,30	7,5	7,3	
Citrato trissódico	1,74	0,60	5,5	6,0	

Se tomarmos o resultado das D.L.₅₀ para o coelho, por via intravenosa, e o transferirmos para o homem de peso médio (70 quilos), teremos então a D.L.₅₀ = 7,1 g por 70 quilos. *

A toxicidade crônica, após prolongada administração do ácido cítrico foi determinada por KROP e GOLD (1945), revelando que, na dose de 1,38 g do ácido por quilo administrado a cães, durante 112 a 120 dias, num nível de 103 a 108 doses (3 cães), estes animais não apresentavam nenhum sintoma de intoxicação, mesmo no exame histológico. Tal resultado, calculado para o homem de peso médio de 70 quilos, dar-nos-ia, como dose não tóxica, cerca de 63,6 g diárias.

Sabemos, pelo trabalho de Kuiper e Mattill, já referido, que o ácido cítrico, ingerido numa dose de 2 a 20 g, é rapidamente metabolizado no organismo e que somente 1,5 a 2,5% são excretados na urina. WEISS, DOWNS e CORSON (1923) fixaram em 2,5 g por quilo, em coelhos, a dose tolerável

* Todas as doses para o homem foram calculadas a partir das doses conhecidas, em animais de laboratório, utilizando-se a fórmula de Mech.

MARTINDALE — The Extra-Pharmacopeia. London, Pharmaceutical Press, 1941; p. 32.

de ácidos málico e cítrico para administração oral prolongada e ao redor de 2 g por quilo a dose de ácido tartárico. Esses dados, transferidos para o homem de 70 quilos, nos conduzem às doses diárias que podem ser ingeridas durante longo tempo, sem inconveniente algum para a saúde :

Ácido cítrico e málico — 53 g/70 quilos
Ácido tartárico — 43 g/70 quilos

ÁCIDO TARTÁRICO

De um modo geral, concordam os farmacologistas em que o ácido tartárico é pouco mais tóxico do que o ácido cítrico. Fato curioso, entretanto, é que, dentre todos os ácidos utilizados presentemente como acidificantes, em alimentos, é o ácido tartárico o único dotado de certa atividade antibacteriana. Esta atividade, não só a exerce o ácido livre, como também muitos de seus sais, como seja, por exemplo, o bitartarato de potássio (SEELING e colab., 1943).

Já VIOLLE (1937) havia verificado que uma solução a 0,35% do ácido tartárico em água destilada destruiu *E. typhosa* em 20 ou 30 minutos, *B. dysenteriae* Shiga em 2 horas e *cholera* em 10 minutos. Verificou mais que uma solução a 0,4% faz *E. coli* diminuir em número, mas, mesmo após 24 horas, permanece viva. FROSINI (1940) afirma que a água potável pode ser desinfetada com ácido tartárico ou cítrico. A desinfecção dá-se em 20 minutos em relação a *B. cholera* ; em ½ hora para *B. dysenteriae* ; 3 horas para *B. typhoide*, sendo, no entretanto, o *B. coli* resistente à ação desse ácido.

Ainda sobre a utilização do ácido tartárico como desinfetante da água potável, surgiram outros trabalhos, entre os quais os de NEGRO e BERTASSO (1940) e CAMBOSU (1940).

Sobre o destino do ácido tartárico no corpo humano, DAKIN (1922) afirma que o ácido tartárico (formas D e L) é oxidado no corpo humano menos rapidamente do que os ácidos málico e succínico. Segundo FINKLE (1933), somente parte do ácido tartárico administrado oralmente a pessoas, na dose de 2 g, é excretado inalterado (cerca de 20%). Os restantes 80% são destruídos no trato intestinal pela ação de bactérias, segundo afirmam UNDERHILL e colab. (1931). Esse trabalho de Underhill reforça os achados de PICKENS e HETLER (1930) citados por Finkle. Pickens e Hetler verificaram que, pela administração de grandes doses de suco de uvas a pessoas, a urina se tornava mais ácida e continha ácido tartárico livre.

Experiências realizadas por UNDERHILL e colab. (1931) indicaram que nem o cão nem a cobaia ou o coelho podem utilizar o ácido tartárico.

KROP e GOLD (1945) estudaram a toxicidade dos ácidos tartárico, cítrico e glicólico e respectivo sal sódico, após prolongada administração em cães ; verificaram que a ingestão, durante 112 a 114 dias (100 a 103 doses), de 0,9 g/quilo de ácido tartárico (equivalente a 0,5 g/quilo de ácido glicólico) provocara a morte a um, já depois de 90 dias, com azotemia. Outros três cães apresentaram teores normais quantitativos dos componentes do sangue, se bem que houvesse alterações no que diz respeito à urina. O exame histológico revelou, no cão morto após 90 dias, degeneração tubular no rim. Portanto, na dose de 0,9 g/quilo, no cão, o ácido tartárico pode ser nefrotó-

xico. O estudo do efeito da ingestão de ácido tartárico e outros ácidos em ratos foi efetuado por FITZHUG e NELSON (1947). Vinte ratos, entre machos e fêmeas, receberam dietas contendo 1,2% de ácido tartárico. Em todos os animais de experiência observou-se ganho de peso, após 52 semanas de observação, sem que fosse notada alguma alteração parenquimatosa nos órgãos. (Peso médio dos ratos M = 437,8 ; F = 258,0g). Isto significa que ratos pesando 258 g receberam, durante aquele período de tempo, alimentação diária contendo 1,2% de ácido, sem revelar algum sintoma de intoxicação. Desses dados depreende-se que, se um rato se alimentar, diariamente, com 50 g de alimento, (*ad libitum*), estará ingerindo 0,6 g do ácido tartárico — para 250 g, digamos, de peso do animal. Isto dará cerca de 2,4g/quilo de animal.

ÁCIDO LÁTICO

VLADESCO (1936) verificou que a saliva de indivíduos normais continha, por 100 cm³, ácido láctico nas quantidades de 3,98, 4,24 até 13,61 mg ; no cão encontrou 4,39 mg por 100 cm³ de saliva.

NEUWIRTH e KLOSTERMAN (1940) verificaram, experimentalmente, que, após estarem 10 minutos na cavidade bucal pedaços de banana, sacacrose, glicose ou amido, podia ser provada a formação de ácido láctico por ação de bactérias. A saliva filtrada em filtros Seitz não mostrava tal ação. Por outro lado, julga SCHMITZ (1943) que a corrosão dos dentes seja devida principalmente ao ácido láctico formado pela fermentação bacteriana na cavidade bucal.

NORPOTH e KADEN (1933) demonstraram que o suco gástrico contém de 6 a 25 mg de ácido láctico por cento. Em gastrites, êsse valor é muito aumentado. Um aumento no sangue, por injeção de adrenalina, não correspondia a um acréscimo do conteúdo de ácido láctico estomacal.

Estudos em animais de laboratório, sobre a toxicidade dêste ácido, revelaram que êle é muito pouco tóxico. FÜRTH e ENGEL (1930) verificaram que coelhos podem receber, subcutâneamente, doses de 2,8 a 3,6 g de ácido láctico por quilo, sem sofrer qualquer dano. Morrem, porém, quando alimentados com 1,6 g/quilo ou 0,6 g/quilo durante 3 dias.

Encontram-se, na literatura científica, algumas raras observações, que relataremos a seguir, por apresentarem certo interesse elucidativo.

LECOQ (1936) reproduziu crises polinevríticas em pombos, idênticas às de avitaminose B₁, dando aos animais ração diária contendo 10% de ácido láctico. Esta polinevrite aviária, causada pelo ácido láctico, dá-se em presença ou ausência de glicídios, ou se no regime alimentar prodominarem protídios ou lipídios. Em tal circunstância, o animal é impedido de utilizar a vitamina B₁.

Envenenamento por ácido láctico com êxito letal foi comunicado por Fühner, citado por LESCHKE (1932). Uma mulher de 27 anos recebeu, por engano, no duodeno, em lugar de 100cm³ de solução de sulfato de magnésio, uma solução de ácido láctico a 33%, apresentando, então, vômitos com sangue, durante meia hora, e fortes dores. Houve hemoglobinúria, mas não hematúria. O pulso caiu. A morte deu-se após 12 horas. A necrópsia revelou irritação em 23 cm de comprimento do duodeno.

Já DEFREN (1920) havia discutido e recomendado o uso do ácido láctico refinado em cervejas não alcoólicas e como substituto do ácido cítrico e o tartárico, em refrescos, balas, na indústria do pão, pós de fermento, geléias, vinagres, gelatinas e na conservação de carnes e produtos derivados de peixes.

BORDAS (1927), numa discussão sobre a permissão do uso do ácido láctico em alimentos, concluiu não haver objeção alguma ao seu uso em limonadas (refrescos), pickles ou vinagres, desde que fosse puro, isto é, livre de cobre, zinco, arsênico, ácido oxálico e ácido sulfúrico.

O trabalho mais importante sobre toxicidade do ácido láctico e seu emprego em alimentos foi elaborado por COLLAZO e colab. (1932). Esses autores dão um pequeno apanhado sobre o que foi feito no assunto e passam, em seguida, a apresentar seus próprios resultados. O ácido láctico, introduzido no intestino (leites ácidos, queijos, frutas, etc.) é absorvido e passa à circulação, ou se transforma em outras substâncias, ou ainda é eliminado. Administrado a coelhos por via oral, na quantidade de 1,6 g/quilo, demonstraram os mesmos perfeita tolerância, tendo, entretanto, lactocidemia e glicemia em 30 minutos.

Segundo Parnas (citado por Puyal), a toxicidade para coelhos, por via subcutânea, oscila entre 2,8 e 3,6 g/quilo, enquanto que, por via oral, Fürth e Engel (citados por Puyal) indicam a dose tóxica de 1,6 g/quilo, doses essas repetidas durante 3 dias. Os ratos sobrevivem à injeção subcutânea de 2 a 4 g/quilo e não apresentam qualquer manifestação de intolerância à administração por via oral de 2 g/quilo, durante longo tempo. Segundo os mesmos autores, no homem e no coelho, cerca de 20 a 30% são eliminados na urina, quando ingerido na forma de limonadas ricas em ácido láctico. No cão, se dado por via endovenosa, aparece na urina, em proporções variáveis; sendo, porém, administrado oralmente, quase não é eliminado.

Bateherwick e Long (citados por Puyal) deduziram, pelo aumento da acidez fosfática da urina, depois da ingestão de leite ácido a 29°, que o ácido láctico é completamente utilizado pelo organismo.

A administração por sonda de 0,6 a 1,6 g de ácido láctico a cães de 8 quilos, prolongada durante 42 dias, foi perfeitamente tolerada pelos mesmos. Em coelhos, 5 g/quilo, dados em dias alternados, não evidenciaram manifestações tóxicas. Stauton, Faust, Parfentiew, Sentzeff e Sokoloff (citados por Puyal) indicam como doses máximas, em coelhos, toleradas as seguintes :

via endovenosa	— 0,5 g	}	por quilo
via subcutânea	— 3,0 g		
via oral	— 6,0 g		

Fasold (citado por Puyal), de seus estudos de tolerância de ácido láctico por crianças, chegou à conclusão, segundo suas experiências nas lactantes, de que se poderá administrar aos adultos de 70 quilos enorme dose de 200 g de ácido láctico, sem inconveniente algum.

Se fixarmos como dose máxima tolerada 5 g/quilo, achado de Puyal e colaboradores, e se calcularmos para o homem de 70 quilos, teremos a dose máxima tolerável de mais de 107 g de ácido láctico. Se, de outro lado, tomar-

mos o resultado da observação da administração prolongada em cães, isto é, 1,6 g/8 quilos e transferirmos para o homem de 70 quilos, teremos, como dose tolerável, durante mais de um mês, a quantidade diária de 6,8 g de ácido láctico, ou, em dias alternados (do coelho 5 g/quilo), cerca de 107 g.

ÁCIDO MÁLICO

UNDERHILL e PACK (1925) estudaram o comportamento farmacológico do ácido málico e seus sais. Fixaram esses autores a dose letal subcutânea no rato em 3 g/quilo, quando injetado como malato de sódio (a de tartarato de sódio é 3 g/quilo).

Na dose de 1 g/quilo, o malato de sódio é destituído de efeito tóxico para cães.

O ácido málico não é nefrotóxico e isto se deve ao fato de ser êle facilmente oxidado no organismo. Nas quantidades aplicadas para fins acidulantes, o ácido málico e seus sais podem ser tidos como destituídos de toxicidade.

KRANTZ Jr. e colab. (1931) observaram que o malato de sódio faz decrescer a concentração dos ions de hidrogênio do suco gástrico e aconselham que se faça a substituição do cloreto de sódio pelo malato de sódio, como condimento, porque, assim, decrescerá a acidez livre do suco gástrico, reduzindo-se a fonte de ácido clorídrico.

WEISS e colab. (1923) determinaram a toxicidade do ácido málico e o efeito cumulativo dêle e de outros ácidos em coelhos.

Onta (citado pelos últimos autores) verificou que o ácido málico, administrado a coelhos e cães, aparece na urina. Fornecido, oralmente, em grandes quantidades, é tóxico. De 10 a 20 g "per os" a coelhos, é inteiramente destruído. Quando a dose alcança 25 g, cerca de 5% são excretados na urina.

WISE (1916) relata que, da dose não tóxica de 1g/quilo para o coelho, cerca de 2 a 21% são excretados na urina. Já com dose de 3,3 g/quilo, aparecem sintomas tóxicos.

WEISS e colab. (1923) verificaram, em experiências sobre 40 coelhos, que a dose letal do ácido málico é de 7 g/quilo. Os animais receberam soluções do ácido diretamente no estômago.

A tolerância a doses acumulativas foi observada em outros lotes de coelhos: 3 coelhos foram alimentados com 2,5g/quilo, durante 5 dias consecutivos, por 2 semanas: — 2 sobreviveram e um morreu após a primeira semana. Os sobreviventes receberam doses de 6 g/quilo. Um morreu. Ao outro, após 2 dias, foram dados 8 g/quilo, depois do que, morreu.

A dose tolerada na administração prolongada de ácido málico deve estar em redor de 2,5 g/quilo, ou, talvez, 2 g/quilo.

Calculando esses achados para um homem de 70 quilos, teremos: dose letal — 150 g/70 quilos e dose diária tolerada na administração prolongada — 43 g/70 quilos.

Esses resultados são quase iguais aos do ácido cítrico e superiores aos do ácido tartárico.

ÁCIDO GLICÓLICO

Constituinte normal do caldo de cana, caldo de beterraba e de uvas, assim como de muitos frutos.

Durante a segunda guerra mundial, foi tentada a introdução desse ácido como acidulante de alimentos, principalmente porque ele pode ser fabricado industrialmente por via sintética a preço compensador.

O ácido glicólico, introduzido no organismo, segundo experimentações de BARNES e LERNER (1943), não contribui para a formação do glicogênio no fígado. Também não causa formação de corpos cetônicos no sangue ou na urina. O ácido acético, ao contrário, na mesma concentração, é cetogênico.

O ácido glicólico é considerado como intermediário no metabolismo da glicina e da glicose.

GRIFFITH (1930) observou que a retardação do crescimento de animais, quando se dão grandes doses de ácido benzóico, é sustada ao ser administrado ácido glicólico.

A toxicidade do ácido glicólico, após prolongada administração, foi estudada por KROF e GOLD (1945). De seu trabalho resultou a evidência que o ácido glicólico na dose de 0,5 g/quilo diária, ao cão, não mostra nenhum efeito tóxico, por período que varia de 93 a 119 dias, com doses no número de 82 a 104. Um desses cães anteriormente tinha recebido 85 doses diárias de 0,194 g/quilo e, mesmo assim, nada de anormal ocorreu. O exame histológico dos órgãos revelou completa normalidade.

Esses dados, transferidos para o homem de 70 quilos, conduzem a: 18 g/70 quilos, isto é, o homem poderá tolerar, perfeitamente, por longo tempo, uma dose diária de ácido glicólico, de cerca de 18 g.

ÁCIDO GLICÔNICO

Existente em alguns frutos, proveniente da oxidação de açúcar correspondente, este ácido pode ser preparado pela fermentação oxidativa da glicose. Seu sabor agradável e sua baixa toxicidade muito têm contribuído para a sua introdução na indústria alimentícia como acidulante em geral.

HERMANN e ZENTNER (1938) haviam observado que o ácido glicônico, bem como o ácido láctico, administrados por via oral, são pouco excretados na urina de coelhos. O pH da urina diminui com o ácido glicônico.

HERMANN (1930) observou que ácido glicônico, quando injetado intravenosamente, não acarreta queda da pressão sanguínea (ao contrário dos outros ácidos orgânicos), nem influi no metabolismo do cálcio em coelhos e cães. Porém a administração parenteral causa um aumento de cálcio do soro, isto é, mobiliza este cation, o que vem explicar o fato que ele faz decrescer a toxicidade do ácido cítrico. Somente uma fração do ácido glicônico administrado oralmente é absorvido como tal e isto devido à decomposição por bactérias intestinais.

GAJATTO (1939) determinou como letal a dose de 7,63g/quilo do gliconato de sódio em coelhos, quando injetado intravenosamente; a morte do animal ocorre por ação depressiva exercida sobre o sistema nervoso central.

Já para o ácido glicônico livre, HERMANN (1947) estabeleceu a dose letal de 85 cm³ de solução N/2 por quilo, administrado, intravenosamente, aos mesmos animais de experiência; isto corresponde a 8,3 g/quilo (em peso, do ácido livre), isto é, pouco acima do achado de S. Gajatto para o gliconato de sódio. Se tomarmos, com dose tolerável, a décima parte desse valor, cerca de 0,8 g/quilo, e se o transferirmos para o homem de 70 quilos, teremos a dose tolerável de cerca de 17g de ácido glicônico, administrando-se por via oral. Doses únicas de 3 a 9 g, cada 2 horas, têm sido empregadas, por via oral, para abaixar o pH da urina, por SISK e TOENHART (1938), atingindo o mínimo de pH depois de 3-18 g de ácido glicônico em 2-3 horas. Resultados idênticos foram observados por GOLD e CIVIN (1939), sem, contudo, serem evidentes sintomas de intoxicação. Tais dados são bastante expressivos e bem falam a favor do uso do ácido glicônico como acidulante de alimentos, o qual, adicionado na quantidade de 0,2 ou 0,3%, estará, mesmo assim, bem longe dos limites de toxicidade.

ÁCIDO FUMÁRICO

Recentemente, foi este ácido proposto como acidulante de alimentos e como droga medicinal. Esse interesse nasceu durante a segunda guerra mundial, nos Estados Unidos, em vista do decréscimo de importação de bitartrato de potássio, sub-produto na manufatura do vinho.

É conhecido que o ácido fumárico é integrante normal dos tecidos. Por outro lado, sua relação estrutural com o ácido tartárico e o fato dele ser um sub-produto em sínteses microbiológicas levaram alguns pesquisadores a investigar o grau de toxicidade do ácido livre e seus sais, bem como sua tolerância por administração prolongada. LEVEY e colab. (1946) realizaram estudos de toxicidade aguda e crônica do ácido fumárico, sendo que seus resultados podem ser assim resumidos:

a) Ratos alimentados com uma dieta sintética adequada, contendo 0,1 a 1,0% de ácido fumárico, não mostraram, por um a dois anos, anormalidade no crescimento, no conteúdo de hemoglobina, no número de eritrócitos e leucócitos, em dentes, cinzas de ossos, no fígado, nos rins, no estômago e no pâncreas.

b) Cobaias alimentadas com 1% de ácido fumárico, por um ano, não mostraram anormalidade no crescimento. A segunda geração, também tratada sob as mesmas condições desde o nascimento, não evidenciou efeitos tóxicos.

c) 75 indivíduos, que receberam 0,5 g de ácido fumárico durante um ano, não manifestaram conseqüências tóxicas.

d) Foi também pesquisado, em ratos, o efeito de grandes doses de ácido fumárico. A toxicidade oral do ácido fumárico é extremamente baixa; 7,04 g/quilo, por dia, não produzem efeito direto. Sob as mesmas condições, o ácido tartárico é mais tóxico.

A D.L.₅₀ é, aproximadamente, igual a 8,0 g/quilo, oral.

A D.L.₅₀ intraperitoneal é de cerca de 0,587 g/quilo.

Dêsse trabalho, conclui-se que a dose letal no homem será, aproximadamente, de 80 g/70 quilos, quando administrado oralmente; por via intraperitoneal, a dose letal aproximada será de 5,8 g/70 quilos.

FITZHUGH e NELSON (1947) investigaram a toxicidade crônica de diversos ácidos, entre os quais o ácido fumárico. Mostraram êsses autores que ratos alimentados com dieta contendo 1,2 g% de ácido fumárico durante o ano não mostraram nenhum efeito tóxico. Revelou-se fracamente tóxico somente quando administrado ao alimento de ratos com 1,5 g% durante o ano. À base dêsse trabalho, os autores sugerem o uso do ácido fumárico em alimentos.

O fumarato de sódio, cuja DL_{50} é igual a 2,42 g/quilo, intraperitonealmente, em ratos tem sido proposto como catártico, em substituição aos sais de ácido cítrico, tartárico, glicônico, etc.

Maiores detalhes sobre o assunto podem ser encontrados nos trabalhos de BODANSKY e colab. (1942), LOCKE e colab. (1942), GOLD e ZAHM (1943) e SMYTH e colab. (1945).

ÁCIDO FOSFÓRICO

Em relação aos outros ácidos já citados, é o ácido fosfórico o único que apresenta, em agrupamento indispensável aos organismos vivos, o ion fosfórico. Se não, vejamos: os ácidos cítrico, láctico, glicônico e fumárico, introduzidos no organismo, são totalmente queimados; além disso, o próprio organismo sintetiza-os num metabolismo intermediário de glicídios e lípidios.

Os ácidos málico e tartárico não têm outro destino; são parcialmente eliminados pela urina e o restante entra em combustão orgânica, sendo, assim, destruídos. O mesmo, porém, não acontece com o ácido fosfórico; os fosfatos introduzidos no organismo não servem como substâncias energéticas, isto é, não fornecem energia calorífica pela sua combustão, mas sim tomam parte na constituição dos tecidos, especialmente do sistema de sustentação e da condutibilidade nervosa, ou integram a estrutura de enzimas (cocarboxilase, fermento amarelo) e nucleótidos, ou ainda entram no metabolismo intermediário de carboidratos (ésteres de Embden, Cori, etc), ou no sangue, na forma de fosfato de sódio, contribuindo para a manutenção do pH sangüíneo. O organismo vivo não tem capacidade de sintetizar o ion fosfórico e a sua introdução no organismo é feita através da alimentação.

É conhecida a necessidade de fosfatos para os animais em crescimento, fosfatos êsses que, com o cálcio, entram na constituição dos ossos. A alimentação humana fornece, comumente, os fosfatos e o cálcio necessários ao organismo. Até hoje, não sabemos, ao certo, as necessidades do organismo infantil ou adulto em fósforo. O que sabemos, ao certo, é que o organismo humano elimina, pela urina, todo o excesso de fosfatos introduzidos nêle, acima de suas necessidades. De outro lado, um déficit de fosfatos no organismo não será compensado senão pela introdução de novos fosfatos.

Segundo von NOORDEN (1921), uma deficiência de fósforos observa-se, se bem que mais raramente, em casos de:

1.º — Excesso de trabalho muscular e, provavelmente, outras atividades protoplasmáticas.

2.º — Desnutrição geral.

3.º — Por dieta que, sendo altamente calórica, seja deficiente em fosfatos.

Sabemos que o excesso de trabalho muscular provoca uma grande eliminação de fosfatos na urina.

De outro lado, encontram-se, na literatura, trabalhos de autores diversos, em que se verificou que a administração de fosfato de sódio (bifosfato de sódio), chamado Recresal, aos indivíduos, não só diminuiu o cansaço muscular, como aumentou, nesses indivíduos, a eficiência mental e física : — GRIESBACH (1928), POPPELREUTER (1930 e 1930a) RHAM (1932), CORBIAU (1936), GAJATTO (1939) e GREENFIELD (1941).

A alimentação mal orientada de indivíduos pode levá-los a uma carência de fósforo ; apesar desses indivíduos ingerirem alimentos ricos em cálcio, as quantidades de fosfato e cálcio não são suficientes para a formação do fosfato tricálcico e, conseqüentemente, não se fará o depósito ósseo, o que levará o indivíduo (em crescimento), independente de outras causas, ao raquitismo, além de outras possíveis perturbações de ordem nervosa e metabólica.

Von Noorden e Solomon (citado por von Noorden) haviam admitido que os fosfatos, introduzidos no organismo em alimentos (lecitinas, cefalinas, etc), cindem-se no estômago, formando o ion livre do ácido fosfórico.

Emlden, experimentalmente, provou a necessidade do ácido fosfórico livre para processar-se a síntese e degradação do glicogênio, ligando-se à glicose para formar, intermediariamente, esterres fosfóricos da glicose (ester de Emlden, Cori e Harden-Young).

Apesar de se reconhecerem estas verdades científicas já há muitos anos, o uso do ácido fosfórico como medicamento e em alimentos encontrou uma certa repulsa. Terminou, por fim, pela demonstração experimental da baixa toxicidade, quer aguda, quer crônica, desse ácido.

É claro que o ácido fosfórico não poderá ser nunca administrado na forma de solução concentrada, pois, como tal, é cáustico e age sobre mucosas, irritando-as, destruindo os tecidos e provocando enterites agudas. Mas tal fenômeno se verifica com qualquer ácido em forma concentrada, como no acima relatado, sobre a morte de uma senhora a quem foi administrada, por engano, a dose de 100 cm³ de ácido láctico a 33%. A necrópsia revelou irritação da mucosa em alguns centímetros do duodeno. Mesmo soluções de cloreto de sódio concentrado, e isso é conhecimento clássico, são igualmente tóxicas.

Os trabalhos fundamentais do estudo da toxicidade crônica do ácido fosfórico foram feitos principalmente por pesquisadores franceses e, entre esses, destacam-se Cautru, Martinet e Joulie.

CAUTRU (1904) relata, em seu trabalho, que já em 1900, com Bardet e Brun, administraram, durante um mês e meio, a um pato, uma grama por dia de ácido fosfórico oficial (36,4% de ácido fosfórico), sem terem verificado qualquer sintoma estranho. Sendo o animal sacrificado e seu fígado examinado, não revelou anormalidade, nem esteatose. Cautru, em 1903, apresentou, à Sociedade de Terapêutica, sua observação sobre 3 cobaias, às quais foram, durante 3 meses, administrados de 0,5 a 1 grama diárias de ácido fosfórico. O peso das cobaias era de 350 g. Uma cobaia morreu de acidente de gaiola; as outras duas sacrificadas não revelaram nenhuma anormalidade nos cortes histológicos de seus fígados e rins. Mais outras duas cobaias, que prosseguiram ingerindo as mesmas doses diárias, durante 11 meses depois de sacrificadas, não mostraram degeneração parenquimatosa, estando íntegro o tecido hepático.

Essas doses, transferidas para o homem de 70 quilos, equivalem a 50 g de ácido fosfórico oficial por dia, ou sejam 18,2 g de ácido fosfórico (H_3PO_4).

O mesmo Cautru efetuou experiências em cães. Tomou 2 dêsses animais, dos quais 1 testemunha; ao outro, pesando 8.500 g, administrou, durante um mês, sem qualquer inconveniente, de 1 a 2 g de ácido fosfórico oficial (15 a 30 gôtas). A observação se prolongou durante um ano. Os dois cães (de 2 e meio meses de idade), que pesavam, o testemunha 8.800 g e o em experiência 8.500 g, foram submetidos ao mesmo regime alimentar (pão e carne cozida). Ao cão em experiência, deram-se, a mais, 15 gôtas (1g) de ácido fosfórico oficial, diariamente. Após um mês, o cão em experiência pesava $\frac{1}{2}$ quilo a mais do que o testemunha. Nesse momento, a dose foi elevada a 30 gôtas (2g) do ácido fosfórico oficial. Após mais de um mês, o peso do cão em experiência era de 9.990 g e o do testemunha, 9.700 g.

Afim de verificar a resistência do animal em experiência, foi injetado 1 cm³ de cultura de bacilos de tuberculose na safena. Após 10 dias, passou-se a dar, ao cão em experiência, dose diária de 35 gôtas de ácido fosfórico oficial (2,3g). Depois de 15 dias, os pesos dos cães eram: o em experiência, 11.000 g e o testemunha, 11.050 g. Após um mês, o cão em experiência pesava 12.010 g e o testemunha, 11.300 g. Até este momento (um mês após), não apareceu nenhum sinal de tuberculose. Aí foi inoculada a segunda dose de 1 cm³ de cultura de bacilos de tuberculose, subcutâneamente. O tratamento com ácido fosfórico continuou mais dois meses e meio. Decorrido esse período, o cão em experiência pesava 21.200 g e não mostrava nenhum sintoma de tuberculose. Durante mais de 20 dias, o cão em experiência tomou de 100 a 200 gôtas de ácido fosfórico oficial (cerca de 10 g), ou seja 3,64 g de ácido fosfórico. No fim desse tratamento, o cão em experiência pesava 22 quilos e o testemunha, menos de 21 quilos. O cão descansou 17 dias; recebeu, depois, 300 gôtas de ácido fosfórico oficial, sob forma mais concentrada; o cão apresentou uma ligeira enterite, perda de apetite, etc. Após 10 dias, foi administrada dose menor (200 gôtas diárias) e os sintomas desapareceram. Após mais 10 dias, os pesos dos cães eram: o em experiência, 23.400 g e o testemunha, 21.500 g. Depois de 8 dias, foram injetados mais 1 cm³ de cultura de bacilos de tuberculose humana, em ambos os cães. O tratamento com ácido fosfórico, no cão em experiência, só foi suprimido depois de 12 dias decorridos dessa terceira inoculação de bacilos da tuber-

culose. Os primeiros abscessos contendo bacilos de tuberculose desapareceram depois de 18 dias de inoculação. Ambos os cães emagreceram muito. Nesse dia (1 ano depois da experiência inicial), pesaram: o¹ em experiência, 24.500 g e o testemunha, 24.000 g. O cão em experiência, que tomou ácido fosfórico durante 1 ano, apesar de ter recebido 2 inoculações, de 1 cm³ cada, de bacilos de tuberculose, não havia perdido sua resistência. Se tivesse esteatose hepática, ele não teria resistido à infecção bacilar.

Cautru fez ainda outra série de experiências com 3 cães, sendo que um foi mantido como testemunha e os outros receberam, diariamente, 5 g de ácido fosfórico oficial cada um. Um desses cães foi sacrificado, após 4 meses de tratamento. Os cortes de fígado e rins mostraram-se normais. Dessas experiências, conclui Cautru, o ácido fosfórico não é um tóxico, nem esteatosante.

Após essas verificações, Jaulie, colaborador de Cautru, começou a empregar doses diárias de 200 a 400 gótas (isto é, até 26 g de ácido oficial), em doentes, para combater a diátese hipoácida e doses de 30 a 60 gótas (cêrca de 2 a 4g) depois de 5 anos de idade. Jamais foi observado qualquer acidente. Em crianças de 18 meses, foram dadas 4 a 8 gótas diárias (cêrca de 0,13 g de ácido fosfórico) ou mais e aos velhos, de 50 a 100 gótas, isso é, até 2,3 g de ácido fosfórico, sem qualquer inconveniente.

Dessas concludentes experimentações, podemos tomar como dose diária tolerada por um cão de pêso médio, digamos 20 quilos, cêrca de 200 gótas de ácido fosfórico oficial, ou sejam 13,3 g, o que equivale a 4,74 g de ácido fosfórico. Transferindo êsse resultado para o homem de 70 quilos, teremos a dose de 11 g de ácido fosfórico, que poderá ser, sem inconveniente, dado ao organismo, diàriamente.

Se quisermos transferir a experiência de Jaulie para homens, teremos, como dose diária perfeitamente tolerável, cêrca de 26,6 g de ácido fosfórico oficial, o que equivale a 9,48 g de ácido fosfórico.

GUEYLARD e DUVAL (1922) estudaram a influência da acidez e do radical ácido sôbre a toxicidade de ácidos diversos. Para isso, escolheram peixes como animais em experiência (Epinoches) e os ácidos fosfórico, láctico, acético, propiônico, etc. Fizeram soluções desses ácidos com os correspondentes sais sódicos atóxicos N/50, que agem como tampão. No pH 2,8, os peixes sobreviveram 30 minutos em ácido fosfórico e 12 minutos em ácido láctico. No pH 4,0, os peixes permaneceram vivos 8 horas em ácido fosfórico, 2 horas e 35 minutos em ácido láctico e 11 minutos em ácido acético. Em pH 4,3, os peixes permaneceram vivos sômente 9 minutos em ácido propiônico.

pH	Ácido Fosfórico	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiônico
2,8	30 minutos	12 minutos	—	—
4,0	8 horas	2 hors. 35'	11 minutos	—
4,3	—	—	—	9 minutos

Portanto, no mesmo pH, a toxicidade desses ácidos cresce na seguinte ordem : ácido fosfórico, ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico.

A dose letal, em coelhos, por via intravenosa, determinada por HERMANN (1947) é de 62 cm³ de solução N/2 por quilo, o que corresponde a 1,01 g/quilo de ácido fosfórico.

Para um homem de 70 quilos, a dose letal intravenosa será em redor de 22 g de ácido fosfórico.

Hoje em dia, o ácido fosfórico faz parte de quase todas as Farmacopéias : o DISPENSATORY OF THE UNITED STATES OF AMÉRICA (1947) indica seu uso direto no organismo humano. Não só em Farmacopéias, mas em Farmacologias e Tratados de Química Farmacêutica, encontramos estudos sobre o ácido fosfórico. Veja-se, por exemplo, em GOODMAN e GILMAN (1941), SOLLMANN (1944), HAGER (1942), REUTTER (1939) e LEBEAU (1946), onde se lê que o ácido fosfórico diluído é aplicado como excitante da célula nervosa e utilizado também como acelerante da função gástrica, na medicação ácida em indivíduos com hipocloridria. Prescreve-se em solução, como xarope ou limonada em doses variáveis de 1 a 5 g, durante 24 horas, o que equivale de 100 mg a 500 mg de H PO.

LECOQ e VILLUIS (1932, 1932a e 1932b) e LECOQ e VILLETTE (1933 e 1933a) estudaram a ação do ácido fosfórico e diversos derivados salinos sob o ponto de vista de um valor antirraquítico. De suas pesquisas, concluíram esses autores que a atividade antirraquítica dos ortofosfatos tende a diminuir do sal mono ao trissódico. A eficiência dos sais ortofosfóricos está estreitamente ligada ao número de hidrogênios ácidos livres que o composto possui (LECOQ e VILLUIS, 1932).

Entre os diversos usos terapêuticos do ácido fosfórico, citam-se : para doentes com eliminação de sais minerais e hipoacidez urinária ; nos estados mórbidos em que o sistema nervoso deprimido perde sua resistência, neurastenias verdadeiras, em que há grande eliminação de fosfatos alcalinos pela urina ; nos casos de artritismos ; nos estados raquíticos (sífilis, impaludismo, etc) ; nos intoxicados (envenenamento por chumbo) ; em certos casos de dispepsias, etc.

Entre nós, ROLIM (1942) tem aplicado solução de ácido fosfórico 1 : 200 em glaucomas, injetando cerca de 0,15 cm³. Como resumo, o autor descreve que o vítreo suporta bem soluções ácidas fracas de ácido fosfórico. Não foi observada complicação ou acidente, durante nem depois da acidificação vítrea.

DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi trazer à luz a verdade científica acerca da toxicidade dos ácidos mencionados, a fim de que sejam, os que ainda não o foram, admitidos como agentes acidulantes em alimentos e bebidas, entre nós.

O Decreto-lei 15.642 de 9/2/1946, que aprova o Regulamento do Policiamento da Alimentação Pública, admite apenas o uso dos ácidos cítrico, tartárico e láctico como agentes acidulantes. À vista do que foi exposto, fácil é verificar que, com maior razão do que o ácido tartárico, se poderá incluir alguns dos outros.

Do relato feito e de acôrdo com os dados obtidos da literatura consultada, dados êsses resultantes de provas experimentais levadas a efeito com animais de laboratório, quer quanto à toxicidade aguda, quer quanto à crônica, podemos concluir o seguinte :

Doses diárias toleráveis para a administração prolongada, sem inconveniente para a saúde do adulto (70 quilos) :

1.º) Ácido cítrico	—	53 g
2.º) Ácido málico	—	entre 43 e 53 g
3.º) Ácido láctico	—	43 g em média
4.º) Ácido tartárico	—	43 g
5.º) Ácido fumárico	—	aprox. 43 g
6.º) Ácido glicônico	—	17 g
7.º) Ácido glicólico	—	18 g
8.º) Ácido fosfórico	—	11 g

RESUMO

Foi feito um apanhado da literatura científica, no que concerne à toxicidade dos ácidos cítrico, tartárico, málico, láctico, fumárico, glicônico, glicólico e fosfórico.

A toxicidade crônica dêsses ácidos cresce na seguinte ordem :

Cítrico, málico, láctico, tartárico, fumárico, glicônico, glicólico e fosfórico.

Todos os ácidos mencionados se mostram adequados para serem usados em alimentos e bebidas.

SUMMARY

In this paper, there is made a study of the scientific literature concerning the toxicity of the citric, tartaric, malic, lactic, fumaric, gluconic, glycollic and phosphoric acids.

The chronic toxicity of these acids encreases in the following order :

citric, malic, lactic, tartaric, fumaric, gluconic, glycollic and phosphoric.

All the mentioned acids are proper to be used in food an drinks.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, il est fait un abrégé de la littérature scientifique sur la toxicité des acides citrique, tartrique, malique, lactique, fumarique, gluconique, glycolique et phosphorique.

La toxicité de ces acides croit dans l'ordre suivante : citrique, malique, lactique, tartrique, fumarique, gluconique, glycolique et phosphorique. Tous ces acides peuvent être employés dans les aliments et les breuvages.

BIBLIOGRAFIA

- BARNES, R. H. e A. LERNER — 1943 — Metabolism of glycolic and glyoxylic acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **52** : 216-219.
- BODANSKY, O., H. GOLD e W. ZAHM — 1942 — The toxicity and laxative action of sodium fumarate. *J. Am. Pharm. Assoc.* **31** : 1-8.
- BORDAS, F. — 1927 — L'acide lactique dans l'alimentation. *Ann. Fals. Fraudes* **20** : 472-477. Resumo em *Chem. Abstracts* 1928, **22** : 643.
- CAMBOSU, G. — 1940 — Studio sulla depurazione biologica delle acque mediante l'impiego dell'acido tartarico. *Igiene Moderna* **33** : 74-80.
- CAUTRU, F. — 1904 — L'acide phosphorique. Son innocuité. Ses principales indications en thérapeutique. *Presse Médicale* **74** : 488-589.
- COLLAZO, J. A., J. PUYAL e I. TORRES — 1932 — El ácido d. l. láctico considerado como alimento. I. Su asimilación y toxicidad en el conejo. *An. Casa Salud Vallcilla* **3** : 253-265 e *An. Soc. Españ. Fis. Quím.* 1933, **31** : 672-684. Resumo em *Chem. Abstracts* 1934, **28** : 531.
- CORBAU, L. — 1936 — Modifications de la phosphatémie provoquées par l'ingestion journalière de phosphate bisodique. *C. R. Soc. Biol.* **122** : 474-475.
- DAKIN, H. D. — Oxidations and reductions in the animal body. 2. ed., Londres, Longmans, Green & Co., 1922. p. 176.
- DEFREN, G. A. — 1920 — Use of refined lactic acid in food products. *Chem. Age (N. Y.)* **2** : 478-479.
- FINKLE, P. — 1933 — The fate of tartaric acid in the human body. *J. Biol. Chem.* **100** : 349-355.
- FITZHUGH, O. G. e A. A. NELSON — 1947 — The comparative chronic toxicities of fumaric, tartaric, oxalic, and malic acids. *J. Am. Pharm. Assoc.* **36** : 217-219.
- FROSINI, R. — 1940 — On the use of organic acids for the disinfection of water supplies. *Igiene Moderna* **33** : 193. Resumo em *Chem. Abstracts* 1944, **38** : 5342.
- FÜRTH, O. e P. ENGEL — 1930 — Über die Assimilierbarkeit und Toxizität racemischer Milchsäure. *Biochem. Ztschr.* **229** : 381-396. Resumo em *Chem. Abstracts* 1931, **25** : 1588.
- GAJATTO, S. — 1939 — Ricerche farmacologiche sul fosfato monosodico. *Arch. Farmacol. Sper.* **68** : 87-98.
- GOLD, H. e H. CIVIN — 1939 — Gluconic acid as a urinary acidifying agent in man. *J. Lab. Clin. Med.* **24** : 1139-1146.
- GOLD, H. e W. ZAHM — 1943 — A method for the evaluation of laxative agents in constipated human subjects, with a study of the comparative laxative potency of fumarates, sodium tartrate and magnesium acid citrate. *J. Am. Pharm. Assoc.* **32** : 173-178.
- GOODMAN, L. e A. GILMAN — The pharmacological basis of therapeutics. New York, Macmillan, 1941; p. 615, 721 e 730.
- GREENFIELD, I. — 1941 — The effect of the intravenous administration in normal rabbits. *J. Lab. Clin. Med.* **27** : 68-70.
- GRIESBACH, H. — 1928 — Nochmals Recresal und Leistungsfähigkeit. *Med. Welt.* **2** : 1818.
- GRIFFITH, W. H. — 1930 — Effect of glucosamine and of glycolic acid on detoxication of sodium benzoate in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **28** : 216-217.
- GRUBER JR., C. M. e W. A. HALBEISEN — 1948 — Study on comparative toxic effects of citric acid and its sodium salts. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **94** : 65-67.
- GUEYLARD, F. e M. DUVAL — 1922 — Toxicité comparée de divers acides pour les poissons (Epinoches). *C. R. Acad. Sci.* **175** : 1243-1245.

- HAGER, H. — Tratado de Farmacia Prática. Trad. 3. ed. alemã, Barcelona, Labor S.A., 1942; 1: 261 e 263.
- HERMANN, S. — 1930 — Zur Pharmakologie der Glukonsäure; ein Beitrag zum Problem der Wirkung freier Säuren im Organismus. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **154**: 143-160. Resumo em *Chem. Abstracts* 1931, **25**: 3068.
- HERMANN, S. — 1947 — Some paradoxical effects in experimental pharmacology. *Exp. Med. Surg.* **5**: 160-162.
- HERMANN, S. e M. ZENTNER — 1938 — Ausscheidung peroral verabreichter Säuren und ihrer Salze im Kaninchenharn. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **188**: 518-520. Resumo em *Chem. Abstracts* 1939, **33**: 5499.
- KRANTZ Jr., J. C., A. A. SILVER e B. J. HOFFMAN — 1931 — The effect of sodium malate combinations upon gastric acidity. *Ann. Int. Med.* **4**: 1441-1446. Resumo em *Chem. Abstracts* 1931, **25**: 5210.
- KROP, S. e H. H. GOLD — 1945 — On the toxicity of hydroxyacetic acid after prolonged administration: comparison with its sodium salt and citric and tartaric acids. *J. Am. Pharm. Assoc.* **34**: 86-89.
- KUIPER, A. C. e H. A. MATTELL — 1933 — Some aspects of citric acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **103**: 51-60.
- LEBEAU, P. e G. COURTOIS — *Traité de Pharmacie Chimique*. 3. ed., Paris, Masson et Cie., 1946; 1: 246-247.
- LECOQ, M. R. — 1936 — Production de polynévrite aviaire au moyen de régimes riches en glucides, en protides ou en lipides, comportant de fortes doses de vitamines B, par simple addition d'acide lactique. *C. R. Acad. Sci.* **202**: 1304-1307.
- LECOQ (Lecoq!), R. e F. VILLUIS — 1932 — Action de quelques dérivés calciques sur l'évolution du rachitisme expérimental du rat. *C. R. Soc. Biol.* **109**: 539-541.
- LECOQ, R. e F. VILLUIS — 1932a — Action de quelques composés inorganiques du phosphore sur l'évolution du rachitisme expérimental du rat. *C. R. Soc. Biol.* **109**: 630-631.
- LECOQ, R. e F. VILLUIS — 1932b — Action de quelques glycérophosphates sur l'évolution du rachitisme expérimental du rat. *C. R. Soc. Biol.* **110**: 687-689.
- LECOQ, R. e VILLETTE — 1933 — Influence du métal sur l'activité antirachitique des orthophosphates. *C. R. Soc. Biol.* **114**: 1096-1098.
- LECOQ, R. e H. VILLETTE (Vilette!) — 1933a — Phosphorous and rickets. II. The role of phosphate ion in antirachitic activity of inorganic compounds of phosphorus. *J. Pharm. Chim.* **18**: 192-197. Resumo em *Chem. Abstracts* 1934, **28**: 510.
- LESCHKE, VON ERICH — 1932 — Fortschritte in der Erkennung und Behandlung der wichtigsten Vergiftungen. XI. Vergiftungen mit Oxalsäure, Zitronen-, Milch- und Pikrinsäure. *Münch. Med. Wochsch.* **79**: 1481-1482.
- LEVEY, S., A. G. LASICHAK, R. BRIMI, J. M. ORTEN, C. J. SMYTH, e A. H. SMITH — 1946 — A study to determine the toxicity of fumaric acid. *J. Am. Pharm. Assoc.* **35**: 298-304.
- LOCKE, A., R. B. LOCKE, H. SCHLESINGER e H. CARR — 1942 — The comparative toxicity and cathartic efficiency of disodium tartrate and fumarate, and magnesium fumarate, for the mouse and rabbit. *J. Am. Pharm. Assoc.* **31**: 12-14.
- MCCLURE, F. J. e J. RUZICKA — 1946 — The destructive effect of citrate vs. lactate ions on rats' molar tooth surfaces, in vivo. *J. Dent. Research* **25**: 1-12.
- NEGRO, G. e G. BERTASSO — 1940 — Epurazione biologica individuale di acqua da bere mediante trattamento con acido tartarico. *Giorn. Batt. Immun.* **25**: 687-698.
- NEUWIRTH, I. e J. A. KLOSTERMAN — 1940 — Demonstration of rapid production of lactic acid in oral cavity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **45**: 464-467.
- NEWMAN, WM. A. — 1948 — Dental observations of native Puerto Ricans with special reference to their habits of citrus fruit consumption. *U. S. Naval Med. Bull.* **48**: 698-699. Resumo em *Chem. Abstracts* 1948, **42**: 8909.
- NOORDEN, C. von — 1921 — Über Phosphorsäure in der Kost und als Medikament. *Therap. Halbmonatshefte* **35**: 79-82.
- NORPOTH, L. e E. KADEN — 1933 — Untersuchungen über die Milchsäure des Magensaftes. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **169**: 414-428.

- PICKENS, L. M. e R. A. HETLER — 1930 — The effect of grape juice on nitrogen-retention and urinary acidity. *J. Home Econ.* **22** : 44-48.
- POPPELREUTER, W. — 1930 — Zur Frage der Steigerung der industriellen Arbeitsfähigkeit durch Recresalzufuhr. *Arbeitsphysiologie* **2** : 507-518.
- POPPELREUTER, W. — 1930a — Selbstbeobachtungen über die Wirkung jahrelanger Phosphatzufuhr. *Arbeitsphysiologie* **3** : 605-611.
- REUTTER, L. — *Traité de Chimie Pharmaceutique*. Paris, J. B. Bailliére et Fils, 1939 ; p. 18.
- RHAM, K. — 1932 — Über die Wirkung des Recresals auf die körperliche und geistige Leistungsfähigkeit. *Arch. Ges. Psychol.* **86** : 459-522.
- ROLIM, R. — 1942 — A acidificação do vitreo no tratamento do glaucoma. *Brasil-Médico* **56** : 332-333.
- SCHMITZ, E. — 1943 — Behavior of carbohydrates in the mouth. *Ernährung* **8** : 196-202. Resumo em *Chem. Abstracts* 1945, **39** : 346.
- SEELING, M. G., D. J. VERDA e F. H. KIDD — 1943 — The talcum powder problem in surgery and its solution. *J. A. M. A.* **123** : 950-954.
- SHEAR, M. J., B. KRAMER e L. RESNIKOFF — 1929 — Composition of bone. VIII. Conductivity titrations of calcium ions with chloride, acetate, lactate, and citrate ions at 38°. *J. Biol. Chem.* **83** : 721-735.
- SHERMAN, C. C., L. B. MENDEL e A. H. SMITH — 1936 — The metabolism of orally administered citric acid. *J. Biol. Chem.* **113** : 265-271.
- SISK, I. R. e O. TOENHART — 1938 — Gluconic acid as urinary acidifying agent. *J. Urology* **39** : 699-709.
- SMYTH, C. J., R. BRUNDAGE, J. M. ORTEN e A. H. SMITH — 1945 — Fumaric acid salts as hydrogogue cathartics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **60** : 301-303.
- SOLLMANN, T. — *A Manual of Pharmacology*. 6. ed., Philadelphia, W. B. Saunders, 1944 ; p. 883.
- STAFNE, E. C. e S. A. LOVESTEDT — 1947 — Dissolution of tooth substance by lemon juice, acid beverages and acids from some other sources. *J. Am. Dent. Assoc.* **34** : 586-592.
- UNDERHILL, F. P. e G. T. PACK — 1925 — Pharmacological behavior of malic acid and its salts. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **25** : 467-485. Resumo em *Chem. Abstracts* 1925, **19** : 3122.
- UNDERHILL, F. P., C. S. LEONARD, E. G. GROSS e T. C. JALESKI — 1931 — Studies on metabolism of tartrates ; behavior of tartrate in organism of rabbit, dog, rat and guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **43** : 359-380.
- UNDERHILL, F. P., F. I. PETERMAN, T. C. JALESKI e C. S. LEONARD — 1931 — Studies on metabolism of tartrates ; behavior of tartrates in human body. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **43** : 381-398.
- VIOLLE, H. — 1937 — Contribution à l'étude de la destruction des germes pathogènes dans l'eau de boisson par l'acide tartrique suivi ou non de sa neutralisation. *Presse Médicale* **45** : 1355-1356.
- VLADESCO, RADU — 1936 — Sur la présence de l'acide lactique dans la salive. *C. R. Soc. Biol.* **121** : 275-276.
- WEISS, J. M., C. R. DOWNS e H. P. CORSON — 1923 — Inactive malic acid as a food acidulent. *Indust. Engin. Chem.* **15** : 628-630.
- WISE, L. E. — 1916 — Elimination of malates after subcutaneous injection of sodium malate. *J. Biol. Chem.* **28** : 185-196.
- ZIPKIN, I. — 1947 — Citric acid in saliva. *Science* **106** : 343.

AÇÃO DA AUREOMICINA SOBRE A FEBRE MACULOSA EXPERIMENTAL EM COBAIAS

Sua atividade, após a adaptação à via parenteral, sobre rickettsias isoladas
em São Paulo

por

J. J. DE MACEDO
Do Instituto Butantan

C. HABERBECK BRANDÃO

e

E. LEMOS MONTEIRO
Do Instituto Adolfo Lutz

Sabe-se que a aureomicina é o antibiótico de escolha para o tratamento das rickettsioses, segundo demonstraram os trabalhos de WONG e COX (1948), ANIGSTEIN e colab. (1948), SCHOENBACH e colab. (1948), DOWLING e colab. (1948) e LENNETTE e colab. (1948). Procuramos comprovar a ação desse antibiótico na febre maculosa experimental em cobaias com rickettsias isoladas em São Paulo, conhecida como é sua identidade antigênica com as rickettsias que ocasionam, nos Estados Unidos, a febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Nos trabalhos experimentais em que se utilizam cobaias, a via parenteral é a que mais comodidade e segurança oferece à administração de medicamentos. O emprêgo da aureomicina, por essa via, acarreta certos prejuízos e inconvenientes, tais como fenômenos inflamatórios locais acentuados, às vezes chegando a necrose, que a contra-indicam, conforme foi assinalado, em diferentes trabalhos, por grande número de autores: HARNED e colab., COLLINS e colab., DOWLING e colab., BRYER e colab., SCHOENBACH e colab. e LENNETTE e colab. (1948).

Utilizando a aureomicina destinada a uso oral, conseguimos adaptá-la à via parenteral, suprimindo os inconvenientes mencionados; essa modificação possibilitou execução perfeita de nossas experiências e, o que é de maior relevância, veio permitir, posteriormente, o tratamento, por via intramuscular, de doentes de febre maculosa (1950). Com efeito, esses doentes são medicados, quase sempre entre nós, nos últimos períodos da doença, o que dificulta sobremaneira, não só a administração oral dos medicamentos indicados, como também a obtenção segura de rápidos efeitos terapêuticos.

MATERIAL E TÉCNICA

Usamos cobaias pesando, aproximadamente, 500g; a raça de rickettsias empregada foi a conhecida por "Cupecê", isolada nas proximidades da Capital de São Paulo, altamente virulenta para cobaias. As inoculações infectantes faziam-se por via intraperitoneal, na dose de 1 ml de sangue, colhido por punção cardíaca de cobaias contando 3 dias de reação febril. Considerava-se febre temperatura superior a 39,6.°C; a verificação termométrica fazia-se, diariamente, às 10 horas da manhã. A aureomicina adaptada à via parenteral e por nós utilizada proveio do lote 4474.134. A administração fazia-se por via subcutânea, diluindo-se o antibiótico, no momento de usá-lo, em solução aquosa de cloridrato de procaína a 1%. Realizamos cinco experiências, sendo que, nas quatro primeiras, empregamos lotes de dez cobaias e na quinta experiência, trinta cobaias divididas em três lotes de dez. Constatava-se a virulência das rickettsias inoculadas e a inocuidade do antibiótico, mediante o emprêgo de lotes testemunhas. Na primeira experiência, inoculavam-se rickettsias e, ao mesmo tempo, injetavam-se, dois miligramos de aureomicina, sendo esta dose repetida, diariamente, sete dias. Na segunda experiência, inoculadas as cobais, esperava-se que o período febril completasse 72 horas, injetando-se, diariamente, a partir de então, dois miligramos de aureomicina, durante 3 dias. Na terceira, aguardava-se também que a reação febril completasse 3 dias para injetar-se aureomicina, desta vez na dose única de dez miligramos. Na quarta, injetamos dose única de dez miligramos do antibiótico, ao mesmo tempo que rickettsias eram inoculadas. Finalmente, na quinta experiência, os animais dos três lotes, infectados concomitantemente, eram tratados com injeções de aureomicina somente quando apresentavam temperatura superior a 39,6.°C, sendo de meio, um e dois miligramos, respectivamente, as doses do antibiótico, usadas individualmente no primeiro, segundo e terceiro lotes.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Primeira experiência — Com a inoculação concomitante de rickettsias e aureomicina, não houve aparecimento de sintomas de febre maculosa nas cobaias. Esse resultado era de esperar-se, aliás, pois esta experiência reproduziu o que fizeram ANIGSTEIN e colab. (1948).

Segunda experiência — Verificamos queda imediata da curva térmica, na maioria quase absoluta dos animais; persistência definitiva da cura.

Terceira experiência — A dosagem única de dez miligramos foi inteiramente satisfatória para debelar, completamente, a infecção.

Quarta experiência — Verificou-se que algumas cobaias não foram protegidas, porquanto em três delas manifestou-se a infecção; contudo, nessas cobaias, o período de incubação foi muito aumentado.

Quinta experiência — O tratamento individual das cobais, isto é, a administração de injeções de meio, um e dois miligramos de aureomicina por cobaia, conforme o lote, somente quando a temperatura ultrapassava

de 39,6.°C, permitiu atenuar-se a infecção com ponderável número de sobrevividas. Em algumas cobaias, a cura procedeu-se com doses muito pequenas de antibiótico. Não obstante a sobrevivência ter sido maior no lote tratado com a maior dose, os resultados, parece-nos, foram, de um modo geral, iguais.

Para servir de contróle da atividade antibiótica da aureomicina após sua adaptação à via parenteral, utilizamo-nos também, obedecendo às mesmas normas de experimentação, da aureomicina, tal qual é distribuída para uso oral, em injeções subcutâneas, depois de dissolvida com novocaína a 1%. Apesar dos efeitos desagradáveis que as injeções ocasionam, essa apreciação torna-se possível em virtude da rapidez com que age o antibiótico na febre maculosa experimental em cobaias, provocada por rickettsias altamente virulentas, como as que foram por nós usadas.

Diante dos resultados obtidos experimentalmente, no laboratório, confirmados, posteriormente, na clínica, com o tratamento de seres humanos padecendo de febre maculosa, julgamos que é possível tornar a aureomicina injetável, seja por via subcutânea, seja por via intramuscular, sem que fique prejudicada sua ação anti-rickettsiana.

RESUMO

Nos trabalhos experimentais em que se utilizam cobaias, a administração parenteral dos medicamentos é a via que mais comodidade e segurança oferece. O emprêgo da aureomicina, por essa via, acarreta certos prejuízos e inconvenientes que a contra-indicam.

Entretanto, o antibiótico destinado, originariamente, à via enteral, após processo de adaptação feito pelos autores, permitiu tornar a via parenteral perfeitamente utilizável, afastando reações indesejáveis.

Empregando dose única ou dose fracionada, foi-lhes possível, assim, mostrar a eficiência preventiva ou curativa da aureomicina adaptada ao uso parenteral, sôbre a febre maculosa experimental em cobaias, infectadas com rickettsias isoladas em São Paulo.

SUMMARY

In experimental works on guinea-pigs, it is the parenteral administration of drugs which offers most commodity and security. The use of aureomycin by this route has certain disadvantages and inconveniences which do not recommend it.

The adaptation made by the authors, however, of the antibiotic which was originally destined for enteral application, permitted the perfect utilization of the parenteral route, by eliminating undesirable reactions.

By applying a single or fractioned dose they were able to show the preventive or curative efficacy of aureomycin, after adaptation to parenteral use on experimental spotted fever in guinea-pigs which had been infected with rickettsias isolated in São Paulo.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei experimentellen Arbeiten, bei welchen man gewöhnlich Meerschweinchen benützt, wird der parenterale Weg wegen Sicherheit und Leichtigkeit bei allen Medikamenten vorgezogen. Die Anwendung jedoch des Aureomyzins auf diesem Wege, zeigt gewisse Nachteile, so dass dieser Introduktionsweg hier nicht zu empfehlen ist.

Es ist deshalb zu begrüßen, dass die Verfasser das Aureomysin so verwandeln konnten, dass dieses Medikament, das bisher durch den Mund verabreicht wurde, nun ebenfalls parenteral eingespritzt werden kann, ohne dass irgendwelche unerwünschte Nebenwirkungen auftreten.

Mit diesem neu adaptierten Aureomyzin in einer einzigen Einspritzung oder in mehreren fraktionierten Dosen konnten die Verfasser die preventive oder die kurative Wirkung des Aureomyzins gegen das Rocky Mountain Spotted Fever bei Meerschweinchen, angesteckt mit Rickettsien, welche in São Paulo isoliert wurden, feststellen.

L'ACTION DE L'AURÉOMICINE DANS LA FIÈVRE MACULEUSE EXPÉRIMENTALE DES COBAYES.

Son activité, après l'adaptation à la voie parentérale, sur des rickettsies
isolées à São Paulo

pour

J. J. DE MACEDO

De l'Institut Butantan

C. HABERBECK BRANDÃO

et

E. LEMOS MONTEIRO

De l'Institut Adolfo Lutz

On sait que l'auréomycine est l'antibiotique de choix pour le traitement des rickettsioses, comme l'ont démontré les travaux de WONG et COX (1948), ANIGSTEIN et colab. (1948), SCHOENBACH et colab. (1948), DOWLING et colab. (1948) et LENNETTE et colab. (1948). Nous avons cherché à démontrer l'action de cet antibiotique dans la fièvre maculeuse expérimentale sur des cobayes infectées avec des rickettsies isolées à São Paulo, étant donné qu'on connaît leur identité antigénique avec les rickettsies que occasionnent, aux États-Unis, la fièvre maculeuse des Montagnes Rocheuses.

Dans les travaux expérimentaux où l'on emploie des cobayes, la voie parentérale est celle que offre le plus en commodité et de sécurité pour l'administration de médicaments. Cependant, l'emploi de l'auréomycine, par cette voie, présente certains inconvénients tels que des phénomènes locaux accentués, amenant parfois une nécrose, ce que la contre-indique, comme cela a été signalé par un grand nombre d'auteurs en différents travaux : HARNE et colab., COLLINS et colab., DOWLING et colab., BRYER et colab., SCHOENBACH et colab. et LENNETTE et colab. (1948).

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nous avons utilisé des cobayes pesant approximativement 500 g; la souche de rickettsies employée a été celle connue sous le nom de "Cupecé," isolée près de la Capitale de São Paulo, très virulente pour les cobayes. Les inoculations infectantes ont été faites par voie intrapéritonéale, à la dose de 1 ml de sang, recueilli par ponction cardiaque de cobayes ayant eu 3 jours de réaction fébrile. On a considéré fièvre une température supérieure à 39,6°C; la vérification thermométrique a été faite chaque jour à

10 heures du matin. L'auréomycine adaptée à la voie parentérale, utilisée par nous, provenait du lot 4474.134. L'administration a été faite par voie sub-cutanée, en diluant l'antibiotique au moment de l'emploi, dans une solution aqueuse de chlorhydrate de procaine à 1%. Nous avons réalisé cinq expériences; pour les quatre premières, nous avons employé lots de 10 cobayes et pour la cinquième expérience, trente cobayes divisées en trois lots de dix. On a constaté la virulence des rickettsies inoculées et l'inocuité de l'antibiotique au moyen de lots-témoins. Dans la première expérience, on a inoculé des rickettsies et, en même temps, on a injecté deux milligrammes d'auréomycine, cette dose ayant été répétée journalièrement pendant sept jours. Dans la deuxième expérience, après avoir inoculé les cobayes, on a attendu que la période fébrile atteigne 72 heures, en injectant alors, à partir de ce moment, deux milligrammes d'auréomycine, chaque jour, pendant 3 jours. Dans la troisième expérience, on a attendu également que la réaction fébrile atteigne 3 jour pour injecter l'auréomycine, cette fois en une dose unique de 10 milligrammes. Dans la quatrième expérience, on a injecté une dose unique de 10 milligrammes d'antibiotique en même temps que les rickettsies étaient inoculées. Finalement, dans la cinquième expérience, les animaux des trois lots, infectés en même temps, étaient traités avec des injections d'auréomycine que lorsqu'ils présentaient une température supérieure à 39,6°C, les doses d'antibiotique utilisées individuellement étant, respectivement, de 0,5, 1,0 et 2,0 milligrammes pour le premier, le second et le 3^{ème}. lot.

RÉSULTAS ET COMMENTAIRES

Première expérience — Avec l'inoculation concomitante de rickettsies et d'auréomycine, il n'y a pas eu d'apparition de symptômes de fièvre maculeuse sur les cobayes. Ce résultat n'avait rien de surprenant puisqu'il était la répétition de l'expérience qu'avaient faite ANIGSTEIN et colab. (1948).

Deuxième expérience — Nous avons constaté une chute immédiate de la courbe thermique, pour la majorité presque absolue des animaux; persistance définitive de la guérison.

Troisième expérience — La dose unique de 10 milligrammes a été entièrement satisfaisante pour enrayer complètement l'infection.

Quatrième expérience — On a constaté que quelques cobayes n'ont pas été protégés puisque, sur trois d'entre eux, l'infection s'est manifestée; néanmoins, la période d'incubation a été très augmentée.

Cinquième expérience — Le traitement individuel des cobayes, c'est-à-dire, l'administration d'injections de 0,5, 1,0 ou 2,0 milligrammes d'auréomycine par cobayes, selon le lot, seulement lorsque la température dépassait 39,6°C, a permis d'atténuer l'infection avec un nombre appréciable de survies. Pour quelques cobayes, la guérison s'est opérée avec des doses très petites d'antibiotique. Bien que la survivance ait été plus grande dans le lot traité avec la plus grande dose, il nous semble qu'en général les résultats ont été identiques.

Comme contrôle de l'activité antibiotique de l'auréomycine après son adaptation à la voie parentérale, nous avons utilisé également, en observant les mêmes normes d'expérimentation, l'auréomycine telle qu'elle est dis-

tribuée pour l'usage oral, en injections sub-cutanées, dissoute avec novocaine à 1%. Malgré les effets désagréables que les injections occasionnent, cette appréciation est possible étant donné la rapidité avec laquelle agit l'antibiotique dans la fièvre maculeuse expérimentale sur les cobayes, provoquée par des rickettsies très virulentes comme celles que nous avons utilisées.

Devant les résultats obtenus expérimentalement au laboratoire, confirmés postérieurement dans la clinique, avec le traitement d'êtres humains souffrant de la fièvre maculeuse, nous estimons qu'il est possible de rendre l'aureomycine injectable, soit par voie sub-cutanée, soit par voie intramusculaire, sans que son action anti-rickettsienne en soufre.

BIBLIOGRAFIA

- ANIGSTEIN, L., D. M. WHITNEY e J. BENINSON — 1948 — Aureomycin — A new antibiotic with antirickettsial properties: its effects on experimental spotted fever and epidemic typhus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 306-317.
- DRYER, M. S., E. B. SCHOENBACH, E. A. BLISS e C. A. CHANDLER — 1948 — Treatment of experimental infections with aureomycin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 254-266.
- COLLINS, H. S., T. F. PAINE e M. FINLAND — 1948 — Clinical studies with aureomycin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 231-240.
- DOWLING, H. F., M. H. LEPPER, L. K. SWEET e R. L. BRICKHOUSE — 1948 — Studies on serum concentrations in human and preliminary observations on the treatment of human infections with aureomycin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 241-245.
- HARNED, B. K., R. W. CUNNINGHAM, M. C. CLARK, R. COSGROVE, C. H. HINE, WM. McCAULEY, E. STOKEY, R. E. VESSEY, N. N. YUDA e Y. SUBBAROW — 1948 — The pharmacology of duomycin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 182-210.
- LENNETTE, E. H., G. MEIKLEJOHN e H. M. THELEN — 1948 — Treatment of Q fever in man with aureomycin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 331-342.
- SCHOENBACH, E. B., S. BRYER MORTON e PERRIN H. LONG — 1948 — The pharmacology and clinical trial of aureomycin: a preliminary report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 267-279.
- TOLEDO PIZA, J., J. J. MACEDO, E. LEMOS MONTEIRO, C. H. BRANDÃO e L. P. BARRETO NETO — 1950 — Associação da aureomicina utilizada por via muscular e da cloromicetina por via oral, no tratamento da febre maculosa. Considerações sobre os resultados obtidos pelo emprêgo da aureomicina purificada para utilização parenteral. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 10: 35-48.
- WONG, SAN C. e HERALD R. COX — 1948 — Action of aureomycin against experimental rickettsial and viral infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 290-305.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY

Introduction	1
Chapter I	15
Chapter II	35
Chapter III	55
Chapter IV	75
Chapter V	95
Chapter VI	115
Chapter VII	135
Chapter VIII	155
Chapter IX	175
Chapter X	195
Chapter XI	215
Chapter XII	235
Chapter XIII	255
Chapter XIV	275
Chapter XV	295
Chapter XVI	315
Chapter XVII	335
Chapter XVIII	355
Chapter XIX	375
Chapter XX	395
Chapter XXI	415
Chapter XXII	435
Chapter XXIII	455
Chapter XXIV	475
Chapter XXV	495
Chapter XXVI	515
Chapter XXVII	535
Chapter XXVIII	555
Chapter XXIX	575
Chapter XXX	595
Chapter XXXI	615
Chapter XXXII	635
Chapter XXXIII	655
Chapter XXXIV	675
Chapter XXXV	695
Chapter XXXVI	715
Chapter XXXVII	735
Chapter XXXVIII	755
Chapter XXXIX	775
Chapter XL	795
Chapter XLI	815
Chapter XLII	835
Chapter XLIII	855
Chapter XLIV	875
Chapter XLV	895
Chapter XLVI	915
Chapter XLVII	935
Chapter XLVIII	955
Chapter XLIX	975
Chapter L	995

MENINGITE PNEUMOCÓCICA EM NATI-MORTO

NOTA PRÉVIA

por

CARLOS TOLEDO FLEURY

e

A. FRANCIA MARTINS

Do Instituto Adolfo Lutz

No dia 18-9-51, apareceu, na Secção de Necropsias do Instituto Adolpho Lutz, enviado pelo Serviço de Verificação de Óbitos, o cadáver do natimorto S. S. 32.946, com idade de 9 meses intra-uterina, filho de Sebastião e Tereza da Silva Coelho, domiciliados à Rua Circular n.º33, Vila Aurora, nesta Capital.

O exame anátomo-patológico I. A. Lutz A962 revelou: pêso 2.600 g. O exame do fêmur revelou que o feto tinha nascido a termo, pois o núcleo ósseo de Beclard estava presente. Não encontramos osteocondrite. Ao abriremos a calota, notamos espesso pus cremoso cobrindo todo o encéfalo, sendo maior a espessura na convexidade do cérebro. Fizemos exame bacterioscópico e notamos a presença de diplococos Gram-positivos; mandamos, à Secção de Meningite, material para cultura e identificação bacteriológica, que foi diagnosticado pelo Dr. Manoel de Britto e Silva como pneumococo (registro 55.101). Fixamos e fizemos preparações histológicas que foram diagnosticadas como meningite purulenta.

O exame dos outros órgãos não apresentou nada digno de nota, pelo que o atestado de óbito foi firmado como sendo causa da morte toxemia e doença meningite pneumocócica.

Movidos pelo interesse de elucidar o mecanismo de contaminação do feto, um de nós (Francia Martins) fez uma completa anamnese do caso, no domicílio da parturiente, tendo obtido os seguintes dados: a Sra. Tereza estava matriculada no Centro de Saúde de Santana, para tratamento anti-sifilítico, quando engravidou-se. A gestação processou-se normalmente, até 15 dias antes do parto, quando teve um processo pulmonar, com muita tosse, mas sem escarro hemoptóico.

O parto deu-se no domicílio, assistido somente por "curiosa". Primeiramente, nasceu vivo um menino, pesando 2.800 g, forte, tanto que estava se desenvolvendo muito bem, 20 dias depois do parto, quando o vimos pela última vez. Depois, nasceu morta a menina na qual fizemos a necropsia.

Pelo interesse que este caso apresenta quanto à circulação placentomaterna, voltaremos ao assunto, com maiores detalhes, oportunamente.