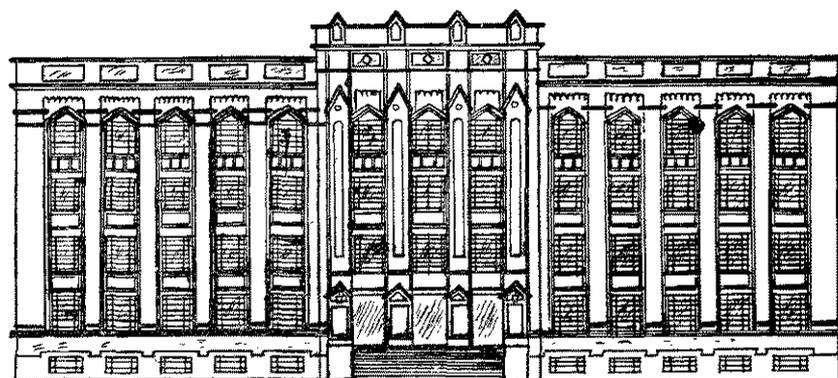


REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

VOLUME 20

1960

NÚMERO ÚNICO



INSTITUTO ADOLFO LUTZ
AV. DR. ARNALDO, 3

SÃO PAULO — BRASIL

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ aparece anualmente, em fascículos ou em um só volume, e tem como diretor o Dr. Ariosto Büller Souto, auxiliado por uma comissão de três membros, técnicos superiores do Instituto.

A correspondência referente à Revista deverá ser endereçada à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Caixa Postal 7.027, São Paulo, Brasil.

Comissão de redação:

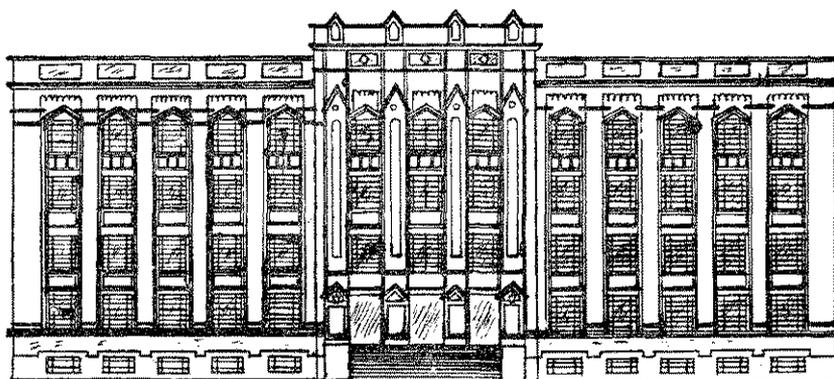
MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA
AUGUSTO DE E. TAUNAY
CÍCERO NEIVA

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

VOLUME 20

1960

NÚMERO ÚNICO



INSTITUTO ADOLFO LUTZ
AV. DR. ARNALDO, 3

SÃO PAULO – BRASIL

SUMÁRIO

	<i>Págs.</i>
RAYMUNDO MARTINS CASTRO — Prova da esporotriquina. Contribuição para seu estudo	5
J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR — O feijão comum. Taxinomia, morfologia, histologia, parasitologia, microbiologia, composição química e usos	83
J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR & BENTO AUGUSTO DE ALMEIDA BICUDO — Método de padronização e moagem do café	105
ALEXANDRE MELLO FILHO — O leite: colimetria, fosfatasimetria e contagem global. Considerações a respeito da detenção de irregularidades na linha de pasteurização do leite, pela utilização das provas colimétricas das diluições e concentrações crescentes	129
LUÍS DE SALLES GOMES — Sôbre um meio de cultura para o <i>Haemophilus ducreyi</i> . Alguns dados técnicos referentes ao isolamento desse bacilo	161
JAIR CORRÊA CARVALHO — <i>Mononchus (Cobbonchus) incultus</i>	177
JAIR CORRÊA CARVALHO — <i>Mononchus (Iotonchus) piracicuboides</i> n. sp.	181

PROVA DA ESPOROTRIQUINA. CONTRIBUIÇÃO PARA SEU ESTUDO (*)

RAYMUNDO MARTINS CASTRO (**)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A esporotricose é moléstia extremamente comum em nosso meio.

PUPPO (1920) já chamava a atenção para a freqüência com que ocorre essa micose em São Paulo, verificando naquela época que já eram conhecidos 76 casos no Serviço de Pele e Sífilis da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

SAMPAIO & colab. (1954) referem que 0,5% dos doentes que procuram o Ambulatório da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas são portadores de esporotricose.

A moléstia em sua manifestação típica e mais comum, isto é, a cutâneo-linfática, é bastante característica e não apresenta dificuldade para o seu diagnóstico. São, contudo, também bastante freqüentes formas clínicas outras, atípicas e que exigem para seu diagnóstico preciso e conseqüente terapêutica específica o emprêgo de recursos laboratoriais. A pesquisa direta do agente etiológico na lesão, apesar do progresso das técnicas micológicas, ainda é método pouco prático e inseguro. O melhor recurso para o diagnóstico da esporotricose, no laboratório, ainda é o cultivo do material da lesão, para isolamento do fungo. Este método não é infalível, pois é sabido que culturas negativas não invalidam o diagnóstico de esporotricose (DE BEURMANN, 1909; PUPPO, 1917). No decorrer

(*) Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Aprovada com distinção.

(**) Assistente — Instituto de Medicina Tropical — Departamento de Microbiologia e Imunologia (Dir.: Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz), e Médico — Instituto Adolfo Lutz — Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico (Dir.: Dr. Luís de Salles Gomes).

Recebido para publicação em 13 de abril de 1960.

das experimentações que serão expostas no presente trabalho tivemos, também, oportunidade de verificar que, várias vezes, apesar de cuidadosa técnica usada no exame, não foi possível obter o fungo em cultura. Esse fato, por si só, justifica, a nosso ver, o estudo de outras provas para o diagnóstico da esporotricose.

Há vários anos vimos estudando, sob orientação do Prof. Carlos da Silva Lacaz, a prova intradérmica com antígenos preparados a partir do *Sporotrichum schencki*,⁽¹⁾ prova conhecida na literatura médica com o nome de esporotricosina ou esporotriquina. Foram nossos propósitos primordiais nesse estudo:

- 1) avaliar, à base de experimentação suficientemente grande, o real valor dessa prova como método de diagnóstico da moléstia, dado que os trabalhos existentes na literatura são escassos, feitos com casuística pequena e, até certo ponto, discordantes;
- 2) contribuir para o melhor conhecimento da imuno-alergia desta micose, principalmente a questão da possibilidade da existência de "esporotricose-infecção".

O presente trabalho, como se depreenderá de sua leitura, é em sua maior parte dedicado ao estudo da reação à esporotriquina em pacientes portadores de esporotricose, atual ou pregressa, e isso deve-se ao fato de ter sido necessário o estudo de numerosos casos (66), para que pudéssemos padronizar os antígenos preparados. Inicialmente, tentamos fazê-lo em cobaios com esporotricose experimental e, mais recentemente, em ratos brancos. Ambos, em nossas mãos, deram resultados inseguros, motivo pelo qual foram abandonadas as tentativas de padronização em animais de laboratório.

MACKINNON & colab. (1953) chegaram a conclusões semelhantes, tentando padronizar a esporotriquina-filtrado em cobaios.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As referências existentes sobre a esporotriquina são escassas.

Os primeiros estudos datam do início deste século, sendo o assunto abordado com 3 técnicas distintas.

DE BEURMANN & GOUGEROT (*in* DE BEURMANN, 1909a) iniciaram seus estudos fazendo uma cutirreação, a qual foi abandonada

(1) Usaremos no presente trabalho a notação recomendada pelo Medical Research Council (1958).

por ter fornecido resultados duvidosos ou negativos, fato êsse confirmado por SICARD & GOUGEROT (1908).

Retomaram o assunto posteriormente, fazendo, não mais cutir-reação, mas sim intradermo-reação. A técnica e os resultados a que chegaram são extensamente discutidos em sua clássica monografia (DE BEURMANN & GOUGEROT, 1912).

CHOPIN (1910) estudou o assunto sob orientação dos dois Autores supracitados, tendo sido sua técnica de trabalho idêntica a de seus mestres.

Os antígenos usados por DE BEURMANN & GOUGEROT (1912) e por CHOPIN (1910) eram preparados filtrando culturas em fase filamentosa de *Sporotrichum schencki*, sendo o grau de concentração do mesmo avaliado por contagem dos esporos em hemátimetro. Expressam-na em cifras, 50, 100, 250, etc., as quais significam o número médio de esporos encontrados à contagem, nos retângulos do hemátimetro de MALLASSEZ.

Os resultados obtidos com a intradermo-reação são apresentados no trabalho de CHOPIN (1910) e referem-se à sua casuística, bem como às de DE BEURMANN, GOUGEROT & VERDUN, RAVAUT & VERDUN e GOUGEROT. Estudou 6 casos de esporotricose, sendo a reação positiva em todos. Em portadores de outras micoses, obteve reações positivas e negativas. Atribui as reações positivas à sensibilização cruzada com outros fungos. Particular importância é dada à presença de *Sporotrichum* e de leveduras vivendo saprofiticamente no trato digestivo, como agentes sensibilizantes à esporotriquina. Em pacientes portadores de afecções não micóticas, encontrou, se bem que raramente, reações positivas. Não apresenta nenhuma hipótese para interpretar o fato. Consta também da casuística de CHOPIN (1910) intradermo-reação negativa (repetida duas vezes) em indivíduo curado de esporotricose há 2 anos.

CHOPIN (1910) e também DE BEURMANN & GOUGEROT (1912) julgando o valor da intradermo-reação, como método de diagnóstico, crêem que somente a reação negativa tem valor, permitindo afastar o diagnóstico de esporotricose.

Ainda na França, o assunto foi estudado por PAUTRIER & LUTEMBACHER (1909, 1909a) os quais usaram como antígeno suspensão salina de cultura em fase filamentosa, mortos os germes por aquecimento a 110° C. O antígeno assim preparado era injetado na quantidade de 0,5 cm³ por via subcutânea. Nos indivíduos que

reagiram positivamente, notaram reação local, geral e focal. Com sua subcutirreação diagnosticaram esporotricose em paciente no qual as culturas haviam sido negativas (PAUTRIER & LUTEMBACHER, 1909a).

Após a prova, repetidas as sementeiras, foi, então, obtido o isolamento do fungo. É, sem dúvida, o primeiro caso registrado na literatura, no qual o diagnóstico de esporotricose foi feito por alérgo-reação. Nessa comunicação relatam também que, praticada a reação em 13 testemunhos, 11 nada apresentaram e 2 tiveram "reações esboçadas". O 14.º reagiu violentamente; é o que motivou a comunicação. Tinha o diagnóstico de lúpus, mas posteriormente revelou-se ser esporotricose. Nessa mesma comunicação, PAUTRIER & LUTEMBACHER (1909a) dizem pretender continuar seus estudos, tanto com a subcutirreação, como com a intradermo-reação. Ao que parece não prosseguiram suas investigações pois, pesquisas ulteriores desses Autores não foram por nós encontradas.

BERTIN & BRYANT (1910) referem reação positiva em caso de esporotricose gomosa devido à inoculação acidental de laboratório. Usaram antígeno isento de elementos figurados.

BLOCH em 1909, na Suíça, apresentou à Sociedade Médica de Basileia, observação de caso de esporotricose disseminada aguda, no qual obteve cutirreação positiva, observação essa que foi apresentada, em resumo, por DE BEURMANN & GOUGEROT (1909), na Sociedade Francesa da Dermatologia. A observação de BLOCH despertou interesse nos meios franceses, e foi após sua divulgação que DE BEURMANN & GOUGEROT (1909) iniciaram suas pesquisas e orientaram o trabalho de CHOPIN (1910).

Após a publicação da clássica monografia de DE BEURMANN & GOUGEROT (1912), o assunto caiu praticamente no esquecimento, não tendo aparecido, até 1947, na literatura, trabalhos que versassem sobre a reação. Encontramos, nesse período, quase somente referências a casos isolados de esporotricose no qual foram feitas reações à esporotriquina. Tais são entre outros, os de MOORE & DAVIS (1918), RAY & ROKWOOD (1942), SMITH (1945) e LEIBY & colab. (1945). Nesse período, existem somente referências isoladas à prova da esporotriquina, feita geralmente com o propósito de complementar observações clínicas.

DU TOIT (1942) ao relatar o extenso surto de esporotricose nas minas do Witwatersrand faz ligeira referência à esporotriquina, dizendo ser ela regularmente positiva nos casos de esporotricose.

Cita também que, num voluntário, propositadamente infetado, a reação foi positiva 5 dias após a infecção. Julga que uma reação negativa exclui o diagnóstico de esporotricose.

SMITH (1945) estudando 4 casos atípicos fez esporotriquina num dêles, com resultado positivo.

GELBER (1946) obteve reação positiva em caso de esporotricose do dedo indicador; SHAFFER & ZACKHEIM (1947) referem reação positiva, num caso, 5 meses após a cura.

GONZALEZ-OCHOA & SOTO FIGUEIROA (1947) publicam trabalho fundamental sôbre o assunto. Obtiveram substância de natureza polissacarídica, extraída de cultivos do *Sporotrichum schencki* em meio líquido e com êsse antígeno, diluído a 1/1.000, efetuaram provas intradérmicas e de precipitação. A prova cutânea foi feita em 18 casos de formas variadas de esporotricose, obtendo reações nitidamente positivas em 17 dêles. Num caso, de esporotricose generalizada, a prova foi negativa. Não verificaram reações positivas em outros casos, de afecções dermatológicas diversas, inclusive micoses outras (micetomas, cromomicose e dermatofitose). Concluem, com referência à reação cutânea, que a mesma parece ter valor diagnóstico em casos de esporotricose. GONZALEZ-OCHOA (1959) refere que em centenas de casos na qual a reação foi usada, mostrou-se específica e também que a positividade desaparece alguns meses após a cura. É largamente usada no México (LAVALLE, 1959).

JANKE (1948), num caso de esporotricose por *Sporotrichum gougeroti*, obteve reações negativas tanto com antígeno preparado com o fungo isolado do paciente, como com esporotriquina de *Sporotrichum schencki*.

LEIBY & colab. (1950), revendo os casos de esporotricose ocorridos no Estado de New York, relatam mais 2 casos nos quais fizeram a prova, sendo ela positiva. Nos comentários julgam que a reação é valioso recurso auxiliar no diagnóstico precoce, devendo ser empregada como complemento às culturas.

KATZENSTEIN (1950), estuda 2 casos de esporotricose nos quais foi feita reação com 4 antígenos, a saber: histoplasmina, blastomicetina, coccidioidina e esporotriquina. A esporotriquina foi positiva em ambos, sendo que num dêles foi também positiva a reação à blastomicetina. A esporotriquina em casos de outras micoses foi, na pequena série estudada, negativa.

LOEWENTHAL & colab. (1950) obtiveram reação positiva à esporotriquina num caso de esporotricose dermo-epidérmica. CONANT

(1950) estudando o diagnóstico de laboratório das micoses, julga que a prova é destituída de valor diagnóstico, opinião essa não emitida posteriormente (CONANT & colab., 1954).

THOMAS & colab. (1951), estudando 1 caso tratado por febre artificial, relatam que a prova com esporotriquina foi negativa e com "vacina" foi positiva. Não apresentam esclarecimentos sobre o que entendem por "vacina" e por esporotriquina. SHOEMAKER & colab. (1957) referem reação positiva num caso de leptomeningite por *Sporotrichum schencki*, usando como antígeno suspensão do fungo em sua fase filamentosa, preparado com amostra isolada do liquor do paciente; ARTHUR & ALBRITAIN (1958) registraram reação positiva num caso de esporotricose disseminada, utilizando o antígeno de GONZALEZ OCHOA; LATAPI & colab. (1959) mostram reação positiva, utilizando o mesmo antígeno num caso, tratado pela Griseofulvina.

WILSON (1959) fazendo apreciação sobre os testes intradérmicos nas micoses, refere-se à esporotriquina como prova de boa especificidade, muitas vezes útil para o diagnóstico.

Deixamos, propositadamente, para o final, a análise da literatura nacional sobre o assunto. Conquanto pouco citada no estrangeiro, nela encontramos vários trabalhos sobre o tema. Tomou êle desenvolvimento em nosso meio, em torno de 1949-1950, época na qual o Prof. Carlos da Silva Lacaz preparou numerosas partidas de esporotriquina, distribuindo-as a diversos dermatologistas e microbiologistas brasileiros, vários dos quais apresentaram e publicaram suas observações a respeito. SILVA & GONÇALVES (1950) estudaram 10 casos de esporotricose comprovados por cultura, sendo em todos a reação positiva. Num paciente, 1 ano após a cura clínica, a reação ainda se mostrava positiva. Fazendo, em portadores de esporotricose, provas com tricofitina e levedurina, obtiveram reações de grupo, sendo contudo notável a diferença entre a intensidade. Em 9 de 10 doentes a reação foi fortemente positiva (+++ ou mais o que, na notação dos Autores significa reação local com 25 ou mais mm) e num deles a reação foi positiva (++) , com reação local de 15-25 mm. Em portadores de outras micoses obtiveram 11 resultados negativos, 8 resultados fracamente positivos (+), reação local com 5-15 mm e 1 positivo (++) , reação local com 15-25 mm, o qual numa segunda prova passou a fortemente positiva (++++) , reação local de 35-50 mm. Interpretaram o fato como de alergia específica à esporotriquina, determinada por infecção anterior, reativada pela segunda prova.

Em 1953, a Sociedade Brasileira de Dermatologia e Sifilografia incluiu entre os temas oficiais de sua X Reunião Anual, a esporotricose. Foram então, apresentadas várias comunicações versando sobre a reação à esporotriquina.

LACAZ & colab. (1953) apresentaram à referida reunião o resultado de suas observações sobre a prova da esporotriquina.

Sendo êsse trabalho o mais extenso, com maior casuística, da literatura nacional, não tendo sido posteriormente publicado e também como o nosso é, até certo ponto, uma continuação do mesmo, julgamos útil e interessante resumi-lo.

LACAZ & colab. (1953) estudaram 3 tipos de antígeno, a saber: antígeno preparado a partir do *Sporotrichum schencki* em fase filamentosa; antígeno da fase leveduriforme ou em "naveta" e antígeno polissacarídico obtido segundo a técnica de GONZALEZ-OCHOA & SOTO FIGUEIROA (1947). Os dois primeiros tiveram sua concentração padronizada no tubo 5 da escala de Mac Farland. A técnica exata do preparo desses antígenos está exposta, com minúcia, no Capítulo II dêste trabalho, exceto a do polissacarídeo, em cujo preparo foram seguidas as indicações dos Autores.

Êsses antígenos foram experimentados em 65 casos de esporotricose em atividade, dos quais 58 haviam sido diagnosticados por isolamento do fungo; nos 7 restantes o diagnóstico foi clínico; em 2 houve tentativas de isolamento que resultaram negativas e nos outros 5, não. Em alguns casos foi feita injeção de um único tipo de antígeno, em outros concomitantemente de 2 ou de 3. O Quadro I resume a maneira como se distribuíram os pacientes em relação ao tipo de antígeno usado.

QUADRO I

ESPOROTRICOSE (N.º de casos)	F	N	F e N	Polissacarídeo associado a F e N
65	45	4	7	9

F = Antígeno de fase filamentosa

N = Antígeno de fase em naveta

Em todos, a prova foi positiva, as reações variando em intensidade, conforme descreveremos adiante. Em 2 casos obtiveram reações positivas com as esporotriquinas filamentosa e leveduriforme e negativa com o polissacarídeo.

Provas realizadas em pacientes portadores de outras micoses deram os resultados que se encontram no Quadro II.

QUADRO II

	TOTAL	PROVAS POSITIVAS	PROVAS NEGATIVAS
Blastomicose sul-americana .	27	6	21
Actinomicose	6	0	6
Cromomicose	2	1	1
Favo	2	0	0
Dermatofitose	1	1	0

Em todos êsses pacientes, a reação foi praticada com o antígeno de fase filamentosa, exceto 4 casos de blastomicose sul-americana nos quais foi feita, concomitantemente, a prova com os antígenos F e N. Nestes 4 casos a reação foi negativa com ambos.

Estudaram também a prova em portadores de afecções variadas e os resultados estão relacionados no Quadro III.

QUADRO III

	TOTAL	PROVAS POSITIVAS	PROVAS NEGATIVAS
Leishmaniose tegumentar ..	20	1	19
Ulcerações de etiologia di- versa, não micótica	4	1	3
Eczema	5	0	5
Ictiose	1	0	1
Elefantíase	2	0	2
Seborréia	2	0	2
Piodermite	1	0	1
Osteomielite	2	0	2
Dermite por hipostase	1	0	1
Lipóido-proteinose	1	0	1
Tuberculose verrucosa	2	0	2
Tuberculose ganglionar	1	0	1
Epitelioma	1	0	1
Lúpus vulgar	1	0	1
Paquidermite erisipelatosa crônica	1	0	1
Moléstia de Nicolas-Favre .	1	0	1
Mal perfurante plantar ...	1	1	0

Total de provas realizadas — 47

Provas negativas — 44

Provas positivas — 3

A reação com o antígeno N, em 24 indivíduos normais, foi negativa em 19 casos, duvidosa em 1, fracamente positiva em 3 e fortemente positiva em 1.

Seis pacientes curados de esporotricose foram estudados com os antígenos F e N e todos reagiram positivamente a ambos. O tempo de cura variou de 6 meses a 2 anos. Foram feitas, também, reações intradérmicas com solução de mertiolato a 1/10.000 por ser esse antisséptico empregado, nessa concentração, como diluente dos antígenos. Executadas 99 provas, resultaram tôdas negativas.

O critério de leitura da reação empregado por LACAZ & colab. (1953) é muito próximo ao que usamos, razão pela qual não o expomos aqui.

Finalmente, das conclusões a que chegaram os Autores naquela época, salientamos as seguintes, que julgamos as principais:

- 1) A esporotriquina filamentosa e em naveta constituem bons antígenos para o diagnóstico da esporotricose.
- 2) Reações de grupo podem ser observadas em outras micoses, sendo tais provas de intensidade menor que as registradas em casos de esporotricose.
- 3) A prova da esporotriquina com antígenos F e N parece ser superior à efetuada com o polissacarídeo.
- 4) A esporotriquina deve ser praticada principalmente nos casos de diagnóstico diferencial difícil, tais como esporotricose e leishmaniose, esporotricose e tuberculose verrucosa.
- 5) O preparo da esporotriquina abre possibilidades para o estudo de diversos problemas referentes à imunobiologia da esporotricose.
- 6) Novos estudos deverão ser feitos com a tentativa de melhor padronizar a esporotriquina.

Outras comunicações foram feitas como citamos a seguir.

GONÇALVES & CARVALHO (1954) estudaram o comportamento da prova em 33 portadores de esporotricose, 55 de outras micoses e em 94 de dermatoses diversas. Os portadores de esporotricose (atual ou pregressa) reagiram, de modo geral, fortemente à esporotriquina; não ocorreram reações negativas. Em portadores de micoses diversas, obtiveram reações positivas, geralmente fracas, em 27 pacientes e negativas em 28. Nos portadores de dermatoses

diversas, 35 reações foram positivas (fracamente) e 59 negativas. Efetuaram a reação em 3 pacientes curados de esporotricose (um há 1 mês e dois há 1 ano) sendo em todos, a reação positiva. Julgam que uma prova negativa parece excluir a possibilidade de esporotricose, sendo contudo limitado o valor da prova como meio de diagnóstico, devido à ocorrência de reações positivas em outras afecções.

GONÇALVES & CARVALHO (1954) fizeram seus estudos com antígenos preparados pelo Prof. Carlos da Silva Lacaz, a partir das fases filamentosa e leveduriforme do *Sporotrichum schencki*. Em pacientes nos quais fizeram a reação com os dois antígenos, não notaram diferenças significativas entre as respostas a um e outro.

PEREIRA (1955) trabalhou com o antígeno da mesma procedência, usando somente aquele preparado a partir da fase filamentosa; estudou 22 pacientes de esporotricose, 19 com a moléstia em atividade e 3 curados. Em todos, a reação foi positiva. Em 5 dos 19 pacientes a reação foi repetida após a cura, mantendo-se positiva. Obteve reações positivas em 2 portadores de levedurose e em 4 de dermatoses diversas. Conclui, julgando que a esporotriquina representa valioso recurso auxiliar no diagnóstico precoce dessa micose, embora não possa se sobrepor à cultura.

MIRANDA & colab. (1955, 1955a) estudaram também a reação à esporotriquina, focalizando-a, contudo, mais sobre outro aspecto. Notaram que, além de ser a reação francamente positiva em 13 casos, a injeção intradérmica do antígeno curou 5 doentes de esporotricose e auxiliou o tratamento num outro. Posteriormente, MIRANDA & colab. (1958) publicaram nova nota sobre o poder curativo da esporotriquina, acrescentando às cinco observações anteriormente apresentadas, mais três.

CASTRO (1956), estudando a esporotricose sob o ponto de vista dos erros de diagnóstico, assinala os bons préstimos da reação, para a qual propõe o nome de "Reação de Lacaz", no reconhecimento dos casos atípicos dessa micose. Ilustra sua exposição com casos clínicos que tinham o diagnóstico de carcinoma e que puderam rapidamente, em 48 horas, serem identificados como esporotricose, através da prova da esporotriquina.

Além desses trabalhos que versam primordialmente sobre a reação à esporotriquina há, também, na literatura nacional refe-

rências à prova como complemento de observações clínicas publicadas por diferentes Autores. Tais sejam: BAPTISTA & colab. (1951) citam prova positiva num caso em que observaram a ação terapêutica do Antimoniato de N-metil Glucamine; SOARES & colab. (1952) verificaram reações positivas em 3 casos de esporotricose familiar; BELLIBONI & PATRÍCIO (1956) em 2 casos tratados pelo Glucantime e BELLIBONI (1956) em 2 outros tratados pelo Dietilbestrol.

Nesta revisão julgamos desnecessária a inclusão de tôdas as citações existentes na literatura sôbre a prova da esporotriquina. Preocupamo-nos em analisar os trabalhos que versam primordialmente sôbre a prova. Os demais foram os que encontramos após pesquisa bibliográfica não exaustiva, e que nos pareceram por um motivo ou outro, dignos de citação.

Acreditamos, contudo, estar justificada a afirmativa feita inicialmente, isto é, de que a literatura sôbre a esporotriquina é escassa.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

A) PREPARO DOS ANTÍGENOS. PADRONIZAÇÃO

No decorrer dêste estudo, empregamos diferentes tipos de antígenos, isolados ou concomitantemente. Nas primeiras experiências, feitas com LACAZ & colab. (1953), foi usado antígeno preparado com a fase filamentosa do *Sporotrichum schencki*.

A técnica de preparo foi a seguinte:

- 1) cultivo de 5 amostras de *Sporotrichum schencki* em ágar-Sabouraud, mantidas as culturas à temperatura ambiente, até crescimento abundante;
- 2) suspensão homogênea, de raspado das culturas, em solução fisiológica com mertiolato a 1/10.000 e pérolas de vidro;
- 3) aquecimento a 60-70° C durante 30 minutos, em 3 dias sucessivos;
- 4) sedimentação da "suspensão-mãe", a fim de afastar os grumos mais grosseiros;
- 5) diluição da "suspensão-mãe" em solução fisiológica com mertiolato a 1/10.000, até o tubo 5 da escala de Mac Farland;

- 6) contrôle de esterilidade nos meios de Assis, Veillon e ágar-Sabouraud;
- 7) distribuição;
- 8) conservação em geladeira.

No preparo das primeiras partidas, a suspensão das colônias foi feita em solução fisiológica formulada a 8%; a suspensão era deixada à temperatura ambiente por 48 horas e posteriormente

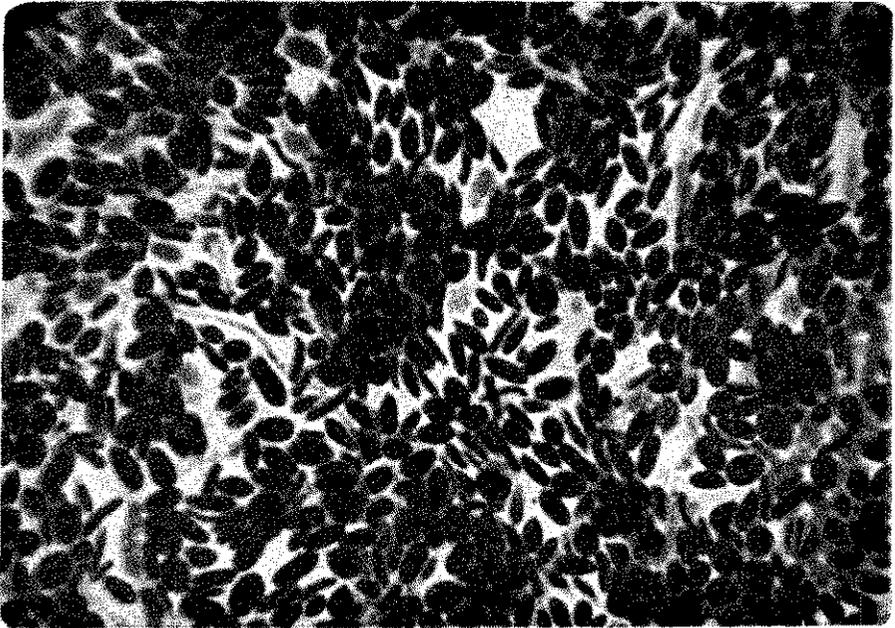


Fig. 1 — *Sporotrichum schencki*, formas em naveta. Notar, ao lado das células leveduriformes, elementos bacilares e raros filamentos. Microfoto Leitz 1.000 X. Coloração: método de Gram.

lavada 3 vezes por centrifugação. Só então era adicionado mercuriôto a 1/10.000 e padronizada.

Antígeno preparado dessa maneira, o qual denominamos de “esporotriquina F”, foi usado em numerosos pacientes, como já foi referido.

Posteriormente, do mesmo modo que outros Autores, procuramos obter antígeno no qual houvesse um mínimo possível de elementos filamentosos.

Essa preocupação de conseguir antígenos representados sobretudo por esporos, com um mínimo possível de filamentos, já é

encontrada em antigos trabalhos sôbre o assunto, tais como os de DE BEURMANN & GOUGEROT (1912) e MOORE & DAVIS (1918).

Visando conseguir o preparo de suspensões mais homogêneas do fungo, preparamos também antígeno obtido a partir da fase em naveta, do *Sporotrichum schencki*. A obtenção dessa variante é conseguida fâcilmente com o cultivo do fungo a 37° C, no meio de FRANCIS, conforme indicação de CAMPBELL (1945). Nossa experiência confirmou o exposto por aquela Autora, isto é, ser muito fâcil a transformação da fase filamentosa para a de naveta, com o uso do meio referido e tanto mais fâcil quanto mais recente fôr a cepa.

No decurso das experiências, verificamos que mantendo as amostras de *Sporotrichum schencki* em estufa, a 37° C, em ágar-Sabouraud, em repiques sucessivos, também se processa a variação da fase filamentosa em naveta. Diga-se de passagem que uma reversão total da forma filamentosa em naveta, nem sempre é obtida. Restam, às vêzes, alguns elementos filamentosos entre as primeiras (Fig. 1).

A preparação da "esporotriquina-naveta", a qual daqui por diante designaremos como esporotriquina N, foi feita do seguinte modo:

- 1) cultivo de 5 amostras de *Sporotrichum schencki* em ágar-Sabouraud ou em meio de FRANCIS, mantidos à temperatura de 37° C;
- 2) iniciado o crescimento, o que já se verifica após 48-96 horas, espriar as colônias, à custa da água de condensação do meio, com o propósito de permitir o crescimento mais abundante e difuso de cogumelo;
- 3) fazer esfregação de cada tubo, corando pelo Gram, a fim de verificar se a cultura está pura, encerrando as formas em naveta do *Sporotrichum schencki*;
- 4) suspensão em solução fisiológica com mertiolato a 1/10.000 das culturas obtidas;
- 5) aquecimento a 60-70° C, durante 30 minutos, em 3 dias sucessivos;
- 6) sedimentação da "suspensão-mãe", a fim de afastar os grumos mais grosseiros;

- 7) diluição da “suspensão-mãe” em solução fisiológica com mertiolato a 1/10.000, até o tubo 5 da escala de Mac Farland;
- 8) controle de esterilidade nos meios de Assis, Veillon e ágar-Sabouraud;
- 9) distribuição;
- 10) conservação em geladeira.

Após o estudo de LACAZ & colab. (1953), conquanto fôssem bastante concordantes os resultados obtidos com a “esporotriquina F” e a “esporotriquina N”, fixamo-nos neste último antígeno e procuramos melhor estudá-lo. A única desvantagem que notamos com o uso da “esporotriquina F” em relação à “esporotriquina N” (usadas na mesma concentração) é que pacientes nos quais era feita a prova com o antígeno F queixavam-se, com certa freqüência, de reações gerais, principalmente febre, cefaléia e mal-estar.

Procuramos estabelecer padronização mais precisa de nossos antígenos e trabalhamos com os mesmos, mais diluídos. Usamos para a padronização, o método espectrofotométrico. Nestas determinações fotocolorimétricas foi sempre usado espectrofotômetro Coleman Jr., modelo 6 A, sendo as leituras efetuadas contra solução salina com mertiolato a 1/10.000. A suspensão correspondendo ao tubo 5 da escala de Mac Farland mostrou no espectrofotômetro usado, num comprimento de onda de 450 m μ , transmissão de 56,0% ou seja, densidade óptica de 0,25. Usamos, também, o antígeno mais diluído. Assim, pois, o antígeno com densidade óptica 0,25 e T = 56% ($\lambda = 450$) foi diluído ao dôbro e ao quarto. A diluição da suspensão ao dôbro mostrou no espectrofotômetro ($\lambda = 450$) densidade óptica = 0,12 e T = 76%; a diluição quádrupla mostrou densidade óptica = 0,05 e T = 88%.

Para maior facilidade de exposição passaremos, nas páginas que se seguem, a designar o antígeno que no comprimento da onda 450 m μ mostrou densidade óptica 0,25 e T = 56% como N 1, ao que mostrou densidade óptica 0,12 e T = 76% de N 2 e ao de densidade óptica 0,05 e T = 88% de N 3. Mantivemos nesta experimentação a mesma concentração usada por LACAZ & colab. (1953) para compararmos com o antígeno que já tínhamos experimentado.

Outro antígeno utilizado foi um polissacarídeo preparado segundo a técnica de NORDÉN (1951), modificada por FAVA NETTO

(1955) para extração do polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. O preparo é feito da seguinte maneira:

- 1) cultivo de 5 amostras de *Sporotrichum schencki* em fase leveduriforme, apresentando crescimento abundante;
- 2) suspensão em solução fisiológica; caso não fique bem homogêneo, agitar no agitador de Kahn;
- 3) centrifugar o suficiente para que o sedimento deposite;
- 4) lavar 3 vezes em acetona; o volume de acetona é igual ao do sedimento;
- 5) lavar 3 vezes com éter; o volume de éter é igual ao do sedimento;
- 6) repousar 1 dia em geladeira, para evaporação total do éter;
- 7) suspensão em solução salina, na proporção de 15% em volume;
- 8) autoclavar a 120° C, durante 15 minutos;
- 9) centrifugar a 2.000 rotações por minuto, de 30 a 60 minutos.

O sobremadante constitui a substância rica em polissacarídeos e pobre em proteínas* o qual, após controle de esterilidade foi diluída a 1/100, 1/500 e 1/1.000 e usado como antígeno para prova intradérmica. Com esse antígeno, assim preparado nas três diluições referidas, foi feita a reação em 23 pacientes portadores de esporotricose, em 22 portadores de outras micoses e em 52 de afecções diversas ou sem afecção alguma.

Referir-nos-emos, daqui por diante, a este antígeno como esporotriquina P. Chamaremos de P 1, P 2 e P 3 as diluições de 1/100, 1/500 e 1/1.000, respectivamente.

B) TÉCNICA DA REAÇÃO

Usamos a técnica habitual para as reações intradérmicas, isto é, seringa tipo tuberculina e agulha de bisel curto. Injetamos 0,1 cm³ do antígeno intradérmicamente na face anterior do braço ou antebraço. A injeção de 0,1 cm³ determina, em seguida, a for-

(*) Verificações feitas na Secção de Imunoquímica do Depto. de Microbiologia e Imunologia, pelo Dr. R. G. Ferri. Dosagem de polissacarídeo pelo método de ROE (antrona) e de proteínas, pelo de LOWRY.

mação de uma pápula de 0,5-0,8 cm de diâmetro. Freqüentemente, forma-se logo após a injeção, halo eritematoso, reação essa inespecífica, sem importância. A leitura da reação é feita entre 48 e 72 horas após. Nos casos em que pudemos acompanhar a evolução diariamente, notamos que, já às 24 horas a reação é nítida, cresce em intensidade até o dia seguinte, mantendo-se por alguns dias (2 e 4) para involuir gradativamente.

Essas observações confirmam para a esporotriquina o que se observa em outras intradermo-reações com antígenos fúngicos, tais como a histoplasmina, a tricofitina, a coccidioidina, etc.

Adiante, voltaremos a descrever com maior minúcia a macro e a micromorfologia da reação, bem como a evolução que sofre.

C) CRITÉRIO DE LEITURA

Reações negativas — ausência de infiltração; eritema medindo menos que 5 mm.

Reações duvidosas — infiltração medindo menos que 5 mm no maior diâmetro, com ou sem eritema; somente eritema medindo mais que 5 mm.

Reações positivas — infiltração medindo 5 mm ou mais em seu maior diâmetro.

Com o propósito de permitir uma idéia sobre a intensidade das reações positivas, subdividimos estas da seguinte maneira:

Positiva — 1 + — infiltração maior que 5 mm e menor ou igual a 10 mm.

Positiva — 2 + — infiltração maior que 10 mm e menor ou igual a 20 mm.

Positiva — 3 + — infiltração maior que 20 mm e menor ou igual a 30 mm.

Positiva — 4 + — infiltração maior que 30 mm.

O critério usado é, em linhas gerais, semelhante ao proposto pelo "Department of Health, Education and Welfare of Public Health Service" (1954), para a reação à histoplasmina.

A diferença está nas subdivisões das reações positivas que fizemos e também porque no decorrer das experimentações verificamos que, as reações que pelo critério exposto deveriam ser classi-

ficadas como "duvidosas" não eram realmente duvidosas, mas sim destituídas de significado; passamos a classificá-las como negativas.

D) SELEÇÃO DOS PACIENTES

Os pacientes estudados no presente trabalho foram, em parte, propositadamente escolhidos, em parte, tomados ao acaso.

Entre os portadores de esporotricose foram incluídos somente aqueles em que foi possível isolar o *Sporotrichum schencki* e nos quais pudemos fazer a leitura da prova entre 48 e 72 horas. Deixamos, propositadamente, de incluir 7 casos de esporotricose dos quais não nos foi possível obter isolamento do fungo das lesões. Como pretendemos discutir o valor diagnóstico da prova, julgamos de bom alvitre não incluir esses casos por insuficiente documentação eitológica.

Os portadores de outras micoses, nos quais praticamos as reações, foram pacientes internados nas Clínicas Dermatológica e Sifiligráfica, de Doenças Tropicais e Infecciosas, e indivíduos que procuravam o Departamento de Microbiologia e Imunologia para esclarecimento diagnóstico.

Entre os pacientes diversos, incluímos aqueles com padecimento não micótico, internados nos mesmos Serviços já referidos e pessoas normais, sadias, funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia que concordaram em se submeter à prova.

E) BIÓPSIAS E TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Com o propósito de complementar o estudo da macromorfologia da reação, foi feito também o estudo das alterações microscópicas da pele, isto é, a histopatologia da reação à esporotriquina, tanto ao antígeno N como ao antígeno P.

Para esse estudo foram repetidas as condições da reação (0,1 cm³ por via intradérmica de antígenos N 2 ou P 1) em pacientes portadores de esporotricose.

As biópsias foram feitas em intervalos de tempo variáveis, como está especificado adiante nos Quadros IV e V, para ter-se uma idéia da seqüência evolutiva do processo histopatológico. Nos pacientes dos quais foi retirada uma única biópsia, foi ela executada na fase anterior do braço ou antebraço; daqueles em que houve retirada de 2 ou mais fragmentos foram as injeções do antígeno,

e posteriormente as biopsias, feitas na região dorsal. Tôdas foram praticadas sob anestesia local pelo cloreto de etila.

Para o estudo da reação ao antígeno N 2 foram executadas 18 biopsias em 12 pacientes e com relação ao antígeno P 1, 15 biopsias em 4 pacientes. Os fragmentos de pele retirados foram fixados em formol, incluídos em parafina e cortados. A coloração fundamental foi a hematoxilina-eosina. Quando julgadas necessárias, foram feitas outras, tais como a coloração de Hotchkiss-Mac Manus (PAS) e cresil-violeta.

QUADRO IV
BIOPSIAS DE REAÇÕES A ESPOROTRIQUINA N 2

Lâmina	Iniciais	Caso n.º	Tempo decorrido após a injeção do antígeno e a biopsia
4721	A. J. M.	31	6 horas
4722	A. J. M.	31	12 horas
4723	A. J. M.	31	24 horas
4724	A. J. M.	31	48 horas
4725	A. J. M.	31	72 horas
4574	A. R. G.	24	72 horas
4605	E. R.	33	5 dias
4691	B. S. N.	35	6 dias
4556	C. F. O.	22	7 dias
4726	A. J. M.	31	7 dias
4688	D. P.	34	8 dias
4610	P. R. S.	30	8 dias
A. B.	A. B.	7	8 dias
4607	A. J. M.	31	12 dias
4578	M. F. N.	—	12 dias
4591	J. A. C.	26	14 dias
4567	M. O. G.	—	14 dias
D. S.	D. S.	4	17 dias

OBSERVAÇÕES:

- 1) Os números das lâminas citadas correspondem aos recebidos pelas respectivas biopsias no laboratório de histopatologia da Clínica Dermatológica, onde foram executadas; aquelas designadas com iniciais correspondem a biopsias feitas no Departamento de Microbiologia e Imunologia.
- 2) As lâminas 4578 e 4567 correspondem a casos de esporotricose comprovados que não fazem parte de nossa casuística, por não ter sido feita leitura da reação entre 48 e 72 horas.

QUADRO V
BIOPSIAS DE REAÇÕES A ESPOROTRIQUINA P 1

Lâmina	Iniciais	Caso n.º	Tempo decorrido entre a injeção do antígeno e a biopsia
5234	J.D.	62	24 horas
5061	J.S.M.	55	24 horas
5184	J.C.G.	58	48 horas
5063	J.S.M.	55	48 horas
5271	R.F.S.	42	48 horas
5065	J.S.M.	55	72 horas
5180	J.C.G.	58	72 horas
5235	J.D.	62	4 dias
5272	R.F.S.	42	4 dias
5185	J.C.G.	58	5 dias
5273	R.F.S.	42	5 dias
5236	J.D.	62	6 dias
5274	R.F.S.	42	8 dias
5237	J.D.	62	9 dias
5275	R.F.S.	42	10 dias

CAPÍTULO III

RESULTADOS

A) EM DOENTES DE ESPOROTRICOSE, ATUAL OU PREGRESSA

Os pacientes de esporotricose, atual ou pregressa, foram divididos em 5 grupos, a saber:

- 1.º grupo — (18 casos) pacientes nos quais foi feita a reação com esporotriquina N 1, N 2 e N 3 (casos ns. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18).
- 2.º grupo — (21 casos) pacientes nos quais foi praticada a reação com esporotriquina N 2 e N 3 (casos ns. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 61).
- 3.º grupo — (26 casos) pacientes nos quais foi efetuada a reação com esporotriquina N 2 (casos ns. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64 e 65).

4.^o grupo — (23 casos) pacientes nos quais foi feita a reação com antígeno polissacarídico, preparado segundo técnica já descrita, diluído a 1/100, 1/500 e 1/1.000, além de reação com esporotriquina N (casos ns. 34, 39, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64 e 65).

É óbvio que este grupo é constituído por pacientes que fazem parte também dos outros, pois o antígeno polissacarídico foi sempre utilizado juntamente com um ou mais antígenos N. Todos os pacientes incluídos nestes 4 grupos eram portadores de esporotricose em atividade, o que foi demonstrado pelo isolamento do fungo das lesões.

5.^o grupo — (5 casos) pacientes nos quais foi feita a esporotriquina após a cura clínica do processo (casos ns. 2, 17, 23, 27 e 66).

Todos haviam tido esporotricose, confirmada por isolamento do fungo. A reação foi praticada em períodos variáveis de 3 meses até 7 anos, após a cura, conforme está especificado no Quadro X.

Os quadros seguintes resumem o que encontramos nos 5 grupos de pacientes estudados.

QUADRO VI

(GRUPO 1)

N 1	Positiva 1 +	0
	Positiva 2 +	7
	Positiva 3 +	3
	Positiva 4 +	8
	Negativa	0
N 2	Positiva 1 +	6
	Positiva 2 +	7
	Positiva 3 +	2
	Positiva 4 +	3
	Negativa	0
N 3	Positiva 1 +	14
	Positiva 2 +	2
	Positiva 3 +	1
	Positiva 4 +	1
	Negativa	0

QUADRO VII

(GRUPO 2)

N 2	Positiva 1 +	5
	Positiva 2 +	4
	Positiva 3 +	4
	Positiva 4 +	8
	Negativa	0

N 3	Positiva 1 +	7
	Positiva 2 +	7
	Positiva 3 +	3
	Positiva 4 +	3
	Negativa	1

QUADRO VIII

(GRUPO 3)

N 2	Positiva 1 +	6
	Positiva 2 +	8
	Positiva 3 +	3
	Positiva 4 +	8
	Negativa	1

QUADRO IX

(GRUPO 4)

P 1/100	Positiva 4 +	7
	Positiva 3 +	7
	Positiva 2 +	7
	Positiva 1 +	0
	Negativa	2

P 1/500	Positiva 4 +	1
	Positiva 3 +	6
	Positiva 2 +	7
	Positiva 1 +	5
	Negativa	4

P 1/1.000	Positiva 4 +	0
	Positiva 3 +	1
	Positiva 2 +	2
	Positiva 1 +	7
	Negativa	13

QUADRO X

(GRUPO 5)

CASO	TEMPO DE CURA	ESP. N	ESP. P
2	3 anos	N 2 — 2 +	P 1 — 4 + P 2 — 1 + P 3 — 1 +
17	3 meses	N 2 — 2 +	P 1 — 3 + P 2 — 2 + P 3 — 2 +
23	8 meses	N 2 — 3 +	P 1 — 3 + P 2 — 3 + P 3 — negativo
27	5 meses	N 2 — 2 +	P 1 — 2 + P 2 — 1 + P 3 — negativo
66	7 anos	N 1 — 4 + N 2 — 4 +	P 1 — 4 + P 2 — 4 + P 3 — 2 +

B) EM PORTADORES DE OUTRAS MICOSES

Foram estudados 25 pacientes portadores de outras micoses (casos ns. 67 a 91). Em todos a reação foi praticada com os antígenos N 1 e N 2 e em 22 dêles foi feita também com o antígeno polissacarídico nas diluições de 1/100, 1/500 e 1/1.000 (P 1, P 2 e P 3).

Os casos estudados distribuem-se da seguinte maneira:

Blastomicose sul-americana	13
Cromomicose	2
Actinomicose	1
Maduromicose	1
<i>Tinea corporis</i>	2
<i>Tinea capitis</i>	1
<i>Tinea pedis</i> (com Ide)	2
<i>Pityriasis versicolor</i>	1
Monilíase curada	2

A reação com antígeno polissacarídico não foi feita nos casos 71, 72 e 73, portadores respectivamente de blastomicose, cromomicose e *Tinea corporis* (*M. canis*).

A reação executada com o antígeno N foi positiva num caso de *Tinea corporis* (n.º 71) e num de blastomicose (n.º 78) com N 1 e negativa com N 2; foi positiva tanto com N 1 como com N 2 em 2 casos de blastomicose (casos 79 e 83), devendo-se referir que um deles (caso 83) apresentava também cisticercose; a reação foi positiva, também, em 2 portadores de *Tinea pedis*, tanto com N 1 como com N 2 (casos 82 e 87). Nos demais a reação foi negativa.

Com relação ao antígeno polissacarídico obtivemos os seguintes resultados: reação negativa em 19 casos e positiva em três. Êsses 3 pacientes haviam reagido também positivamente à esporotriquina N (casos 79, 82 e 87). O caso 79 reagiu positivamente só com o antígeno P 1; o caso 82 nas 3 diluições usadas e o 87 reagiu positivamente à reação feita com os antígenos P 1 e P 2.

Devemos salientar que um paciente com reação positiva ao antígeno N reagiu negativamente ao polissacarídeo (caso 83).

C) EM PACIENTES DIVERSOS

Foram estudados 58 indivíduos com afecções diversas, tomados ao acaso, sendo incluídos também alguns normais.

As afecções eram as seguintes: esquistossomose mansônica, forma hépato-esplênica, 8 casos, sendo que um deles apresentava também *herpes zoster*; leishmaniose tegumentar, 5 casos; tuberculose ganglionar, 3 casos; eczema, 3 casos; foliculite do couro cabeludo, 2 casos; síndrome de hipertensão portal sem etiologia determinada, 2 casos; úlcera inespecífica da perna, 2 casos; blefarite de etiologia indeterminada, 2 casos; carcinoma espinocelular da mão, tuberculose verrucosa, piodermite, osteomielite, eritema indurado de Bazin, piodermite vegetante, lepra tuberculóide, furunculose, moléstia de Chagas (forma crônica), retículo-endoteliose, *alopécia areata*, psoríase, lues terciária, eritema nodoso sem etiologia definida, parotidite e pancreatite de etiologia indeterminada, tuberculose ulcerosa da pele, líquen plano generalizado, paquidermia plicaturata com periostoses, foliculite da pele glabra, malária, doença de Hodgkin, erisipela, cisto sebáceo infetado e carcinoma basocelular, 1 caso de cada. A prova foi feita também em 3 indivíduos normais e em 3 cujas afecções não foram diagnosticadas.

A prova foi praticada em todos, com os antígenos N 1 e N 2 e em 54 dos 58 indivíduos também com o antígeno polissacarídico (P 1, P 2 e P 3).

A reação com o antígeno N 1 foi negativa em 49 indivíduos e positiva em 9 (casos 125, 126, 129, 133, 136, 138, 141, 143 e 144); com o antígeno N 2 foi negativa em 53 pacientes e positiva em 5 (casos 138, 141, 143, 144 e 147). Com relação ao antígeno polissacarídico tivemos os seguintes resultados: diluído a 1/100 foi a prova negativa em 49 pacientes e positiva em 5 (casos 133, 137, 141, 144 e 147); diluído a 1/500 foi negativa em 50 e positiva em 4 (casos 133, 137, 141 e 144); diluído a 1/1.000 foi negativa em 52 pacientes e positivo em 2 (casos 141 e 144).

D) MACROMORFOLOGIA DA REAÇÃO

As alterações locais, por nós observadas, como conseqüência à injeção intradérmica de esporotriquina, são semelhantes às assinaladas na literatura por Autores que estudaram o assunto. As alterações verificadas, à leitura de 48 e 72 horas, são de diferentes tipos, a saber: eritema, pápula edematosa, pápula, nódulo, tubérculo, vesícula e úlcera. Salvo no que se refere às pápulas edematosas, os demais tipos de alteração não aparecem isoladamente, mas sim combinados, dois ou mais elementos.

O aspecto mais freqüente observado na reação positiva à esporotriquina é representado por pápula central, circundada por halo eritematoso, mais ou menos infiltrado (Figs. 2, 3 e 4).

Nas reações intensamente positivas, notamos a formação de vesícula, pústula e ulceração central, já às 48-72 horas.

Em casos nos quais observamos a evolução da reação por tempo maior, verificamos que o halo eritematoso vai gradativamente se esmaecendo e desaparece num período de 1 a 2 semanas.

A pápula, a qual na leitura de 48 e 72 horas, na maioria dos casos, mostra-se com caráter edematoso, adquire por volta da primeira semana consistência mais firme, evoluindo posteriormente (segunda e terceira semanas) para tubérculo ou nódulo.

Ocorre freqüentemente nessa fase evolutiva, a neurose ou a evolução do nódulo para goma, com posterior ulceração e eliminação de seu conteúdo.

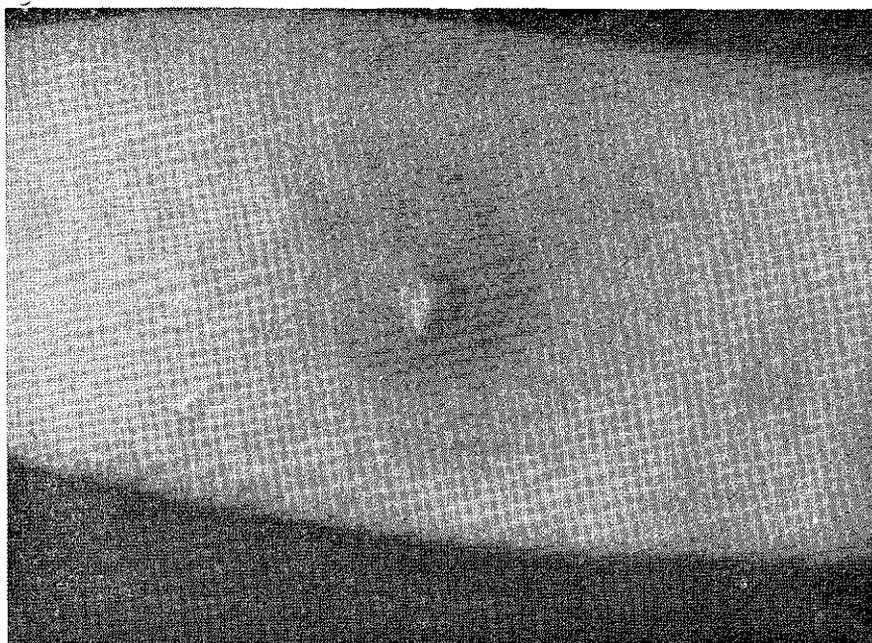


Fig. 2 — Intradermo-reação positiva à esporotriquina N 2.

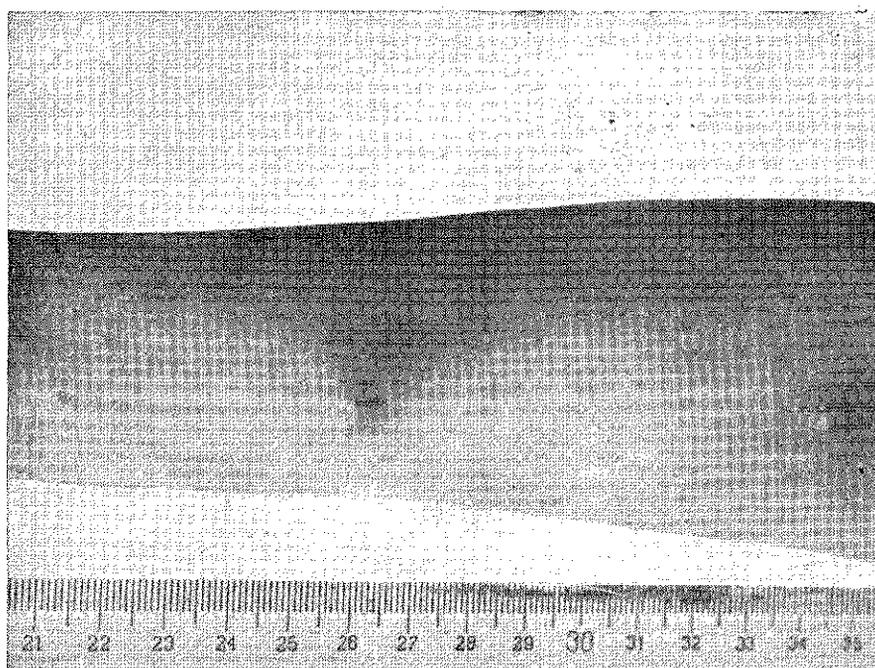


Fig. 3 — Intradermo-reação positiva aos antígenos N 2 (proximal) e N 3 (distal).

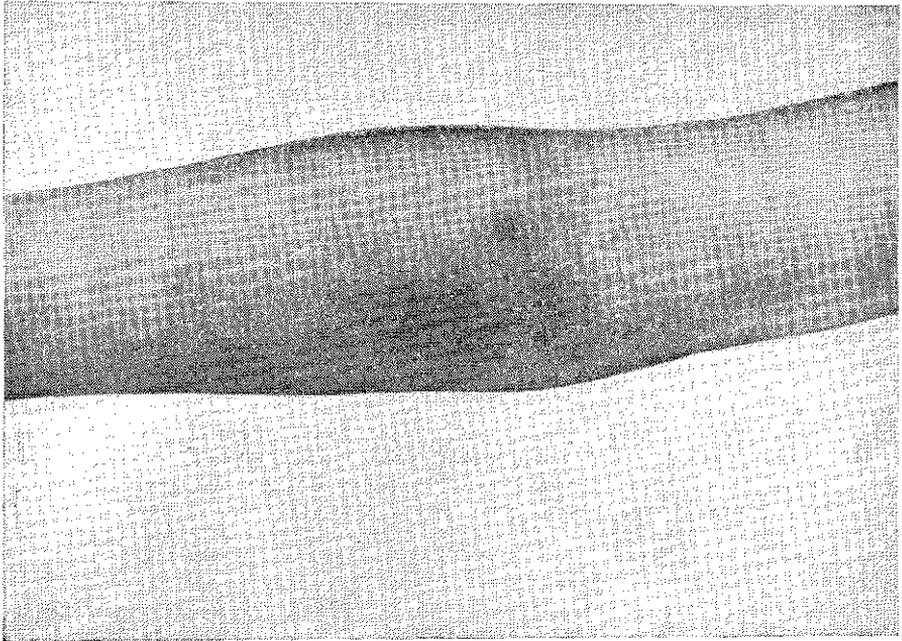


Fig. 4 — Intradermo-reação positiva aos antígenos P 1 (braço), P 2 (antebraço, proximal) e P 3 (antebraço, distal).

As reações fortemente positivas deixam ao final de sua evolução completa, a qual se faz igualmente, em tempo de 3 e 4 semanas, uma cicatriz, as vêzes hiperpigmentar.

O que observamos com referência às reações tardias à esporotriquina, confirma os dados anteriores assinalados por MIRANDA & colab. (1958).

Quanto às manifestações gerais, como consequência à injeção do antígeno, pudemos observar que as reações fortemente positivas são em alguns casos acompanhadas de sensação subjetiva de febre e ligeira cefaléia. Nunca foram, contudo, intensas como as descritas por PAUTRIER & LUTEMBACHER (1909, 1909a) com a sua subcutirreação.

Nos pacientes que estudamos, as manifestações gerais foram raramente observadas.

Nas reações feitas com o antígeno polissacarídico, as alterações locais observadas são menos nítidas que com o antígeno contendo elementos figurados.

As alterações locais, observadas nas reações feitas com antígeno polissacarídico à leitura de 48 e 72 horas, são menos evidentes.

Verificamos a formação de eritema, de pápula e, nas reações fortemente positivas também a formação de vesícula. A pápula edematosa foi em nossa experiência a mais freqüente, tradução macroscópica de reação positiva ao antígeno polissacarídico. Não observamos com este tipo de antígeno formação de tubérculo ou nódulo, quer à leitura de 48 e 72 horas, quer às leituras feitas em prazos maiores, como 1 semana ou 10 dias. A reação ao antígeno polissacarídico, mesmo quando fortemente positiva não deixa, de regra, sinal algum. Em poucos casos pudemos observar, em pacientes de pele clara, sucedendo à pápula edematosa, a formação de mancha hipercrômica, que persiste por algum tempo, desaparecendo depois.

Em alguns casos, principalmente em pacientes com pele escura, é bastante difícil a leitura da reação feita com o polissacarídeo, pois o eritema é pálido e a pápula pouco evidente, perceptível somente ao tato.

E) HISTOPATOLOGIA DA REAÇÃO

1) *Reação ao antígeno N 2*

Lesões após 6 horas (biopsia 4721) — Edema bem visível ao nível das papilas dérmicas, com afilamento do epitélio. Esse último não mostra alterações dignas de nota. Na derme, processo inflamatório, à custa, principalmente, de células histiocitárias de núcleos alongados, que se localizam principalmente junto aos capilares papilares e ao redor de anexos, como glândulas sebáceas. Percebemos também células histiocitárias carregadas de pigmento provavelmente melânico na periferia dos capilares.

Lesões após 12 horas (biopsia 4722) — Persistem as alterações para o lado da derme, anteriormente referidas. Agregam-se ao exsudato inflamatório perivascular e perianexial alguns neutrófilos. No mais, a reação persiste com as mesmas características.

Lesões após 24 horas (biopsia 4723) — Aspecto idêntico à biopsia anterior. O edema é menos acentuado.

Lesões após 48 horas (biopsia 4724) — O processo inflamatório é exatamente igual. Os neutrófilos tornam-se mais evidentes. Não se verificam eosinófilos. Junto à área de edema superficial, o colágeno assume aspecto que lembra muito a degeneração fibrinóide.

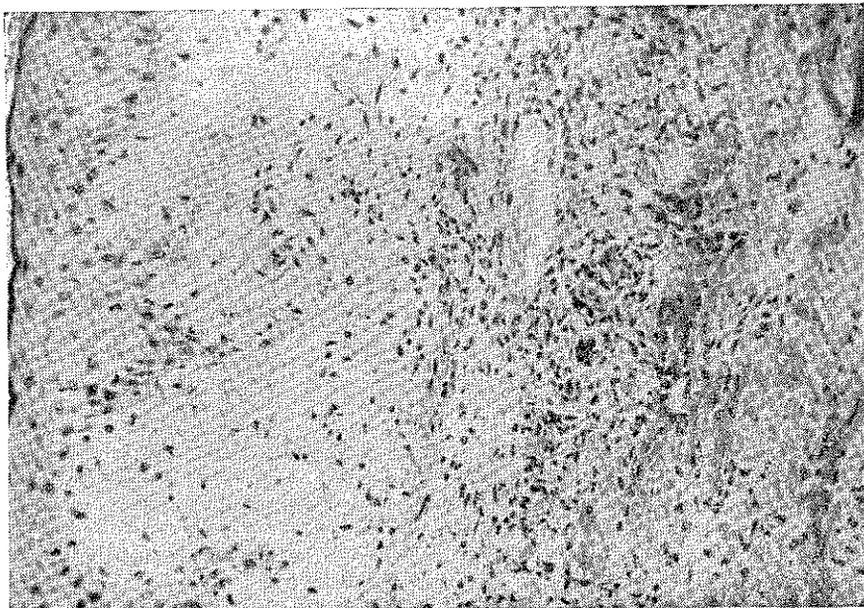


Fig. 5 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno N 2. Edema e infiltrado inflamatório em torno a pequenos vasos e anexos. Biopsia 4724 (48 horas). Microfoto Leitz. 300 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

Lesões após 72 horas (biopsia 4725 e 4574) — Mesmos achados anteriores, com formação de verdadeiro abscesso na derme, junto à glândula sebácea. O abscesso se propaga para as papilas dérmicas, com destaque parcial do epitélio, abaixo do qual se observa área hemorrágica. O processo também afeta a glândula sebácea, com destruição parcial da mesma. Observamos reação a neutrófilos e raros eosinófilos, do mesmo modo que células mononucleares e histiócitos, em torno a anexos e capilares da derme. Reação idêntica é vista acometendo a glândula sebácea, com acúmulo de material dentro da luz. Pequeno edema difuso da derme. Depósito de material “fibrinóide” na periferia da glândula sebácea. Aparentemente há propagação do processo até a desembocadura da glândula, dando origem a um início de abscesso intra-epidérmico.

Lesões após 5 dias (biopsia 4605) — Reação histiocitária e neutrófila em torno a pequenos vasos e anexos, ao lado de número razoável de eosinófilos, atingindo inclusive a hipoderme. Percebemos reação por parte dos pequenos capilares da pele, que exibem agora, de maneira nítida, tumefação de células endoteliais, inclusive com sinais de multiplicação das mesmas. O que caracterizou esta lâmina foi a proliferação de células histiocitárias, formando arranjo

epitelióide, dando origem a células gigantes tipo Langhans em torno de centro abscedado. Os cortes não demonstram se tal formação se dispõe junto a anexos. Existe também infiltração por fibrina

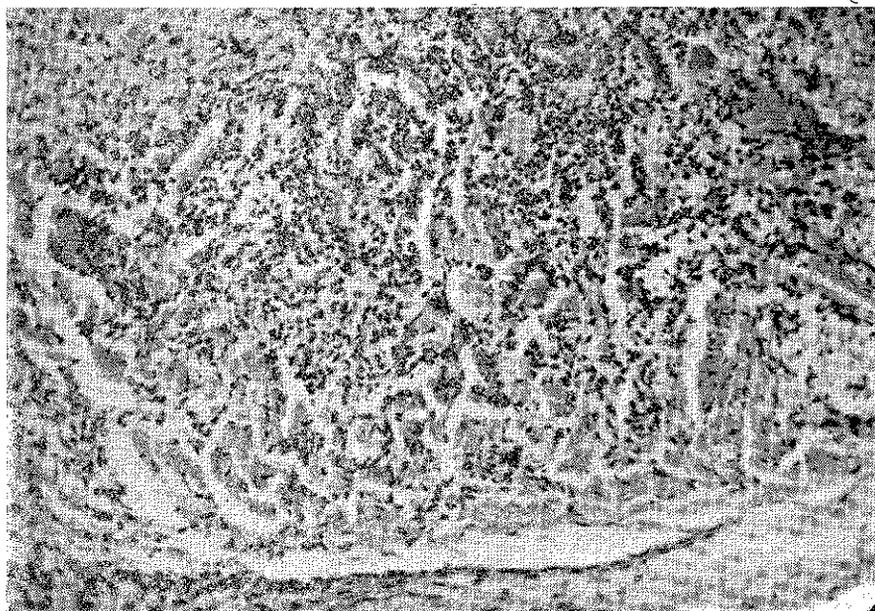


Fig. 6 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno N 2. Formação de abscesso na derme. Biopsia 4725 (72 horas). Microfoto Leitz. 300 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

em torno a pequenas áreas que, possivelmente, representam necrose de gordura.

Lesões após 6 dias (biopsia 4691) — Reação francamente produtiva. Não observamos eosinófilos ou neutrófilos em quantidade apreciável. Entretanto, verificamos extensa proliferação de caráter histiocitário, em torno a pequenos vasos e nas porções mais profundas da derme, dando origem inclusive à formação granulomatosa, com células gigantes tipo Langhans. Tais nódulos são vistos em torno a área de que parece ser degeneração do colágeno; o PAS é positivo nestas zonas.

Lesões após 7 dias (biopsia 4556 e 4726) — Muito evidente agora a dupla reação; processo inflamatório agudo, extenso, com predominância de formas degeneradas de neutrófilos, de mistura com eosinófilos. Percebe-se, ao lado disso, acentuada ulceração do epitélio. Pequenos capilares, com a parede parcialmente recoberta por material de aspecto fibrinóide. Concomitantemente verifi-

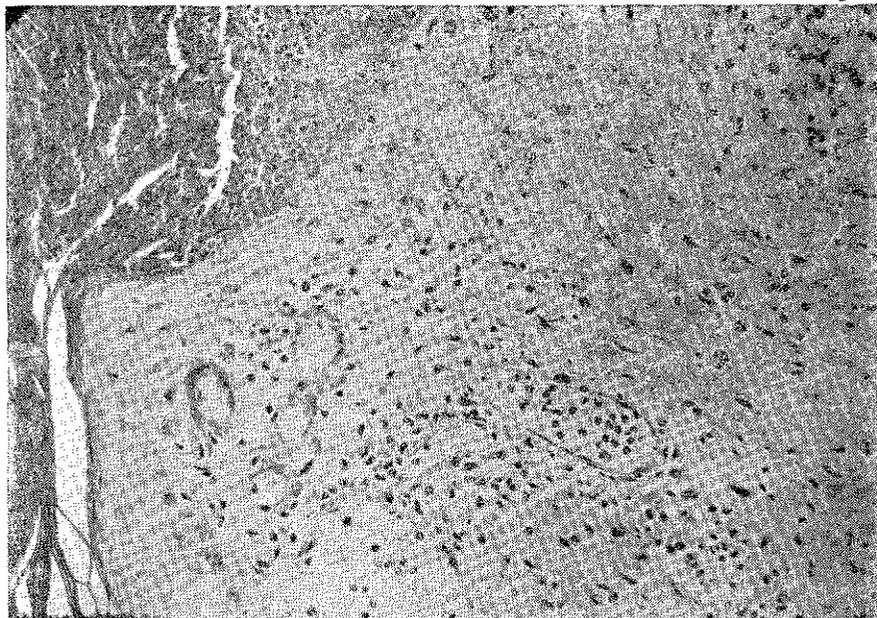


Fig. 7 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno N 2. Ulceração da pele. Capilar com depósito hialino na parede. Edema dérmico. Biopsia 4556 (7 dias). Microfoto Leitz. 300 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

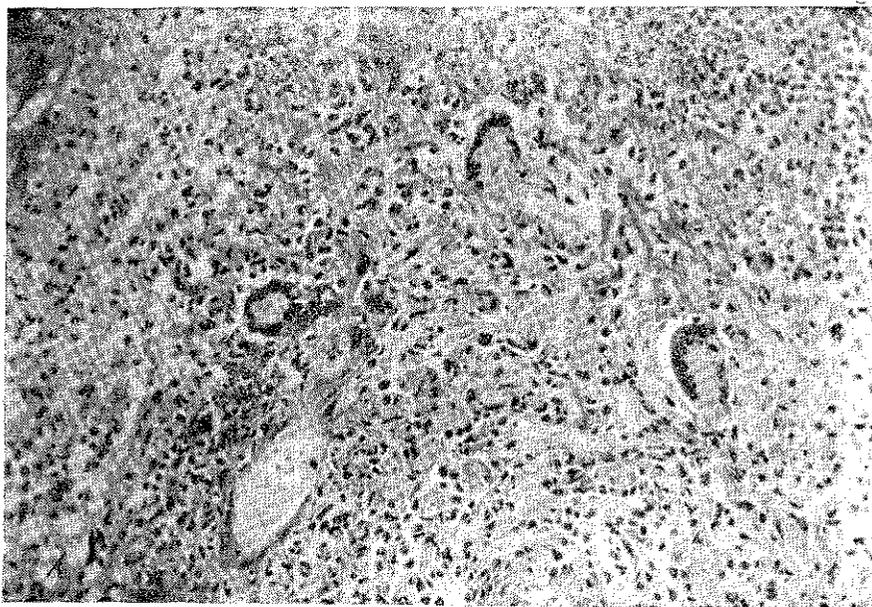


Fig. 8 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno N 2. Processo inflamatório crônico granulomatoso, ao lado de reação aguda. Neutrófilos em grande parte degenerados. Biopsia 4556 (7 dias). Microfoto Leitz. 300 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

camos processo produtivo, com formação de células gigantes tipo Langhans e corpo estranho, de mistura com o quadro inflamatório agudo. Na biopsia 4726 o processo inflamatório agudo domina, dando origem à extensa ulceração do epitélio. Observamos ainda processo inflamatório agudo com parcial destruição de glândulas sebáceas. O edema não é tão intenso e difuso, como nas lâminas anteriores.

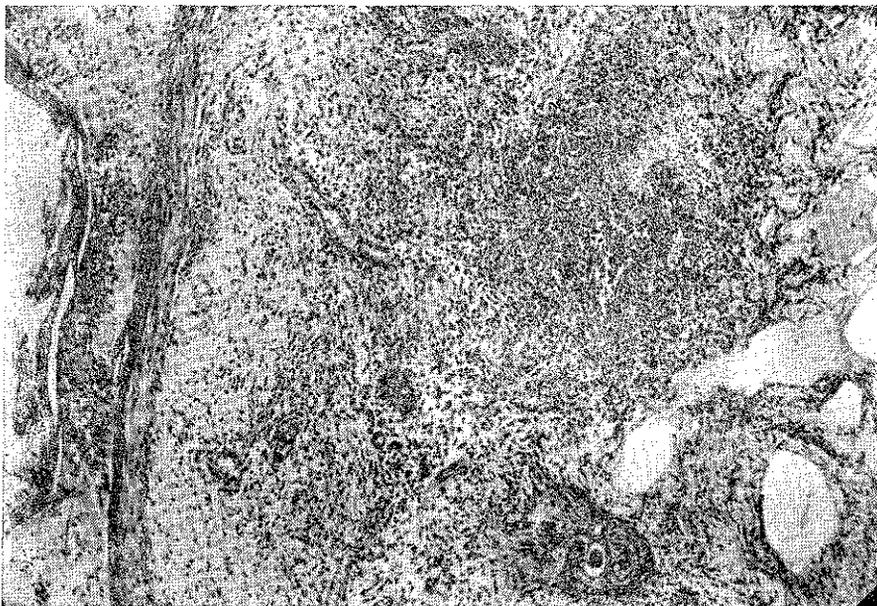


Fig. 9 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno N 2. Princípio de ulceração da epiderme. Abscesso na derme, ao lado de processo inflamatório crônico. Biopsia 4726 (7 dias). Microfoto Leitz, 100 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

Lesões após 8 dias — (biopsias 4688, 4610 e A.B.) — A biopsia 4688 mostra processo produtivo (histiocítico), dispondo-se em tórno a anexos e pequenos vasos, com eosinófilos de mistura. A biopsia A. B. mostra reação eminentemente exsudativa, com formação de abscessos e parcial destruição do epitélio. Já a biopsia 4610 revela processo exsudativo, com muitos neutrófilos e eosinófilos, ao lado de reação produtiva na periferia de pequenos vasos. Extensa ulceração do epitélio. Pequenos vasos com o revestimento endotelial proeminentes. É interessante notar arterite aguda, com depósito de material “fibrinóide” na parede. Como o processo está junto ao abscesso, é provável que se trate de reação secundária.

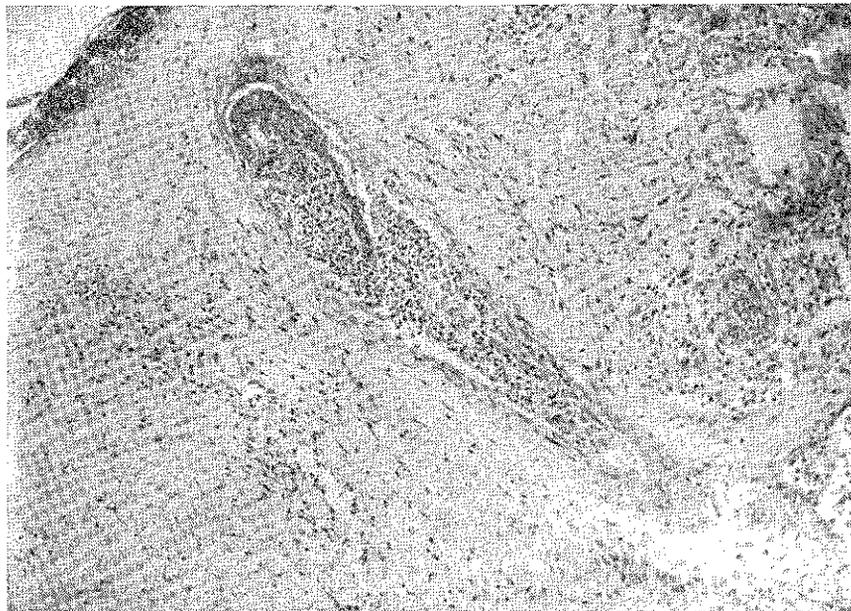


Fig. 10 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno N 2. Agressão de anexos da pele. Foliculite aguda. Biopsia 4610. Microfoto Leitz, 100 X. Coloração: hematoxilina-cosina.

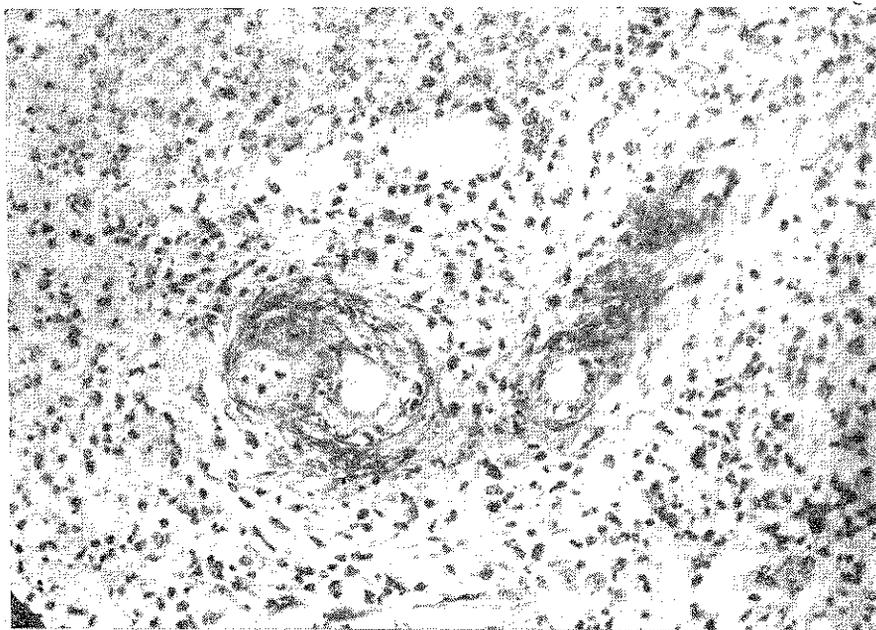


Fig. 11 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno N 2. Arterite aguda secundária ao processo inflamatório. Biopsia 4610 (8 dias). Coloração: hematoxilina-cosina.

Lesões após 12 dias (biopsias 4607 e 4578) — Na biopsia 4607 a reação é predominantemente exsudativa, com formação de abscessos e início de ulceração do epitélio. Reação produtiva na periferia, com células gigantes tipo corpo estranho. Predomina a reação exsudativa. Entretanto, a biopsia 4578 revela reação produtiva, com muitas células histiocitárias, eosinófilos e mononucleares em torno a pequenos vasos. São vistos ocasionais plasmócitos. O processo dispõe-se em torno de anexos também. Na profundidade, junto à hipoderme, pode ser vista reação produtiva, com formação de granuloma.

Lesões após 14 dias (biopsias 4591 e 4567) — Em ambas observamos reação produtiva em decréscimo, bem visível em torno a vasos. Epitélio e colágeno, nada digno de nota.

Lesões após 17 dias (D.S.) — Reação granulomatosa, com células gigantes tipo Langhans. Reação histiocitária com eosinófilos em torno a pequenos vasos. Ausência de lesões epiteliais.

2) REAÇÃO AO ANTÍGENO P 1

Lesões após 24 horas (biopsias 5234 e 5061) — Ambas mostram alterações bastante semelhantes, variando apenas a intensi-

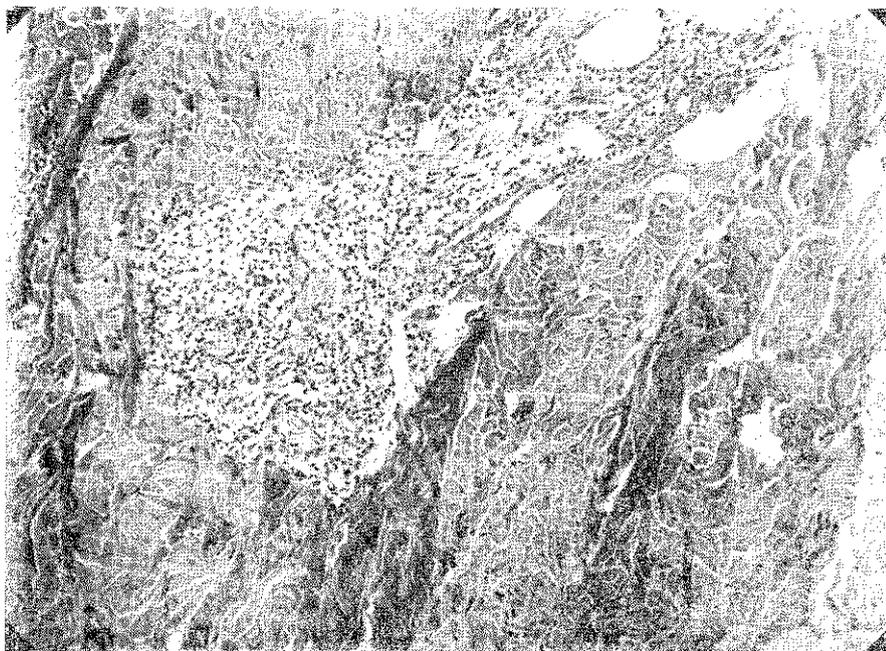


Fig. 12 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno P 1. Processo inflamatório subagudo, perivascular e perianaxial, acompanhado de edema. Biopsia 5234 (24 horas). Microfoto Leitz, 40 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

dade da reação. O epitélio mostra-se afilado pelo edema que faz quase desaparecer as cristas interpapilares. Exceto por leve edema intercelular, não há lesão das células epiteliais. A derme apresenta-se edemaciada, principalmente na sua porção papilar. O achado fundamental está representado por infiltrado inflamatório que se dispõe em tórno aos capilares sanguíneos e anexos, acompanhando-se de forte edema. Ele é constituído por eosinófilos, células histiocitárias de núcleo irregular, vesiculoso e pouco citoplasma. São também vistos neutrófilos em pequeno número. Os capilares mostram a parede edemaciada, sendo que as células endoteliais estão tumefeitas e proeminentes para a luz. Não há modificações do colágeno, exceto no ponto de penetração da agulha, onde se mostra mais acidófilo e denso, tendo, de permeio a suas fibras, moderado número de neutrófilos com sinais de desintegração nuclear.

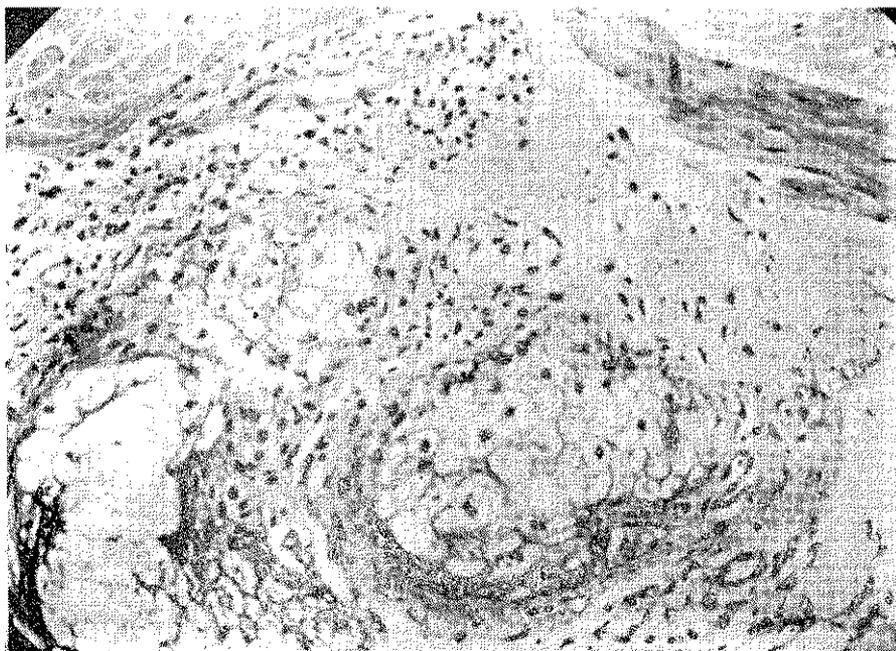


Fig. 13 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno P 1. Processo inflamatório crônico dispendo-se ao redor de glândula sebácea. Modificação do colágeno, que se apresenta uniformemente hialino junto ao anexo. Biopsia 5234. Microfoto Leitz, 400 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

Lesões após 48 horas (biopsias 5184, 5063 e 5271) — O processo é essencialmente o mesmo descrito para o grupo de biopsias anterior. A notar, temos o progressivo decréscimo do edema papilar e maior predominância de células histiocitárias no infiltrado

perivascular e perianexial. O edema a este nível ainda é bem visível, muito embora de pequena intensidade. Os vasos capilares apresentam a parede espessada por material hialino uniforme. Em alguns dêles, a reação histiocitária na adventícia é proeminente. O infiltrado perianexial, quando se dispõe em tórno de glândulas sudoríparas, pode levar a destruição de alguns ácinos glandulares.

Lesões após 72 horas (biopsias 5065, 5180 e 5234) — O edema agora é mínimo e limitado ao redor de anexos. O infiltrado é predominantemente histiocitário, com esboço granulomatoso, de mistura a eosinófilos e raros neutrófilos. A reação perivascular é muito nítida, percebendo-se inclusive, além da disposição dos histócitos em tórno aos pequenos vasos, as paredes dêstes espessadas à custa de edema, dando aspecto hialino ao mesmo. As células endoteliais estão tumefeitas e salientes para a luz.

Lesões após 4 dias (biopsias 5235 e 5272) — O processo é essencialmente aquêlo visto para o grupo anterior.

Lesões após 5 dias (biopsias 5185 e 5273) — Processo essencialmente semelhante aquêlo visto no grupo anterior. A predomi-

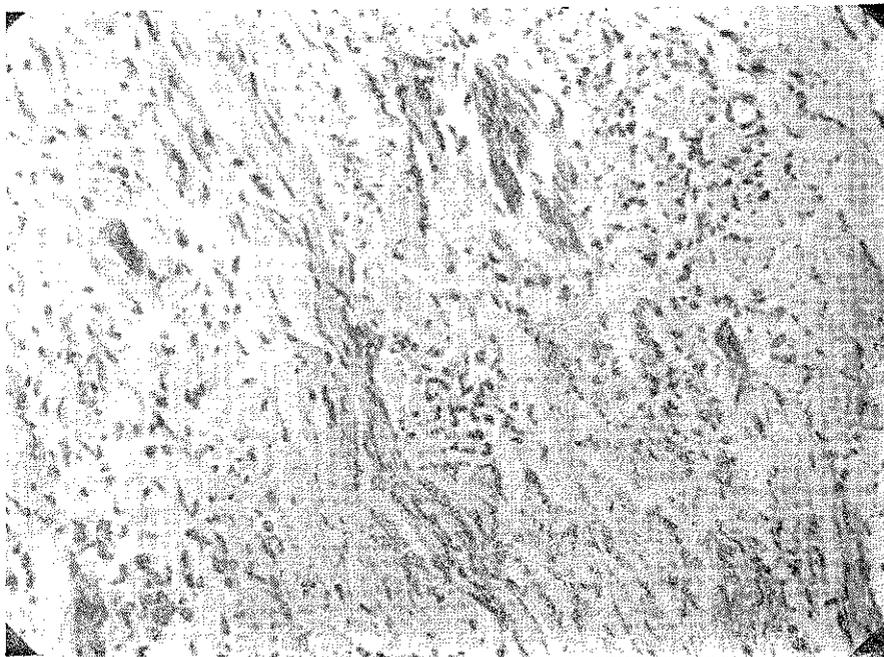


Fig. 14 — Aspecto microscópico da reação ao antígeno P 1. Persistência do processo inflamatório crônico após 8 dias, dissociando os feixes colágenos. Formação de granulomas podendo-se perceber células gigantes tipo corpo estranho. Biopsia 5274 (8 dias). Microfoto Leitz, 100 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

nância de células histiocitárias no infiltrado acentua-se progressivamente. Alguns vasos perianexiais mostram pequenas proeminências na luz, de caráter fibroso, representando possivelmente antigas trombozes organizadas.

Lesão após 6 dias (biopsia 5236) — O processo inflamatório como um todo tende a decair em intensidade. Entretanto, o caráter granulomatoso do mesmo se acentua, percebendo-se agora células histiocitárias grandes, núcleo vesiculoso e citoplasma abundante, em meio às demais, de núcleo alongado e citoplasma pouco abundante. Os eosinófilos são bem visíveis entre os elementos do infiltrado.

Lesões após 8 dias (biopsias 5237 e 5274) — O epitélio não apresenta modificações dignas de nota. O infiltrado perivascular e perianexial ainda pode ser visto, porém de intensidade bem menor. Dois fatos fundamentais devem ser considerados em relação à presente reação histopatológica; um deles, aliás já visto em menor intensidade em lâminas das biopsias das reações ao antígeno N 2, está caracterizado por certa embebição edematosa do colágeno da periferia de glândulas sebáceas, seguido de proliferação fibroblás-

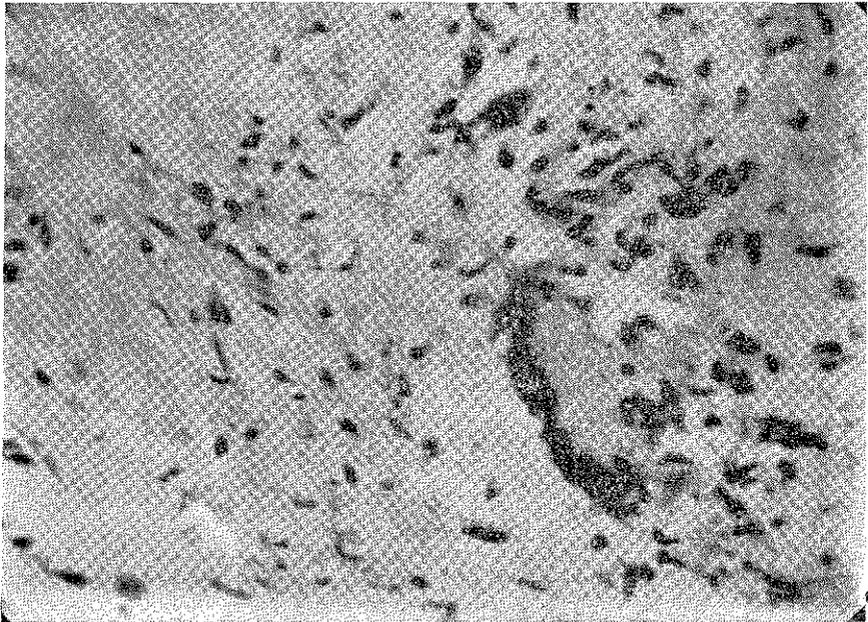


Fig. 15 — Aspecto histopatológico da reação ao antígeno P 1. Particularidade de granuloma mostrando o agrupamento de células histiocitárias e a formação de célula gigante tipo Langhans. Biopsia 5274 (8 dias). Microfoto Leitz, 300 X. Coloração: hematoxilina-eosina.

tica. A membrana basal do anexo já é melhor visível, mesmo pela hematoxilina-eosina. Porções do mesmo são substituídas por fibrose. Outro fato é a formação de granuloma na derme de um dos casos (5274), caracterizado por proliferação de histiócitos alongados, com arranjo em paliçada, e pelo aparecimento de células gigantes do tipo corpo estranho.

Lesões após 10 dias (biopsia 5275) — As lesões são essencialmente idênticas às do grupo anterior, mais próximas das observadas após 6 dias. Verificamos um granuloma, porém o mesmo se situa abaixo do epitélio (que ainda apresenta tampão de material necrótico, fibrina e raros neutrófilos), em zona onde o colágeno está alterado.

CAPÍTULO IV

COMENTARIOS

A análise do Quadro VI mostra que os resultados obtidos foram os que teóricamente se deveriam esperar. Diminuindo a concentração do antígeno, diminuíram as reações fortemente positivas (3 e 4 cruces) e aumentaram o número de reações positivas, fracas (1 e 2 cruces). Não obtivemos, como se vê no Quadro VI, reações negativas, em nenhum paciente, com os 3 antígenos.

Após êsses resultados passamos a fazer a reação com esporotriquina N 2 e N 3 (Quadro VII).

As reações feitas com N 2 continuaram a ser positivas em todos os casos estudados, o mesmo não acontecendo com N 3 que foi negativa em um dêles (caso 24). Esta reação negativa, juntamente à fraca positividade de outras, que já vinham sendo observadas desde o início das experimentações, difíceis de serem avaliadas, fizeram com que abandonássemos o uso da esporotriquina N 3. Julgamos ser êsse antígeno excessivamente diluído, perdendo já a sensibilidade.

Passamos, então, a usar o antígeno N 2 (Quadro VIII), com o qual estudamos mais 26 pacientes. Fizemos mais essa série de provas com êsse antígeno, porque com o N 1 já tínhamos boa experiência, adquirida em trabalhos anteriormente feito e já citado (LACAZ & colab., 1953) e em parte dêste; sabíamos que de sua injeção resultavam reações positivas em pacientes com esporotricose, mas conhecíamos também a ocorrência de reações positivas em indivíduos não portadores de esporotricose. O antígeno N 2 vinha

dando bons resultados em portadores de esporotricose e algumas experiências que iam sendo conduzidas paralelamente em pacientes com outras afecções micóticas e não micóticas, mostravam melhor especificidade de N 2 do que de N 1. Por êsses motivos resolvemos prosseguir nossa verificação com o emprêgo dêsse antígeno. Em mais 26 portadores de esporotricose foi o mesmo estudado. Em 25 a reação foi positiva, em graus variáveis, conforme mostra o Quadro VIII. Em 1 foi negativa (caso 47). Julgando ter sido a reação negativa porque o antígeno N 2 era insuficiente para demonstrar a sensibilização, repetimos a reação com N 1 e N 2 no caso 47, dois meses após a primeira prova, usando antígenos de outra partida, embora o anterior estivesse dando reações bastante nítidas. Repetida, foi novamente negativa, o que nos leva a supor que não se trate de antígeno de fraca potência.

O Quadro IX mostra os resultados obtidos com o uso do antígeno polissacarídico em 23 pacientes.

Diluído a 1/100 (antígeno P 1), houve reações positivas em 21 dos 23 pacientes estudados. A concordância obtida com o antígeno N 2 foi quase total. Um dos casos que reagiu negativamente ao antígeno P 1 foi o mesmo que reagiu negativamente aos antígenos N 1 e N 2 (caso 47). O caso 50 reagiu negativamente ao polissacarídeo e positivamente ao antígeno N 2.

Diluído a 1/500 (P 2) e a 1/1.000 (P 3) a sensibilidade do antígeno polissacarídico deixa a desejar; aparecem maior número de reações negativas e fracamente positivas (1 e 2 cruces), diminuindo as reações nítidas, fortemente positivas (3 e 4 cruces).

No Quadro X estão os resultados encontrados com a prova da esporotriquina em pacientes curados de esporotricose. A prova mostrou-se positiva nos 5 casos estudados, quer com os antígenos N 1 e N 2, quer com os P 1 e P 2.

No caso 2, a reação feita após a cura mostrou-se menos intensamente positiva que por ocasião da moléstia em atividade; nos casos 17 e 27 não houve diferença nítida entre as reações praticadas nas duas ocasiões. No caso 23, a reação após a cura foi mais intensa do que na vigência da moléstia. O caso 66 havia sido estudado por LACAZ & colab. (1953), época na qual a reação com antígeno F havia sido fortemente positiva (4 cruces). Repetida a reação 7 anos após a cura, continuava fortemente positiva quer ao antígeno N, quer ao P.

Após estes comentários a propósito dos resultados obtidos nos 5 primeiros grupos de pacientes estudados, isto é, portadores de esporotricose, atual ou pregressa, julgamos de interesse fazer algumas apreciações sobre a sensibilidade da reação. Em 65 pacientes, portadores de esporotricose em atividade e em 5 curados de infecção, nos quais a prova foi feita com o antígeno N, foi ela positiva em todos os casos, exceto um. Com o antígeno P, estudado em 23 casos, com P 1 tivemos 21 reações positivas e 2 negativas; com P 2, 19 positivas e 4 negativas e com P 3, 13 reações negativas e 10 positivas. Os resultados obtidos com P 1 são satisfatórios no que diz respeito à sensibilidade, com P 2 são quase semelhantes, porém as reações são menos evidentes, de leitura difícil, sobretudo nas pessoas de pele escura.

A ocorrência de provas negativas em portadores de esporotricose em atividade, conquanto raramente verificada, já o tem sido (GONZALEZ OCHOA & SOTO FIGUEIROA, 1947; THOMAS & colab., 1951). Em pacientes curados são raras também as referências a provas negativas.

CHOPIN (1910) cita prova negativa num caso curado há 2 anos e GONZALEZ OCHOA (1959) refere que a reação com o antígeno polissacarídico que usa, torna-se negativa após alguns meses.

Nos casos em que foi feita, concomitantemente, a prova aos antígenos N e P, houve concordância de resultados quase total entre o que encontramos com o antígeno N 2 e P 1. Somente um paciente (caso 50) reagiu positivamente ao antígeno N 2 e negativamente ao antígeno P 1. Fato semelhante observaram em dois casos LACAZ & colab. (1953) trabalhando com antígenos F, N (equivalente ao nosso N 1) e polissacarídeo preparado segundo GONZALEZ OCHOA & SOTO FIGUEIROA (1947).

Nos 5 pacientes curados de esporotricose que estudamos, as reações foram positivas em todos, com ambos os tipos de antígeno.

A interpretação da razão de ser destas provas negativas em pacientes portadores de esporotricose é difícil. WILSON (1957), analisando os dados de GONZALEZ OCHOA & SOTO FIGUEIROA (1947) supõe que, em casos de esporotricose disseminada, a reação seja negativa. Não julgamos que tal seja verdadeiro, primeiramente por termos encontrado referências na literatura a casos de esporotricose disseminada com reação positiva (LACAZ & colab., 1953; SHOEMAKER & colab., 1957; ARTHUR & ALBRITAIN, 1958) e também por termos feito essa verificação (caso 58). De fato, não

temos explicação satisfatória para justificar a ocorrência de reações negativas em portadores de esporotricose. Não cremos que em nosso caso a negatividade seja decorrência do pequeno tempo de infecção, daquilo que WILSON (1959) chama de "período de latência", dado que nosso paciente (caso 42) já estava doente há 1 ano e 4 meses, tempo suficiente para ocorrer a sensibilização. Duas hipóteses ocorrem-nos para tentar explicar o fato; a presença de fator anergizante, cuja percepção nos escapou ou uma incapacidade do organismo em se sensibilizar ao fungo. São contudo, meras hipóteses.

Para comentar a especificidade da reação passaremos a analisar os resultados encontrados nos itens B e C do Capítulo III.

Mesmo trabalhando com antígeno mais diluído que o usado inicialmente por LACAZ & colab. (1953), obtivemos reações positivas em portadores de outras micoses (item B).

O número de provas positivas com o emprêgo do antígeno N 2 é menor do que com o N 1, porém continuam a existir. O antígeno N 3 praticamente não foi estudado, pois como já foi referido, sua sensibilidade deixava a desejar.

O antígeno polissacarídico mostrou, no que diz respeito à especificidade, pequena discordância de achados com relação ao antígeno N 2. Conforme já assinalamos, somente uma vez verificamos reação totalmente negativa ao antígeno P e positiva ao antígeno N (caso 83). Um caso de blastomicose (n.º 79) reagiu positivamente só ao antígeno P 1 e 1 caso de *Tinea pedis*, com "ide", nas mãos, aos antígenos P 1 e P 2. Supondo que se trate de reações de grupo, os antígenos P mostraram especificidade praticamente igual a N 2. Os antígenos P 1 e P 2 podem ser utilizados quase que indistintamente. O antígeno P 2, como já foi referido, teve as desvantagens de dar, com freqüência, reações muito débeis, difíceis de serem avaliadas e maior número de reações negativas em portadores de esporotricose. No grupo de pacientes diversos (item C), os resultados com o antígeno N 2 são nitidamente melhores que os obtidos com N 1 (9 reações positivas com N 1 e 5 com N 2). Neste grupo, melhor do que no anterior, cremos ter ficado demonstrada a melhor sensibilidade da reação quando feita com o antígeno N 2.

Os resultados que observamos com os antígenos P 1 e P 2, desprezados os de P 3, pois êste, como já salientamos, é de concentração insuficiente para dar reação positiva em percentagem razoável de casos de esporotricose, mostram que o número de reações

positivas é menor que com o antígeno N 2, denotando melhor especificidade dos antígenos P. Num único caso (n.º 137), e para êle não temos explicação, a prova foi fracamente positiva com P 1 e P 2, e negativa com N 1 e N 2.

O aparecimento de reações positivas neste grupo de pacientes é de interpretação difícil. Se, no grupo anterior podemos interpretar as reações positivas como fenômeno de co-sensibilização, tal explicação não servirá para o grupo de portadores de afecções diversas, não fúngicas. A nosso ver, três possibilidades existem para explicar essas reações positivas:

- 1) inespecificidade da reação;
- 2) sensibilização ao *Sporotrichum schencki* em indivíduos que não desenvolveram esporotricose;
- 3) sensibilização a outros fungos, com os antígenos do *Sporotrichum schencki*.

Entre nossos casos encontramos dois que sugerem a possibilidade de que os indivíduos hajam se sensibilizado ao *Sporotrichum schencki*, sem haver contraído esporotricose. O caso 141 fez a prova de esporotriquina em 1951 com resultado negativo. Até então nunca havia tido contato com *Sporotrichum schencki*. Nos anos subsequentes entrou seguidamente em contato, com pacientes e com cultivos de *Sporotrichum schencki*. Nunca teve esporotricose e em 1958 fez novamente a reação, agora com resultado fortemente positivo. O caso 147 é o de um técnico que nos vem auxiliando e que conquanto nunca tivesse tido esporotricose, também reagiu positivamente à esporotriquina.

Outro caso, o de n.º 144 é também o de uma pessoa que, conquanto não trabalhe diretamente com fungos, exerce suas atividades no laboratório onde foi feito êste estudo, local onde se trabalha ativamente com cogumelos.

As verificações feitas nesses 3 casos sugerem-nos a possibilidade de que existam casos de "esporotricose-infecção" semelhantes aos já conhecidos de "histoplasmose-infecção", "coccidioidomicose-infecção", "blastomicose-infecção" (LACAZ & colab., 1959), etc.

Neste setor, isto é, pesquisas sôbre a "esporotricose-infecção", pretendemos prosseguir, em futuro, nossas indagações.

Além dos comentários já feitos, que julgamos os mais importantes, desejamos fazer alguns outros.

Assim pois, a prova da esporotriquina permitiu diagnosticar 7 casos com suspeita clínica de esporotricose, nos quais as culturas foram negativas. Propositadamente não os incluímos na casuística, por motivo já referido. Nesses casos a prova terapêutica falou a favor de que se tratassem realmente de esporotricose.

Não podemos com o nosso material de estudo fazer observações com relação ao tempo em que a reação torna-se positiva. Os casos mais precoces que tivemos datavam de 3 semanas, tendo sido a prova positiva em todos. Não notamos também relação bastante nítida entre a forma clínica da moléstia e a intensidade da reação. Encontramos reações intensamente positivas em portadores de formas mínimas, localizadas, de esporotricose (casos 12, 16 e 40 por exemplo) e reações fracamente positivas em portadores de formas com comprometimento mais extenso (casos 20, 39, 52 e 53 por exemplo).

O estudo histopatológico efetuado, propiciou oportunidade para alguns comentários que fazemos a seguir.

a) REAÇÃO AO ANTÍGENO N 2

Um esboço da seqüência de eventos histológicos pode ser obtido através do exame das biopsias sucessivas da paciente A.J.G. (caso 31). A biopsia, obtida 6 horas após à injeção intradérmica do antígeno, demonstra edema difuso da derme, que é bem visível nas papilas. A epiderme mostra-se retificada pelo edema subjacente, podendo-se observar que a hiperpigmentação da camada basal é mais visível. Verifica-se infiltrado inflamatório dérmico constituído por células histiocitárias, de núcleo alongado, citoplasma de limites pouco precisos, de mistura com pequeno número de células mononucleares, o conjunto se dispendo em tórno a capilares da papila dérmica e ao redor de anexos, principalmente glândulas sebáceas. O exame das porções mais superficiais da derme mostra ocasionais células histiocitárias carregadas de pigmento pardo-escuro, possivelmente melânico. Estas células são bem visíveis próximas a capilares.

Após 12 horas o quadro permanece inalterado, exceto pelo fato da reação inflamatória perivascular e perianexial tornar-se mais evidente, surgindo outro elemento da mesma, que é o polimorfonuclear neutrófilo. Mostram-se em pequeno número e íntegros. A biopsia, retirada 24 horas após, mostra, de particular, apenas decréscimo na intensidade do edema, a reação inflamatória persistindo

com sua intensidade inalterada. O aumento do número de polimorfonucleares neutrófilos faz-se mais proeminente 48 horas após, porém ainda não se observam sinais degenerativos nos mesmos. É de se notar que, junto aos remanescentes do edema superficial da derme, o colágeno assume aspecto levemente granuloso. Um diagnóstico de degeneração fibrinóide não pôde ser feito com certeza, uma vez que êsse colágeno se dispõe próximo à área de edema; além do mais, não se nota nenhuma alteração tintorial pelo cresil-violeta e pelo PAS.

Após 72 horas, verificaram-se nesta paciente aumento e certa predominância da reação neutrófila sôbre as demais. Os neutrófilos mostram sinais degenerativos, formando-se então verdadeira área abscedada próxima a glândulas sebáceas. O processo agride parcialmente o epitélio, com destaque segmentar do mesmo, deixando no local pequena área hemorrágica. Observa-se também destruição parcial de glândulas sebáceas. O quadro evolui para extensa ulceração, como é vista após 7 dias.

O exame de biopsias em tempos diferentes de pacientes diversos, funciona como complemento ao estudo da reação histopatológica. É assim que, 3 dias após (biopsia 4574) observa-se, de mistura com neutrófilos íntegros e degenerados, eosinófilos em número variável. É de se notar a tendência da reação neutrófila não só a se dispor junto a anexos, mas a destruí-los parcialmente. Disto resulta inclusive imagens de foliculites de intensidade variável, bem visíveis em biopsias mais tardias. Outro fato que observamos foi o ocasional aparecimento de depósito vermelho vivo homogêneo, seja abaixo dos capilares, seja sob a membrana basal de glândulas sebáceas. Raras vêzes pudemos encontrar aspectos sugestivos de degeneração fibrinóide do colágeno. Os capilares, junto ao processo agudo, reagem de maneira diversa. É relativamente freqüente, entretanto, o encontro dêstes vasos com revestimento endotelial tumefeito, inclusive com figuras de mitose. Verdadeiras arterites agudas não são visíveis, o infiltrado inflamatório que se dispõe em tôrno das mesmas sendo geralmente mistura de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares, com predominância dêstes dois últimos elementos.

Em tôrno do 5.º dia (biopsia 4605) observamos ao lado da reação exsudativa, inclusive com a formação de abscessos, o aparecimento de reação produtiva, de caráter granulomatoso, localizada seja nas porções superficiais, seja nas porções profundas da derme. Caracteriza-se pelo acúmulo de células histiocitárias, algumas vêzes

em arranjo epitelióide, ao lado de células gigantes tipo Langhans e corpo estranho. Predominam as primeiras sobre as últimas.

A concomitância do quadro exsudativo da reação ao produtivo persiste, num equilíbrio variável de caso para caso, através de todas as biopsias examinadas. É de se notar o predomínio deste último em biopsias em torno dos 14 a 17 dias (4591, 4567 e D. S.). Entretanto, durante todo o evoluir do processo, o quadro subagudo com eosinófilos é visto em torno a pequenos vasos e anexos da pele.

Resumindo, a reação histopatológica ao antígeno N 2 passa por fase de proliferação local fugaz, a qual logo se sucede quadro exsudativo predominante, cuja intensidade máxima é em torno do 3.º dia. Observamos destruição parcial de anexos e do epitélio pelo processo, resultando ulceração de profundidade e extensão variáveis.

A seguir verificamos o estabelecimento de fenômenos de caráter produtivo, com formação de granulomas, por vezes de centro supurado. Com o passar do tempo, eles tendem, juntamente à proliferação local de caráter mais geral, a dominar o quadro histopatológico.

Outros achados a notar no acme da reação estão representados pela reação eosinófila e pelo ocasional aparecimento de depósito de caráter fibrinóide abaixo da íntima de pequenos vasos e sob a membrana basal de anexos da pele.

b) REAÇÃO AO ANTÍGENO P 1

Está caracterizada por processo inflamatório sugestivo também de patogenia alérgica, que se manifesta por infiltrado constituído de células histiocitárias, de mistura a eosinófilos e raros neutrófilos. Estes últimos elementos são particularmente evidentes nas primeiras 24 horas. A inflamação se dispõe junto a anexos e principalmente capilares da pele. Os anexos são, por vezes, parcialmente destruídos pelo processo. Os capilares mostram tumefação das células endoteliais, edema de parede e proliferação histiocitária periférica. Após 72 horas o edema de caráter crônico é expresso por depósito hialino na parede dos vasos. Idêntico aspecto foi visto no colágeno junto aos anexos. A membrana basal dos mesmos apresenta-se fortemente espessada.

A predominância de histiócitos na reação tende a se acentuar progressivamente, com manutenção do arranjo perianexial e pe-

rivascular. Após 8 dias foi visto em um dos casos a formação de granuloma, com células gigantes principalmente do tipo corpo estranho.

Em nenhum dos casos verificamos alterações significativas de epitélio. A não ser por edema intra e intercelular focal, visto nas primeiras 72 horas, êle nada mostrou digno de nota. O colágeno também não apresenta modificações fundamentais, exceto nos pontos de contato da agulha, onde êle se mostra mais denso e de aspecto mais grosseiro.

* * *

Comparando os dois tipos de reação, é de se notar a maior intensidade daquela ao antígeno contendo elementos figurados, levando inclusive à ulceração do epitélio em alguns casos. A formação de granuloma é bem evidente, muito embora a parte exsudativa da reação permaneça como tal, ao lado da produtiva. Neste ponto a reação assemelha-se muito àquela que é vista na esporotricose, sugerindo que esta última seja de caráter alérgico e desta maneira explicando a difícil demonstração dos parasitas ao exame histopatológico da lesão.

Com o antígeno solúvel a reação foi menos destrutiva, afetando quando muito, porção de anexos. Entretanto, após 8 dias vimos a formação de granuloma perianexial, desta maneira sugerindo a hipersensibilidade como um dos elementos básicos para o aparecimento desta particular manifestação morfológica.

CAPÍTULO V

RESUMO E CONCLUSÕES

Preocupamo-nos, no presente trabalho, em trazer contribuição para o melhor conhecimento da prova imuno-alérgica da esporotriquina, estudando 2 tipos de antígenos em concentrações diferentes. Após experiência preliminares, feitas com LACAZ e LOPES (LACAZ & colab., 1953), passamos a estudar mais pormenorizadamente dois antígenos: o primeiro constituído por suspensão de elementos leveduriformes do *Sporotrichum schencki*; o segundo, por substância antigênica rica em polissacarídeo, obtida do mesmo fungo, cultivado a 37° C em meio de FRANCIS ou em meio de SABOURAUD, extraída por autoclavagem de suspensão do *Sporotrichum schencki*, variante leveduriforme, segundo técnica de NORDÉN (1951), modificada por FAVA NETTO (1955), para extração de polissacarídeo de *Paracoccidioides brasiliensis*.

No prefácio e na introdução, procuramos justificar o interesse prático e teórico do assunto. Do ponto de vista prático, desejávamos saber até que ponto a prova da esporotriquina tem valor como método diagnóstico. Do ponto de vista doutrinário, procuramos trazer contribuição para o melhor conhecimento da imuno-alergia dessa micose, principalmente no que se refere à possibilidade da existência da "esporotricose-infecção", o que, uma vez positivado, viria a colocar a prova da esporotriquina em posição semelhante a outras provas intradérmicas, usadas em algumas micoses profundas, tais como a histoplasmina e a coccidióidina.

Julgamos, após a revisão bibliográfica, serem necessários novos estudos para formar melhor juízo sobre a reação.

No Capítulo II, estudamos os antígenos utilizados. O obtido por suspensão do *Sporotrichum schencki*, na fase leveduriforme, foi padronizado por método espectrofotométrico em 3 concentrações distintas; o antígeno polissacarídico, pelo volume de substância extraída inicialmente, por acetona e éter e depois por autoclavagem a 120° C. O extrato, assim obtido, foi diluído a 1/100, 1/500 e 1/1.000 e utilizado como antígeno para a reação. Não fizemos experiências com esporotriquina-filtrado, devido às dificuldades em padronizar tal antígeno.

É apresentada a técnica da reação, a habitualmente empregada para reações intradérmicas, e o critério usado para a leitura das mesmas, semelhante ao proposto pelo "Department of Health, Education and Welfare of Public Health Service" (1954) para a histoplasmina. Subdividimos os resultados das reações positivas em uma, duas, três e quatro cruces, com o fim exclusivo de dar ao leitor uma idéia sobre o grau de positividade das mesmas.

É apresentado o método usado no estudo da histopatologia da reação. Consistiu êle na injeção dos 2 tipos de antígenos utilizados (N 2 e P 1) em pacientes portadores de esporotricose e execução de biopsias, sempre sob anestesia local, pelo cloreto de etila, em espaços de tempo variáveis para formar idéia sobre a seqüência evolutiva da histopatologia do processo. Os fragmentos de pele foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados, sendo a coloração básica a hematoxilina-eosina. Quando julgado necessário, foram coradas lâminas por outros processos, HOTCHKISS MAC MANUS (PAS) e cresil-violeta.

No Quadro IV apresentamos a maneira como se distribuíram os pacientes nos quais foi biopsiada a reação ao antígeno N 2, em

relação ao tempo decorrido entre a injeção do antígeno e a retirada do fragmento de pele; no Quadro V, os mesmos dados com relação ao antígeno P 1.

No Capítulo III, expomos os resultados obtidos nos diversos pacientes, os quais foram distribuídos da seguinte maneira:

A) PORTADORES DE ESPOROTRICOSE, ATUAL OU PREGRESSA

Compreendem 5 grupos, a saber:

1.^o grupo (18 casos) — pacientes portadores de esporotricose em atividade, nos quais foi feita a reação com esporotriquina N 1, N 2 e N 3. A reação foi positiva em todos eles (Quadro VI). Verificamos maior número de reações fortemente positivas com o antígeno N 1 do que com N 2 e N 3, resultado êsse que seria de se prever. De modo semelhante, houve maior número de reações fortemente positivas com N 2 que com N 3.

2.^o grupo (21 casos) — pacientes portadores de esporotricose em atividade, nos quais foi praticada a reação com esporotriquina N 2 e N 3. A prova foi, como no grupo anterior, positiva em todos os casos com antígeno N 2; negativa em um deles com a esporotriquina N 3.

3.^o grupo (26 casos) — pacientes portadores de esporotricose em atividade, nos quais foi feita a reação com esporotriquina N 2. A reação foi positiva em 25 dos 26 indivíduos estudados. Considerando conjuntamente êstes 3 grupos, isto é, indivíduos com esporotricose em atividade, nos quais foi praticada a prova da esporotriquina com antígeno N 2, verificamos que ela foi positiva em 64 dos 65 pacientes (98,46%).

4.^o grupo (23 casos) — pacientes portadores de esporotricose em atividade nos quais foi realizada, além da prova com esporotriquina N 2, reação com antígeno polissacarídico obtido de culturas do *Sporotrichum schencki*, por método anteriormente citado. O referido antígeno foi diluído a 1/100 (P 1), 1/500 (P 2) e 1/1.000 (P 3) e usado em prova intradérmica. Com o antígeno P 1 obtivemos 21 provas positivas (91,30%) e duas negativas; com P 2, 19 positivas (82,60%) e 4 negativas e com P 3, 13 provas negativas e 10 positivas (43,47%).

5.^o grupo (5 casos) — pacientes nos quais foi feita a esporotriquina após a cura clínica do processo. O tempo de cura variava

entre 3 meses e 7 anos. A prova foi positiva nos 5 casos estudados, com os antígenos N 2, P 1 e P 2. Com o antígeno P 3 foi positiva em 3 casos e negativa em dois.

B) PORTADORES DE OUTRAS MICOSES

Foram estudados 25 pacientes, 23 com a moléstia em atividade e 2 curados. Em todos, a reação foi praticada com os antígenos N 1 e N 2; em 22 dêles, foi feita também com P 1, P 2 e P 3.

A reação com antígenos N foi positiva num caso de *Tinea corporis* (n.º 73) e num de blastomicose (n.º 78) com N 1 e negativa com N 2; foi positiva tanto com N 1 como com N 2 em dois casos de blastomicose e em dois de *Tinea pedis* com "ide" (ns. 82 e 87), (N 1 - 24% e N 2 - 16% de positividade neste grupo). Com o antígeno P, verificamos as seguintes reações positivas: um caso reagiu positivamente a P 1 (n.º 79), outro positivamente a P 1 e P 2 (n.º 87) e um terceiro a P 1, P 2 e P 3 (n.º 82). (P 1 - 13,63%, P 2 - 9,09% e P 3 - 4,54% de positividade neste grupo).

C) EM PACIENTES DIVERSOS

Foram estudados 58 indivíduos portadores de afecções diversas, sendo incluídos, também, alguns normais. A prova foi praticada em todos com os antígenos N 1 e N 2 e em 54 dos 58 também com o polissacarídeo nas 3 diluições anteriormente citadas.

A relação com N 1 foi negativa em 49 indivíduos e positiva em 9 (15,51%); com N 2 positiva em 5 (8,62%) e negativa em 53. Com o antígeno P 1 encontramos 5 reações positivas (9,25%) em 54 feitas; com P 2 quatro positivas (7,40%) e 50 negativas e com P 3, duas positivas (3,70%) e 52 negativas.

Ainda no mesmo capítulo, no item D, descrevemos, de modo sumário, a macromorfologia da reação. As alterações locais verificadas à leitura de 48 a 72 horas foram: eritema, pápula, pápula edematosa, tubérculo, nódulo, vesícula, pústula e úlcera. A lesão elementar mais freqüentemente observada foi a pápula edematosa. A formação de vesícula, pústula e ulceração já às 48-72 horas foi, com freqüência, observada nas reações fortemente positivas. O que verificamos, com relação às reações tardias à esporotriquina, confirma as observações de MIRANDA & colab. (1958).

Reações gerais observamos raramente e quando presentes, de pequena intensidade.

No item E do Capítulo III apresentamos os resultados do estudo da histopatologia da reação. Uma apreciação global das biopsias estudadas mostra que a reação histopatológica à esporotriquina passa por fase de proliferação local, passageira, a qual se acrescenta posteriormente quadro exsudativo. Segue-se nova reação produtiva com o aparecimento de granuloma. A reação ao antígeno N 2 é mais intensa do que ao P 1.

Dos resultados apresentados concluímos que, dentre os antígenos estudados os mais próprios para uso são o N 2 e o P 1. O antígeno N 2 mostrou sensibilidade muito boa (reação positiva em 64 dos 65 casos estudados (98,46%)); igual ao N 1, nos casos em que ambos foram utilizados. Quanto à especificidade, no grupo de pacientes com outras micoses, com N 1 verificamos 6 reações positivas (24%) e com N 2, quatro (16%) e no grupo de pacientes diversos, com N 1 obtivemos 9 reações positivas (16,07%) e com N 2 cinco (9,10%).

No Capítulo IV comentamos os resultados obtidos. Verificamos que o uso da esporotriquina em diluição maior (N 2) que a anteriormente usada por LACAZ & colab. (1953) proporcionou-nos resultados semelhantes no que se refere à sensibilidade da reação e melhoria da especificidade. Mesmo assim, verificamos a ocorrência de reações, provavelmente de grupo, em pacientes portadores de outras micoses. Algumas verificações feitas em pacientes sem esporotricose atual ou pregressa e sem outra micose atual, sugerem a existência de "esporotricose-infecção", tal como supõem MACKINNON & colab. (1953a). O estudo comparativo de antígeno preparado a partir da fase leveduriforme do *Sporotrichum schencki* (N 2) e polissacarídeo extraído do mesmo fungo mostrou não existir vantagem no emprêgo dêste último antígeno.

Sua sensibilidade foi menor, e também com êle ocorreram, embora em menor número, reações positivas em outros pacientes, não portadores de esporotricose.

O estudo de 5 indivíduos, que haviam tido esporotricose, mostrou que até 7 anos após a cura podem-se obter reações positivas à esporotriquina.

Do estudo feito, depreendemos que a prova da esporotriquina, desde que criteriosamente interpretada, ao lado da clínica, pode se constituir num recurso de valor como elemento de diagnóstico presuntivo, precoce, da esporotricose. Deverá ser praticada junto com as culturas. De modo algum êste recurso, indireto, deverá ser mais

valorizado que o isolamento do fungo das lesões. Não pudemos, no material estudado, chegar à conclusão sobre a época em que a prova torna-se positiva, assim como não nos foi possível também estabelecer relação nítida entre forma clínica da moléstia, tempo de duração da mesma e grau de positividade da reação.

O estudo histopatológico efetuado mostrou reação mais intensa ao antígeno contendo elementos celulares que ao solúvel. A reação histopatológica à esporotriquina evidenciou certa semelhança com a histopatologia da esporotricose, o que sugere existir nesta um componente alérgico, que explicaria a dificuldade em encontrar-se, à microscopia, o parasita nas lesões.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

It is the author's purpose in this paper to help lead to a wider appreciation of the "imuno-allergy" SPOROTRICHIN test, by the study of two types of antigens in various concentrations. Following the preliminary investigation of LACAZ *et al.* (1953), the author studied two antigens in greater detail: the first a suspension of the yeast-like elements of the *Sporotrichum schencki*; the second, an antigen rich in polysaccharides obtained from the same fungus, cultured at 37° with the FRANCIS and SABOURAUD media, extracted by autoclaving a suspension of *Sporotrichum schencki*, yeast like type according to the technique of NORDÉN (1951) modified by FAVA NETTO (1955) for the extraction of the polysaccharides of *Paracoccidioides brasiliensis*.

In the preface and introduction, reasons are given for the belief that the matter is an important one in both its theoretical and practical aspects.

From the practical point of view it is necessary to know the exact validity of the Sporotrichin test as a diagnostic method. From the theoretical view point it is hoped to lead to a better understanding of the immuno-allergy of this mycosis, especially that aspect dealing with the possible existence of an "sporotrichosis infection" which, once proved, would put the Sporotrichin test in the same category as the other intradermal tests used for certain deep mycosis such as histoplasmosis and coccidioidomycosis.

After reviewing the literature of the subject it was felt that further studies were required to lead to a better evaluation of this reaction.

In the second chapter the antigen at present in use are investigated. That obtained from the suspension of *Sporotrichum schenki* in its yeast like phase was standardized by spectroscopy in 3 different concentrations; the polysaccharide antigen was extracted from the original substances with acetone and ether and later by autoclaving at 120°. The extract thus obtained was diluted to 1/100, 1/500 and 1/1000 and used as the antigen in the reaction.

Tests were not made using filtered Sporotrichin because of the difficulty of standardizing such an antigen.

The technique of the test is described, it is that normally used for skin tests, and also the criteria employed in reading the reaction. These were those proposed by the Department of Health, Education and Welfare of Public Health Service (1954) for histoplasmosis.

Positive results were divided into groups one, two, three, or four to give the reader an idea of the degree of positivity obtained.

The method used to study the histopathology of the reaction is described. Both types of antigen (N 2 and P 1) are injected into patients with sporotrichosis and biopsies performed, under local anesthetic with ethyl chloride at different lengths of time to give an idea of the sequence of events taking place in the histopathology. The skin biopsies were fixed in 10% formalin embedded in paraffin and sectioned 5 to 6 micra thick, using hematoxylin and eosin as stain. When it was thought advisable, sections were made and stained by other methods, periodic acid-Schiff and cresyl violet.

Table IV shows the distribution of patients, in whom biopsies were made, of the reaction to antigen N 2 to the time between the injection of the antigen and the removal of the skin fragment; in Table V the same data are given for antigen P 1.

Chapter III sets out the results obtained in various patients which were distributed in the following manner:

(a) *Patients with sporotrichosis* (both active and past cases).

These consisted of five groups, i.e.:

1st. group (18 cases) patients with active sporotrichosis who were tested with sporotrichin N 1, N 2 and N 3. A positive reaction was obtained with all of these (Table VI). A greater number of strongly positive reactions was obtained with antigens N 1 than N 2 or N 3, the result which would be expected. In a similar manner there were a greater number of strong positive with N 2 than N 3.

2nd group (21 cases) patients with active sporotrichosis who were tested with sporotrichin N 2 and N 3. As in the former group, the test was positive in every case receiving antigen N 2; one case receiving N 3 was negative.

3rd group (26 cases) patients with active sporotrichosis who were tested with sporotrichin N 2. A positive reaction was given by 25 of the 26 cases tested.

Taking the three groups together it can be seen that of those individuals with active sporotrichosis who were given the sporotrichin test, using antigen N 2, 64 out of 65 gave a positive result (98.46%).

4th group (23 cases) patients with active sporotrichosis who as well as being tested with sporotrichin N 2 were also tested with the polysaccharide antigen obtained from cultures of *Sporotrichum schenki* by the above mentioned method. This later antigen was diluted to 1/100 (P 1), 1/500 (P 2) and 1/1000 (P 3) and injected intradermally.

With antigen P 1, 21 positive results were obtained (91.30%) and 2 negative results; with P 2, 19 positives (82.6%) and 4 negatives; with P 3, 13 negatives and 10 positives (43.47%).

5th group (5 cases) patients in whom the sporotrichin test was made after a clinical cure of the disease. The time elapsed since the cure varied between 3 months and 7 years. The test was positive in all 5 cases with antigens N 2, P 1 and P. 2. With antigen P 3 a positive test was obtained in 3 cases and a negative in 2.

(b) PATIENTS WITH OTHER MYCOSIS

Twenty five patients were studied, 23 with active disease and 2 cured cases. In all of these the test was performed with antigens N 1 and N 2 and in 22 cases with P 1, P 2 and P 3 in addition.

A positive result was obtained with the N antigens in one case of *Tinea corporis* (Nr. 23), in one of blastomycosis with N 1 (but negative with N 2); a positive with both N 1 and N 2 was given by 2 cases of blastomycosis and 2 of *Tinea pedis* with "id" (Nrs. 82, 87), (N 1 - 24% and N 2 - 16 positives in this group).

With antigen P the following positive results were obtained: one case reacted positively to P 1 (Nr. 79) another positively to P 1 and P 2 (Nr. 87) and a third to P 1, P 2 and P 3 (Nr. 82).

(P 1 - 13.63%, P 2 - 9.09% and P 3 - 4.54% positives in this group.)

(c) MISCELLANEOUS CASES

Fifty eight other cases were studied with various diseases together with several normal individuals. The test was done in every case with antigens N 1 and N 2 and in 54 of the 58 cases with the polysaccharide antigen, in the three before mentioned dilutions, as well.

The result with N 1 was negative in 49 cases, and positive in 9 (15.51%); with N 2, positive in 5 (8.62%) and negative in 53. With the P 1 antigeno, 5 positive reactions (9.25%) were obtained in the 54 cases tested; with P 2, 4 positives (7.40%) and 50 negatives and with P 3, 2 positives (3.70%) and 52 negatives.

In the same chapter, section D, a summary is given of the macroscopic changes of the reaction. The local changes observed between the 48th and 72nd hours were: erythema, papular eruptions, papule with edema, tubercles, nodules, vesicles, pustules and ulceration. The basic lesion most frequently seen was edematous papule. Vesicles, pustules and ulceration were found as early as 48 - 72 hours in those lesions which were strongly positive. The author's findings with regard to the late changes with sporotrichin confirmed those of MIRANDA & colab. (1948).

Generalized reactions were rarely seen and when present were not of marked intensity.

In section E of chapter III the histopathology of the lesion is described.

An overall appreciation of the biopsies taken shows that the histology with sporotrichin passes from the phase of transient, local proliferation and later demonstrates the picture of exudation. This new productive reaction is followed by the appearance of granulation tissue. The reaction to antigen N 2 is more marked than that to P 1.

From these results it can be concluded that, of those antigens tested, the most satisfactory are N 2 and P 1. Antigen N 2 shows

itself to be extremely sensitive (positive reactions being obtained in 64 cases out of 65 in which both antigens were used).

With regard to the specificity; in that group of patients with other mycosis, with N 1, 6 positive reactions were obtained (24%) and with N 2, 4 (16%) and in the group of miscellaneous cases, with N 1, 9 positive results were seen (16.07%) and with N 2, 5 (9.10%).

In chapter IV comments are made upon the results obtained. It is shown that the use of sporotrichin in greater dilution (N 2) than was previously used by LACAZ & colab. (1953), gives equivalent results in respect to the sensitivity of the reaction and better results with regard to the specificity.

However even with this dilution there occurred some positive reactions, probably group reactions, in patients with other mycosis.

Some positive results obtained with patients who had neither active nor past sporotrichosis, nor other active mycosis, suggest the existence of "sporotrichosis infections" as MACKINNON & colab. (1953) have suggested.

A comparative study between the antigen prepared from the yeast like phase of *Sporotrichum schenki* (N 2) and the polysaccharide extract of the same mould shows that there is no advantage in using the latter antigen. Its sensibility was less and there also occurred, though less in number, positive reactions in other patients without sporotrichin.

From this study it can be seen that the Sporotrichin test, critically interpreted together with the clinical findings, can constitute a valuable armament in the early presumptive diagnosis of sporotrichosis.

The test should be carried out together with the making of cultures. But it should be realized that this indirect test is not more important than the isolation of the fungus from the lesions. No conclusions can be reached, from the material studied, as to the time at which the test becomes positive nor was it possible to establish a clear relationship of the clinical manifestation or duration of the disease with the degree of positive reaction obtained.

Histological studies showed a greater tissue reaction to an antigen containing cellular elements to that of one entirely in solution. The histological reaction of sporotrichin shows a certain similarity to that of sporotrichosis which suggests that there exists in this latter an allergic component, which would explain the difficulty in finding, microscopically, the parasite in the lesions.

P R O T O C O L O S

A — PACIENTES COM ESPOROTRICOSE, ATUAL OU PREGRESSA *

N.º	INICIAIS	TEMPO DE DOENÇA	FORMA CLÍNICA	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
1	A.M.S.	3 semanas	Cutânea localizada, ulcerosa	N 1 — Positiva (++) N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (+)	Aos 13 dias, induração 5 mm N 1 e N 2 Ausência de induração N 3
2	S.M.N.	1 ano	Cutânea localizada, verrucosa	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++)	Três anos e meio após, foi repetida a reação com o seguinte resultado: N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (+) P 3 — Positiva (+)
3	C.L.B.	1 mês	Cutânea linfática	N 1 — Positiva (++) N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (+)	Aos 7 dias indurações de 12, 10 e 7 mm em N 1, N 2 e N 3 respectivamente
4	D.S.	1 mês	Cutânea linfática	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (++)	Teve reação geral. Aos 17 dias indurações, ulceradas, de 8,8 e 6 mm em N 1, N 2 e N 3 respectivamente
5	N.L.F.	4 meses	Cutânea localizada, verrucosa	N 1 — Positiva (++) N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (+)	Aos 10 dias indurações de 10, 10 e 9 mm em N 1, N 2, N 3; os dois primeiros ulcerados

(*) Na designações das formas clínicas seguimos a classificação proposta por SAMPAIO & colab. (1954).

N.º	INICIAIS	TEMPO DE DOENÇA	FORMA CLÍNICA	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
6	V.B.	5 meses	Cutânea localizada, ulcerosa	N 1 — Positiva (+++) N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (+)	Aos 7 dias indurações 10 mm nas 3 reações
7	A.B.	6 anos	Cutânea localizada, ulcerosa	N 1 — Positiva (++) N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	Aos 7 dias indurações de 10, 10 e 8 mm em N 1, N 2 e N3; os dois primeiros com pústula central
8	C.D.	2 meses	Cutânea localizada, úlcero-vegetante	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	Aos 22 dias indurações de 5, 3 e 3 mm em N 1, N 2 e N 3
9	A.R.B.L.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 1 — Positiva (++) N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	—
10	X.G.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (+)	—
11	T.J.S.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (+)	Aos 18 dias, indurações de 3 mm nas três reações
12	S.S.B.	2 meses	Cutânea localizada, úlcero-vegetante	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++++)	—

13	O.G.D.	8 meses	Cutânea localizada, verrucosa	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	Aos 31 dias, indurações de 5 mm nas 3 reações. N 3 — difícil de se avaliar
14	J.F.M.	2 meses	Cutânea localizada, verrucosa	N 1 — Positiva (+-) N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	N 3 — difícil de se avaliar. Pápula de 0,5 mm
15	J.F.	1 mês e meio	Cutânea localizada, ulcerosa	N 1 — Positiva (+-) N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	Doente de blastomicose. Curado há 5 anos
16	J.S.R.A.	1 mês	Cutânea localizada, acneiforme	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++++)	—
17	N.C.A.	3 meses	Cutânea localizada, vegetante-verrucosa	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (+)	Três meses após a cura foram repetidas as reações: N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++) P 3 — Positiva (++)
18	A.S.S.	5 semanas	Cutânea linfática	N 1 — Positiva (+ + +) N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (+)	—
19	A.M.	2 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+-) N 3 — Positiva (+)	Aos 7 dias, induração, ulcerada de 9 mm, em N 2 e N 3

N.º	INICIAIS	TEMPO DE DOENÇA	FORMA CLÍNICA	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
20	M.T.	2 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	—
21	G.M.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+++) N 3 — Positiva (++)	—
22	C.F.O.	1 ano	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++++)	—
23	H.V.B.	3 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	Após 8 meses: N 2 — (+++) P 1 — Positiva (+++) P 2 — Positiva (+++) P 3 — NEGATIVA
24	A.R.G.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++++)	—
25	L.H.F.	4 meses	Cutânea localizada	N 2 — Positiva (+) N 3 — Negativa	—
26	J.A.C.	1 ano e 4 meses	Cutânea localizada, ulcerosa	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++)	—

27	M.L.C.P.	2 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	Repetida após 5 meses (paciente curada) N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (++) P 2 — Positiva (+) P 3 — NEGATIVA
28	F.P.L.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++++)	—
29	A.C.R.	3 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++)	—
30	P.R.S.	3 semanas	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (++)	—
31	A.J.M.	Recidiva de caso tratado 1 ano antes com Glucantime	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (++)	—
32	C.L.B.	1 mês e meio	Cutânea localizada, úlcero-vegetante	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++)	Aos 8 dias, indurações de 5 e 8 mm respectivamente em N 2 e N 3
33	E.R.	2 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++)	—

N.º	INICIAIS	TEMPO DE DOENÇA	FORMA CLÍNICA	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
34	D.P.	25 dias	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (+) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++) P 3 — Positiva (+)	—
35	B.S.N.	2 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++++)	—
36	M.O.A.N.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++) N 3 — Positiva (++)	Aos 9 dias, nódulos de 1 mm em N 2 e N 3
37	W.M.	2 meses	Cutânea localizada, ulcerosa	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (+)	—
38	P.P.	Ignorado	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) N 3 — Positiva (++++)	—
39	S.A.	1 mês	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (++) P 2 — NEGATIVA P 3 — NEGATIVA	—
40	O.B.F.	3 meses	Cutânea localizada, verrucosa. Forma minimal	N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++++) P 3 — Positiva (+)	Aos 8 dias, induração de 10 mm, em N 2. Mancha hipererômica, residual nas demais

41	S.Z.	3 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+ + + +)	—
42	R.F.S.	3 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+ +)	—
43	M.A.P.	1 mês e meio	Cutânea localizada, ulcerosa	N 2 — Positiva (+ +)	—
44	R.P.M.	2 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+ + + +)	—
45	M.D.T.B.	1 mês	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+) P 1 — Positiva (+ + + +) P 2 — Positiva (+ + +) P 3 — Positiva (+)	Pápulas perceptíveis somente ao tato
46	A.O.S.	3 meses	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+ + +) P 1 — Positiva (+ + + +) P 2 — Positiva (+ + +) P 3 — Positiva (+ + +)	—
47	A.M.G.Z.	1 ano e 2 meses	Cutânea linfática	N 2 — NEGATIVA P 1 — NEGATIVA P 2 — NEGATIVA P 3 — NEGATIVA	Repetida após 2 meses, com antígeno de outra partida, inclusive N 1. Novamente NEGATIVA
48	H.G.P.	1 mês	Cutânea localizada, verrucosa	N 2 — Positiva (+) P 1 — Positiva (+ +) P 2 — Positiva (+) P 3 — NEGATIVA	—

N.º	INICIAIS	TEMPO DE DOENÇA	FORMA CLÍNICA	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
49	X.I.	4 meses	Cutânea localizada, furunculóide	N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++) P 3 — NEGATIVA	—
50	L.B.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+) P 1 — NEGATIVA P 2 — NEGATIVA P 3 — NEGATIVA	—
51	N.G.	6 meses	Cutânea localizada, verrucosa	N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++) P 2 — Positiva (++) P 3 — NEGATIVA	—
52	J.G.G.	2 meses e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++) P 3 — NEGATIVA	—
53	D.C.S.	3 semanas	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (+) P 3 — Positiva (+)	—
54	J.M.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++) P 2 — Positiva (++) P 3 — Positiva (++)	—

55	J.S.M.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++++) P 3 — Positiva (++)	—
56	E.A.J.	6 meses	Cutânea localizada, ulcerosa	N 2 — Positiva (+) P 1 — Positiva (++) P 2 — Positiva (++) P 3 — NEGATIVA	—
57	I.J.R.	1 mês	Cutânea localizada, verrucosa	N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (++) P 2 — Positiva (+) P 3 — Positiva (+)	—
58	J.C.G.	4 meses	Cutânea disseminada	N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++) P 2 — Positiva (++) P 3 — Positiva (+)	—
59	H.T.F.	3 meses	Cutânea localizada, úlcero-vegetante	N 2 — Positiva (+) P 1 — Positiva (++) P 2 — Positiva (+) P 3 — NEGATIVA	—
60	J.C.L.	2 anos	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++) P 3 — NEGATIVA	—

N.º	INICIAIS	TEMPO DE DOENÇA	FORMA CLÍNICA	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
61	Y.H.	3 meses	Cutânea localizada, úlcero-vegetante	N 2 — Positiva (+) N 3 — Positiva (+)	—
62	J.D.	4 meses	Cutânea localizada, úlcero-vegetante	N 2 — Positiva (+++) P 1 — Positiva (+++) P 2 — Positiva (+) P 3 — NEGATIVA	—
63	A.L.	2 meses	Cutânea localizada, úlcero-vegetante	N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++++) P 3 — Positiva (+)	—
64	A.L.P.M.	1 mês	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+) P 1 — Positiva (+++) P 2 — NEGATIVA P 3 — NEGATIVA	—
65	N.S.	1 mês e meio	Cutânea linfática	N 2 — Positiva (+++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (+++) P 3 — NEGATIVA	—
66	G.E.C.	Teve esporotricose há 7 anos	—	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++++) P 3 — Positiva (+++)	—

B — PACIENTES PORTADORES DE MICOSES DIVERSAS

N.º	INICIAIS	MICOSE	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
67	A.P.S.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
68	S.A.A.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
69	A.S.B.	Maduromicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
70	M.M.J.	Cromomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
71	J.M.S.	Blastomicose	N 1 — Positiva N 2 — NEGATIVA	—
72	J.J.	Cromomicose	N 1 e N 2 — NEGATIVAS	—
73	M.H.F.P.	<i>Tinea glabrosa corporis</i>	N 1 — Positiva (+) N 2 — NEGATIVA	—
74	O.S.C.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
75	C.S.B.	<i>Tinea capitis</i>	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
76	O.C.O.	Actinomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

N.º	INICIAIS	MICOSE	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
77	A.F.A.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
78	J.C.S.	Blastomicose	N 1 — Positiva (+) N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
79	M.S.	Blastomicose	N 1 — Positiva (+++) N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (+++) P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
80	D.C.S.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
81	B.A.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
82	R.A.	<i>Tinea pedis</i>	N 1 — Positiva (++++) N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (+++) P 2 — Positiva (++++) P 3 — Positiva (+++)	Apresentava-se, quando foram feitas as reações, com lesões de "ides" nas mãos.
83	J.F.B.	Blastomicose e Cisticercose	N 1 — Positiva (+++) N 2 — Positiva (++) P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
84	A.N.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

85	S.E.S.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
86	T.S.	<i>Tinea glabrosa corporis</i>	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
87	O.C.S.	<i>Tinea pedis</i>	N 1 — Positiva (+++) N 2 — Positiva (++) P 1 — Positiva (+++) P 2 — Positiva (++) P 3 — NEGATIVA	Apresentava-se, quando foram feitas as reações, com lesões de "ide" nas mãos.
88	J.A.M.	Blastomicose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
89	F.N.L.	<i>Pityriasis versicolor</i>	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	Convalescentes de tétano
90	M.C.C.	Monilíase	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	Clinicamente curada
91	M.L.L.	Monilíase	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	Clinicamente curada

C — PACIENTES DIVERSOS

N.º	INICIAIS	AFEÇÃO	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
92	S.F.N.	Esquistossomose mansônica, forma hepato-esplênica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

N.º	INICIAIS	AFEÇÃO	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
93	O.B.D.	Foliculite do couro cabeludo	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
94	E.F.B.	Carcinoma da mão	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
95	I.C.S.	Tuberculose verrucosa	N 1 e N 2 — NEGATIVAS	—
96	M.J.A.	Piodermite (<i>Staphylococcus pyogenes</i> , var. <i>aureus</i>)	N 1 e N 2 — NEGATIVAS	—
97	S.S.	Osteomielite	N 1 e N 2 — NEGATIVAS	—
98	R.M.A.F.	Eritema indurado de Bazin	N 1 e N 2 — NEGATIVAS	—
99	N.M.S.	Piodermite vegetante	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
100	J.J.T.	Esquistossomose mansônica, forma hepato-esplênica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
101	A.F.D.	Síndrome de hipertensão porta	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
102	P.J.M.	Lepra tuberculóide	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

103	M.R.T.	Síndrome de hipertensão porta	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
104	D.S.	Esquistossomose mansônica, forma hépa- to-esplênica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
105	O.A.O.	Esquistossomose mansônica, forma hépa- to-esplênica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
106	M.H.M.	Furunculose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
107	W.B.S.	Esquistossomose mansônica, forma hépa- to-esplênica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
108	E.L.	Esquistossomose mansônica, forma hépa- to-esplênica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
109	N.S.O.	Esquistossomose mansônica, forma hépa- to-esplênica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
110	S.S.	Moléstia de Chagas, forma crônica	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
111	K.A.	Retículo-endoteliose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
112	J.F.S.	Tuberculose ganglionar	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
113	J.A.P.F.	<i>Alopecia areata</i>	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

N.º	INICIAIS	AFECCÃO	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
114	M.E.B.	Úlcera inespecífica da perna	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
115	D.M.	Psoríase	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
116	A.C.	Lues terciária	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
117	C.M.	Tuberculose ganglionar	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
118	D.S.	Sem diagnóstico	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
119	J.H.B.	Leishmaniose	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
120	R.B.	Eritema nodoso	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
121	W.A.	Parotidite e pancreatite de etiologia não apuradas	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
122	C.P.P.	Névus linear verrucoso	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
123	A.L.S.	Eczema	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
124	R.M.C.	Eczema	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

125	A.R.	Blefarite	N 1 — Positiva (+) N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
126	D.M.R.	Leishmaniose tegumentar	N 1 — Positiva (+) N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
127	I.B.S.	Foliculite do couro cabeludo	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
128	J.N.S.	Tuberculose cutânea, ulcerosa	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
129	N.A.S.	Leishmaniose tegumentar	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
130	J.B.R.	Líquen plano generalizado	N 1 — Positiva (+) N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
131	G.J.P.	Paquidermia plicaturata com paquiperiostoses	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
132	S.A.F.	Eczema	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
133	G.T.O.	Foliculite da pele glabra	N 1 — Positiva (+) N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
134	A.A.M.S.	Malária (<i>Plasmodium vivax</i>)	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

N.º	INICIAIS	AFECÇÃO	RESULTADO	OBSERVAÇÕES
135	F.B.L.	Esquistossomose mansônica mais <i>herpes zoster</i>	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
136	T.S.M.	Leishmaniose tegumentar	N 1 — Positiva (+) N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
137	U.M.S.	Leishmaniose tegumentar	N 1, N 2 e P 3 — NEGATIVAS P 1 e P 2 — Positiva (+)	—
138	R.P.S.	Úlcera inespecífica	N 1 e N 2 (++) P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
139	M.B.	Sem diagnóstico	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
140	L.M.	Sem diagnóstico	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
141	R.M.C.	Normal	N 1 e N 2 — Positiva (+++) P 1 — Positiva (+++) P 2 — Positiva (++) P 3 — Positiva (+)	Fêz esporotriquina com antígeno equivalente e N 1, em 1951, com resultado negativo
142	I.G.	Doença de Hodgkin	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
143	C.S.	Blefarite	N 1 e N 2 — Positiva (+) P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

144	H.S.V.	Normal	N 1 e N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++++) P 3 — Positiva (+)	—
145	J.M.S.	Erisipela	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
146	R.P.	Cisto sebáceo infetado	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
147	V.S.V.	Normal	N 2 — Positiva (+++) P 1 — Positiva (++) P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—
148	A.F.	Carcinoma baso-celular da asa do nariz	N 1 e N 2 — Positiva (++++) P 1 — Positiva (++++) P 2 — Positiva (++) P 3 — Positiva (+)	—
149	P.L.C.	Tuberculose ganglionar	N 1, N 2, P 1, P 2 e P 3 — NEGATIVAS	—

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos da Silva Lacaz, que nos dá a honra de sua amizade desde os bancos acadêmicos e que nos iniciou nos estudos de Microbiologia, em que vemos o mestre, sempre pronto a estimular e orientar.

Aos Professôres João de Aguiar Pupo e João Alves Meira, pelas facilidades proporcionadas nas Clínicas que dirigem; aos colegas Drs. Sebastião A. P. Sampaio e Thales de Brito, sem cuja orientação e efetivo auxílio não teria sido possível o estudo histopatológico da reação; aos colegas Drs. Guilherme Villela Curban e Norberto Belliboni, pelos numerosos casos que tiveram a gentileza de nos enviar; aos nossos amigos Drs. Celeste Fava Netto e Vicente Amato Neto por valiosas sugestões feitas; ao técnico Victor Salcedo Vega, pelo préstimo constante no preparo dos antígenos; à Srta. Hercy de Souza Valle, pelo auxílio na dactilografia e mimeografia e à Srta. Hermínia Muzanek, pelo auxílio na parte bibliográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTHUR, G. W. & ALBRITAIN, J. W. — Disseminated cutaneous Sporotrichosis with systemic involvement. *A. M. A. Arch. Dermat. & Syph.*, 77: 187-190, 1958.
- BAPTISTA, L., BELLIBONI, N. & CASTRO, R. M. — Caso de esporotricose tratado pelo Antimoniato de N-metil-glucomine. *Rev. Paulista Med.*, 41: 24-27, 1952.
- BELLIBONI, N. — Tratamento da esporotricose pelo Dietilbestrol. *Rev. Hosp. Clín.*, 11: 383-387, 1956.
- BELLIBONI, N. & PATRÍCIO, L. D. — Tratamento da esporotricose pelo Glucantime. Considerações a respeito de dois casos. *Rev. Hosp. Clín.*, 11: 118-120, 1956.
- BERTIN & BRYANT, L. — Sporotrichose gommeuse du bras. Par inoculation accidentelle de laboratoire. *Presse med.*, 18: 355-356, 1910.
- CAMPBELL, C. C. — Use of Francis' glucose cystine blood agar in the isolation of *Sporotrichum schenckii*. *J. Bact.*, 50: 233, 1945.
- CASTRO, B. M. — Esporotricose. Erros de diagnóstico. *Rev. med. e cir. São Paulo*, 16: 73-80, 1956.
- CHOPIN, M. — Intradermo-réaction sporotrichosinique. *Thèse Fac. Méd. Paris*, 1910.
- CONANT, N. F. — The laboratory diagnosis of pulmonary mycosis. *Am. Rev. Tuberc.*, 61: 690-704, 1950.
- CONANT, N. F. SMITH, D. T. BAKER, R. D. CALLAWAY, J. L. & MARTIN, D. S. — Manual of clinical mycology. Philadelphia, Saunders, 1954.
- DE BEURMANN — Comentário. *Bull. Soc. Franç. Dermat. et Syph.*, 20: 367-368, 1909.
- DE BEURMANN — L'intradermo-réaction sporotrichosinique. *Bull. et mem. Soc. méd. hóp. Paris*, 28: 393-396, 1909a.
- DE BEURMANN & GOUGEROT — Observation de Bruno Bloch, de Bâle: Sporotrichose aigue febrile gommeuse disséminée. Ostéite de la clavicule et du sternum.

Diazo-réaction de Ehrlich positive, cuti-réaction sporotrichosinique positive. *Bull. Soc. Franç. Dermat. et Syph.*, 20: 367-368, 1909.

DE BEURMANN & GOUGEROT — Les sporotrichoses. Paris, Félix Alcan. 1912.

DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. Public Health Service, 1954. Histoplasmin - stock (undiluted) antigen for investigative use in medical research only; directions.

DU TOIT, C. J. — Sporotrichosis on the Witwatersrand. *Proc. Transvaal Mine Med. Officers*, 22: 111-127, 1942.

FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídico. *Arq. cir. clin. exper.*, 18: 199-254, 1955.

GELBER, A. — Sporotrichosis; report of a case of its occurrence in California. *A. M. A. Arch. Dermat. & Syph.*, 54: 208-209, 1946.

GONÇALVES, A. PADILHA & CARVALHO, L. P. — Apreciação do teste intradérmico com a esporotriquina. *Rev. med. Paraná*, 24: 73-82, 1955.

GONZALEZ OCHOA, A. — Esporotricosis (In Simons, R. G. D. Ph. — *Dermatología Tropical y Micología médica*). México, La Prensa Medica Mexicana, 1959. Vol. II, pág. 1.129-1.145.

GONZALEZ OCHOA, A. & SOTO FIGUEIROA, E. — Polisacaridos del *Sporotrichum Schenckii*. Datos inmunológicos. Intradermo-reacción en el diagnóstico de la esporotricosis. *Rev. Inst. Salub. Enjerm. Trop.*, 8: 143-153, 1947.

JANKE, D. — Zur systematischen Einordnung des *Sporotrichum Gougeroti*. *Arch. Dermat. u. Syph.*, 187: 484-710, 1948.

KATZENSTEIN, L. — Specificity of skin tests in deep fungus infections. *J. Invest. Dermat.*, 9: 249-253, 1947.

LACAZ, C. S., CASTRO, R. M. & LOPES, A. A. — A esporotriquina no diagnóstico da esporotricose. Comunicação à X Reunião Anual dos Dermato-sifilógrafos Brasileiros. Curitiba, 1953.

LACAZ, C. S., PASSOS FILHO, M. C. R., FAVA NETTO, C. & MACARRON, B. — Contribuição para o estudo da "blastomicose-infecção". Inquirido com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidicos positivos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 1: 245-249, 1959.

LATAPI, F., LAVALLE, P., NOVALES, J. & ORTIZ, Y. — Griseofulvina en micosis cutaneas profundas. Nota preliminar sobre resultados terapeuticos en un caso de micetoma por *N. brasiliensis* y en uno esporotricosis por *S. schenckii*. *Dermatologia*, 3: 34-41, 1959.

LAVALLE, P. — Esporotricosis en Mexico. Memorias del III Congreso Ibero Latino Americano de Dermatologia, 1959. Pág. 190-197.

LEIBY, C., SULZBERGER, M. & BAER, R. L. — Sporotrichosis in New York State. *Arch. Int. Med.*, 75: 145-150, 1945.

LOEWENTHAL, K., TOLMACH, J. A. & KARPLUK, F. — Dermoepidermal type of Sporotrichosis. *New York State J. Med.*, 50: 451-454, 1950.

MACKINNON, J. E., ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R. C. & ARROYO, L. — Micosis profundas endemicas: nuevas orientaciones y adquisiciones clínicas. Importancia del problema en el Uruguay. *An. Fac. Med. Montevideo*, 38: 428-445, 1953.

MACKINNON, J. E., ARTAGAVEYTTIA-ALLENDE, R. C. & ARROYO, L. — I. Sobre la especificidad de la intradermoreacción con paracoccidioidina. *An. Fac. Med. Montevideo*, 38: 363-382, 1953.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL — Memorandum n.º 23. Nomenclature of fungi pathogenic to man and animal, 1953.

MIRANDA, R. N., CUNHA, C., PINHO, A. & SCHWEIDSON, J. — A esporotricose. *Rev. med. Paraná*, 24: 24-56, 1955.

MIRANDA, R. N., CUNHA, C. & SCHWEIDSON, J. — Observações sobre o teste com a esporotriquina. Possível ação curativa na esporotricose. (Nota prévia). *An. brasil. dermat. & síf.*, 30: 280-281, 1955a.

MIRANDA, R. N., CUNHA, C. & SCHWEIDSON, J. — Tratamento da esporotricose pela esporotriquina. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 54: 257-262, 1958.

MOORE, J. J. & DAVIS, J. D. — Sporotrichosis following mouse bite with certain immunologic data. *J. Infect. Dis.*, 23: 252-266, 1918.

NORDÉN, A. — Sporotrichosis. Clinical and laboratory features and a serologic study in experimental animals and humans. *Acta Path. Microb. Scandinav. Suppl.* 89, 1951.

PAUTRIER, L. M. & LUTEMBACHER — Sub-cuti-réaction positive obtenue chez deux sporotrichosiques par l'injection sous-cutanée de cultures jeunes de sporotricose, bruyées, diluées dans du serum et stérilisées. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 47: 24-25, 1909.

PAUTRIER, L. M. & LUTEMBACHER — Nouveau cas de sporotricose simulant la tuberculose de la face; diagnostic par une sub-cuti-réaction sporotrichosique positive. *Bull. Soc. Franç. Dermat.*, 20: 254-257, 1909a.

PEREIRA, C. A. — Contribuição ao estudo de valor prático da intradermo-reação com a esporotriquina no diagnóstico da esporotricose. *Rev. med. Paraná*, 24: 83-85, 1955.

PUPPO, J. A. — Freqüência da sporotricose em São Paulo. *An. paulist. med. e cir.*, 8: 53-68, 1917.

PUPPO, J. A. — Sporotricose no Brasil. *Arz. paulist. med. e cir.*, 8: 200-207, 1920.

RAY, L. F. & ROCKWOOD, R. M. — Sporotrichosis. Report of a case in which it was resistant to treatment. *A. M. A. Arch. Dermat. & Syph.*, 46: 211-217, 1942.

SAMPAIO, S. A. P., LACAZ, C. S. & ALMEIDA, F. P. — Aspectos clínicos da esporotricose em São Paulo. Análise de 235 casos. *Rev. Hosp. Clín.*, 9: 391-402, 1954.

SHAFFER, I. W. & ZACKHEIN, H. S. — Sporotrichosis; report of a case in which treatment with iontophoresis was successful. *A. M. A. Arch. Dermat. & Syph.*, 56: 244-247, 1947.

SHOEMAKER, E. H., BENNETT, H. D., FIELDS, W. S., WHITCOMB, F. C. & HALPERT, B. — Leptomenigitis due to *Sporotrichum Schenckii*. *A. M. A. Arch. Path.*, 64: 222-227, 1957.

SICARD & GOUGEROT — Comentário. *Bull. et mém. Soc. méd. hôp. Paris*, 26: 76-77, 1908.

SILVA, J. R. & GONÇALVES, A. P. — Nota sobre o valor da esporotriquina. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 38: 625-631, 1950.

SMITH, L. M. — Sporotrichosis. Report of four clinically atypical cases. *Southern Med. J.*, 38: 505-509, 1945.

SOARES, J. A., RIBEIRO, D. O. & LACAZ, C. S. — Esporotricose familiar. *An. brasil. dermat. & síf.*, 27: 5-11, 1952.

THOMAS, C. C., PIERCE, H. E. & LABINER, G. E. — Sporotrichosis responding to fever therapy, *J. A. M. A.*, 147: 1.342-1.343, 1951.

WILSON, J. W. — Clinical and immunological aspects of fungus diseases. Springfield, Charles C. Thomas, 1957.

WILSON, J. W. — Os testes intradérmicos nas micoses. *Triângulo*, 4: 30-36, 1959.

O FEIJÃO COMUM

Taxinomia, morfologia, histologia, parasitologia,
microbiologia, composição química e usos

J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR (*)

Sinonímia científica — *Phaseolus vulgaris* L. (*Leguminosae-Papilionaceae*). O feijão é conhecido, em diferentes países, com os nomes seguintes: *Haricot* (França) — *Common Bean* (Estados Unidos) — *Fagiolo* (Itália) — *French-bean* (Inglaterra) — *Bohne* (Alemanha) — *Poroto*, *Frijol*, *Caraotas* e *Judia* (Espanha).

Planta anual, originária do Peru. Segundo VARGAS SACO (1954), testemunhos fitomórficos evidenciam que esta espécie foi domesticada em época pré-incaica, tendo sido amplamente cultivada durante o grande Império dos Incas e conhecida como *quichua de puruto*. Posteriormente se disseminou em outras regiões da América e, logo após o descobrimento deste continente, foi introduzido na Europa, talvez em 1540, e depois na Ásia, para adquirir, desde então, grande importância na alimentação popular.

O gênero *Phaseolus* compreende umas 200 espécies tropicais e subtropicais, com inúmeras variedades consideradas originárias da Ásia e da América Meridional.

O termo "Feijão", no sentido lato, abrange as sementes de várias leguminosas, como: feijão guandu, feijão soja, feijão fava, e, no sentido restrito, é aplicado ao feijão comum ou vulgar, da espécie *Phaseolus vulgaris* L.

Entre as leguminosas cultivadas, os feijões, representados pelos diferentes gêneros, espécies e incontáveis variedades, constituem, por seu intenso uso, a base da alimentação azotada do sertanejo, do trabalhador rural e da classe pobre, que substituem a carne pelo

(*) Químico do Instituto Adolfo Lutz.
Recebido para publicação em 3 de maio de 1960.

feijão, e, como um complemento da alimentação variada está, diariamente à mesa do rico, como fonte de proteínas, de carboidratos e de sais minerais, de elevado valor dietético e nutritivo.

O feijão, como a batatinha, a mandioca, o milho, o amendoim e muitas outras plantas cultivadas, constitui uma contribuição das Américas à agricultura mundial.

TAXINOMIA — De acôrdo com Engler, a classificação do feijão é a seguinte:

Divisão	Fanerógamas
Subdivisão	Angiospermas
Classe	Dicotiledôneas
Ordem	Rosales
Família	Leguminosas
Subfamília	Papilionáceas
Tribo	Faseóleas
Gênero	<i>Phaseolus</i>
Espécie	<i>vulgaris</i>

Número somático (diplóide): $2n = 22$ cromossomos.

VARIEDADES — O número de variedades de feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* L. é muito grande, elevando-se a muitas centenas, tendo-se em conta as diversas variedades e formas típicas de países em que esta preciosa leguminosa é cultivada, quer seja dos grupos de feijões trepadores ou anões, quer seja dos com pergaminho ou sem êle.

Diferentes tipos de feijões, de côres e formatos os mais diversos, são encontrados no mercado, porém nem todos pertencem à espécie *P. vulgaris* e sim a espécies e gêneros diversos.

LERENA G. (1945) refere-se às seguintes espécies do gênero *Phaseolus*, originárias da Ásia e de regiões tropicais e subtropicais da América do Sul: *Phaseolus vulgaris* L.; *P. multiflorus* Willd.; *P. compressus* D. C.; *P. saponaceus* Savi; *P. oblongus* Savi; *P. pallar* Molina; *P. mungo* L.; *P. radiatus* L.; *P. vexillatus* L.; *P. aconitifolius* Jacq. e *P. max* L.

WINTON & WINTON (1935) citam os estudos de Martens (1869), sobre 123 variedades distintas, agrupadas nas 7 raças ou subespécies seguintes: *P. vulgaris* Savi, *P. compressus* Savi, *P. gonospermus* Savi, *P. carinatus* Martens, *P. oblongus* Savi, *P. ellipticus* e *P. sphaericus* Martens.

No Peru, são cultivadas, para a obtenção de vagens e de grãos secos, as variedades seguintes: *Mont d'Or*, *Beautiful*, *Sin Rival*, *Manteca Henderson*, *Belgica Argel*, *Saint Fiacre*, *Balin de Vigénano*, *Lima*.

Na Argentina, cultivam-se as seguintes variedades: *Balin Regina*, *Balin de Albenga*, *Gigante de Praga*, *Burlotto*, *Balin Milanés*, *Cordobés*, *Saint Fiacre*, *Algarrobeño*, *Phenomène*, *White Creaseback*.

Nos Estados Unidos, conforme estatuem ALLARD & ZAUMEYER (1944), dentre as numerosas variedades existentes da espécie *P. vulgaris* L., são cultivadas as seguintes: *Alabama*, *Cutshort*, *Low Champion*, *Ideal Market*, *Kentucky Wonder*, *Logan Giant*, *White Cornfield*, *Red Mexican*, *Idaho Refugee*, *Boston Yellow Eye*, *Red Kidney* e outras.

No Brasil, as variedades mais cultivadas são as dos feijões Mulatinho e Prêto, sendo a primeira mais preferida em São Paulo, Minas Gerais e Goiás e, a segunda, no Rio Grande do Sul, Bahia e Guanabara. LOBBE (1942) submeteu à cultura experimental, no Campo de Sementes de São Simão, no Estado de São Paulo, 84 variedades diversas de feijão, originárias do país e do estrangeiro, com o fim de determinar as variedades que oferecessem condições econômicas de grande produção, precocidade, qualidades de conservação e resistência às moléstias e pragas, concluindo que as variedades Mulatinho e Prêto ofereciam vantagem especial na cultura, além da grande aceitação pelo mercado. Afora estas duas variedades do grupo dos feijões anões ou de arrancar, outras são plantadas, em menor escala: Branco, Catiara, Bico de Ouro, Chumbinho, Cavalo, Enxôfre, Manteiga, Mangalô, Fradinho, Praia, Tepari, Macassá, Quebradeira e outras.

Segundo PIMENTEL (1948), no Rio Grande do Sul, muitas são as variedades cultivadas e, tão fixas, que podem ser consideradas raças. Entre elas destacam-se as seguintes: Feijão Tupi e Feijão Branco, *P. vulgaris* L., subespécie *compressus* D. C.; Feijão da Praia, *P. vulgaris*, L., subespécie *oblongus* Savi. Dessas subespécies há muitas raças, como: Carioca (*ellipticus*), Carioquinha (*compressus*), Ervilha, Enxôfre, etc. Entretanto, são preferidas as variedades de Feijão Prêto, por serem mais nutritivas e de melhor sabor, não deixando de ser apreciados os feijões de côr: Tupi, Pardacento, Unicolor e o Carioquinha, variedade de vermelho e prêto.

A Bolsa de Cereais de São Paulo, órgão técnico e consultivo do poder público, classifica os feijões em grupos de variedades, como segue:

“1.º grupo: Variedades anãs ou de pequeno porte, que se caracterizam pela vegetação e pelos grãos pequenos, de massa compacta e consistência dura; são de duas safras, da seca e das águas, com arrancamento total da planta.

São desse grupo os feijões: Chumbinho, Opaco e Lustroso; Chocolate, também, chamado Cara Suja; Muiatinho Claro e Barreado; Bico de Ouro, Ourinho, também chamado Lambe-Beijo; Roxinho, Rosinha, Canário, Pretinho, conhecido também por Feijoada, Santa Catarina ou Rio Grande; Branquinho, etc., num total de 32, mais ou menos. Na roça, são conhecidos por “quebra-cadeiras”, devido à posição arcada exigida na colheita. Servem de alimento substancial ao homem.

2.º grupo: Variedades trepadeiras, que se caracterizam pelos cipós (lianas) e pelos grãos grandes, alongados, com formato de semi-elipse e consistência mole, são de uma safra anual, conservando-se os pés durante 2 ou 3 anos; as vagens são colhidas verdes ou secas. São desse grupo os feijões:

Rajado — (das mais variadas cores; em preto, é o conhecido “RABO DE GALO”);

Branção — Também conhecido por Chileno, *Flagiolet*, *Mont d'Or* de origem francesa, etc., num total de 16, mais ou menos. Na roça, são conhecidos por “Feijão de Vara”. Servem de alimento auxiliar, cozido com carne.

3.º grupo: Variedades rasteiras, que se caracterizam pelo afolhamento e se destinam à adubação verde, forrageamento e sombreamento do solo; os grãos são pesados (mais de um (1) grama) e o tegumento ou feixo umbelical é saliente e bicolor, de consistência dura e contém óleo; são de safra anual, pertencem a este grupo os feijões: *Mucuna Branca*, também chamado “Feijão de Porco”; *Mucuna Preta*, também chamado “Purga”; *Mucuna Rajada*, também conhecido por “Fava Flora”, etc., num total de seis (6), mais ou menos. Não servem para alimento mas têm aplicação na indústria de matéria plástica, aliados ao feijão soja.

4.º grupo: Variedades “meios-cipós”, com vegetação um pouco maior que a do primeiro grupo; grãos alongados, retos, com uma ponta em bisel e outra ogival, de consistência mole, porém um pouco

mais resistente que a do 2.º grupo; são de 2 safras anuais — a da seca e a das águas. Pertencem a este grupo os feijões: Chumbão, Jalo, Enxôfre, Manteiga Paulista, Manteiga Mineiro, etc., num total de 16, mais ou menos. Servem de alimentação auxiliar, suprimindo a básica, às vezes.

5.º grupo: Variedades de feijões mistos, em número ilimitado, de porte arbóreo; os grãos são arredondados e em forma de amendoim, sendo os menores de formatos variados (1.º, 2.º e 4.º grupos), tendo o hilo saliente e descentralizado, mais ou menos a altura de 2/3 dos grãos comuns e de consistência petrificada; são de safra anual. Pertencem a este grupo os feijões: Soja, Sete Camadas, Fradinho (*Cow-Pea*), *Adzuki* ou Japonês (há-os de tôdas as côres); Guano ou Guandu, Ôlho de Cabra, etc.

Na roça, são conhecidos por “Feijão Escalda-pé”. Servem para folheamento, vegetação e diversas aplicações industriais.”

ÉPOCAS DE PLANTIO E DE COLHEITA — A época de sementeira do feijão varia com as condições locais de temperatura e umidade, podendo ser plantado em dois períodos do ano, desde que as regiões escolhidas não sejam sujeitas a freqüentes chuvas.

No Norte e Nordeste brasileiros, a época de sementeira está compreendida entre os meses de janeiro a maio; no Sul do país, conforme esclarece LOBBE (1942), há duas épocas de plantio, situadas, aproximadamente, de janeiro a março e de setembro a novembro, nas quais são produzidos, respectivamente, o feijão da seca ou do frio e o feijão das águas. O primeiro colhe-se de março a abril e o segundo, de dezembro a janeiro. A colheita é feita de 80 a 120 dias após o plantio, dependendo da variedade escolhida, das condições do solo e do clima.

Informa VIEIRA (1959), que o feijão da seca, apesar de não dar rendimentos altos, é preferido porque oferece maior garantia aos agricultores, por estar menos sujeito ao efeito maléfico das chuvas durante a colheita que se faz de maio a junho. O feijão das águas, não sendo prejudicado pelas chuvas por ocasião da colheita, é mais produtivo que o feijão da seca, muito embora seja menos resistente ao ataque por parasitos e moléstias criptogâmicas, podendo germinar facilmente quando conservado em ambientes úmidos.

NEME (1945), de acordo com experiências feitas no Instituto Agrônomico de Campinas, concluiu que a sementeira deve ser pra-

ticada obedecendo a distâncias que permitam o máximo de rendimento, pois ficou comprovado, por êsses estudos, que “deixando-se 2 plantas a cada 20 cm, ao invés de uma, consegue-se um aumento de cêrca de 10%. Entre fileiras, o espaçamento de 40 cm é o mais vantajoso, pois, tem-se verificado, experimentalmente, que, com êsse espaçamento, se obtêm 25 a 30% mais do que com o de 60 cm entre fileiras”.

Entre nós, a colheita do feijão é quase tôda praticada à mão, arrancando-se as plantas e transportando-as para o terreiro onde completam a secagem, sendo em seguida batidas, por meio de varas flexíveis e separadas as sementes por meio de peneiras. Para melhor conservação do produto, costuma-se expurgá-lo, logo após a colheita, empregando-se 25 g de sulfureto de carbono (formicida) por m³, durante 24 horas.

CULTURA E PRODUÇÃO — O feijão é cultivado em quase tôdas as regiões quentes ou temperadas do globo. Antes de 1914, éramos importadores de feijão, sendo Portugal e Chile os nossos principais fornecedores. Dessa data em diante, a produção brasileira cresceu acentuadamente, de forma que, libertados daquela dependência, tornamo-nos, hoje, um dos maiores produtores do cereal.

A maioria dos estados brasileiros produz feijão para o seu próprio consumo, destacando-se, entre êles, pela ordem de importância: Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo e Goiás, locais onde a produção bastante desenvolvida, pode atender ao consumo interno do país, havendo, ainda, exportação do excedente, aliás de pequeno vulto, para o estrangeiro.

O Brasil está colocado entre os maiores produtores mundiais de feijão, como a Índia, a China, os Estados Unidos e o México, tendo ocupado, por várias vêzes, o primeiro lugar, muito embora sòmente pequena parte da produção dêsse cereal, em nosso país, seja feita em condições econômicas de cultura, com o auxílio de máquinas (semeadeira, cultivador, ceifadeira), eis que a maior parte do plantio do feijão continua a ser ainda processada à custa do braço humano, como cultura intercalar ou acessória, nas fazendas de café, das plantações de trigo e de milho.

A cultura exclusiva em área apropriada é menos dispendiosa que a intercalar, exige menos número de horas de trabalho e possibilita produção mais barata.

A média de produção em terras de fertilidade natural, correndo o tempo normalmente, pode atingir de 1.200 a 2.000 kg por hectare

e até 2.500 kg, em condições especiais de cultura. Em terras fracas, a média raramente ultrapassa a 850 kg p/ha (14 sacas).

A produção brasileira, em 1956, de acôrdo com dados estatísticos da F.A.O., alcançou 1.685.000 t de feijão contra 1.329.000 da Índia, 1.129.000 da China, 782.000 dos Estados Unidos e 459.000 do México.

Em 1959, segundo resultados oficiais do Ministério da Agricultura, a nossa produção, em toneladas, foi de 1.490.899 t, assim distribuída:

Paraná	303.000 t
Minas Gerais	261.720 t
Rio Grande do Sul	143.863 t
São Paulo	124.620 t
Ceará	109.639 t
Outros Estados	548.057 t

A produção mundial no ano de 1958, de acôrdo com o "Anuário da Produção" da F.A.O., foi a seguinte, excluída a Rússia:

Mundial	7.800.000 t
Ásia	3.130.000 t
Extremo Oriente	2.990.000 t
América Latina	2.350.000 t
Europa	950.000 t
América do Norte	740.000 t
África	620.000 t
Oriente Próximo	170.000 t

Para o sucesso da cultura, diz NEME (1945), devem ser exigidas sementes comprovadamente produtivas, quaisquer que sejam os tipos preferidos.

O feijão, em nosso país, somente será produzido em abundância e barato, quando a respectiva cultura deixar de ser subsidiária para se tornar de plantio técnico, mecanizado, amplo e de condições econômicas.

CARACTERES BOTÂNICOS — O feijão é dividido geralmente em dois grupos principais: o dos feijões trepadores ou de corda e o dos feijões anões ou de arrancar.

CAULE — Apresenta talos ásperos, delgados, longos e ramificados nas variedades trepadoras, e curtos nas variedades anãs.

FÔLHAS — As folhas são grandes e formadas por três folíolos triangulares ou ovais, acuminados, articulados, pubescentes e ásperos ao tato.

RAÍZES — São profundas e bastante ramificadas, com nodosidades próprias das leguminosas, produzidas pelas bactérias da nitrificação (*Bacillus radicicola*).

FLÔRES — Comumente de cor branca, branca manchada de verde, amarela, vermelha ou inteiramente violeta, ou púrpura, são em número de duas a oito, e de conformação bastante irregular. Reunidas em cachos ou racimos axilares, possuem corola irregular formada por estandarte orbicular e encurvado, duas asas e uma quilha, nove estames soldados e um livre, cálice imperceptível, com indistinta divisão entre os dois lobos superiores, e estilete aderente e piloso no interior da corola.

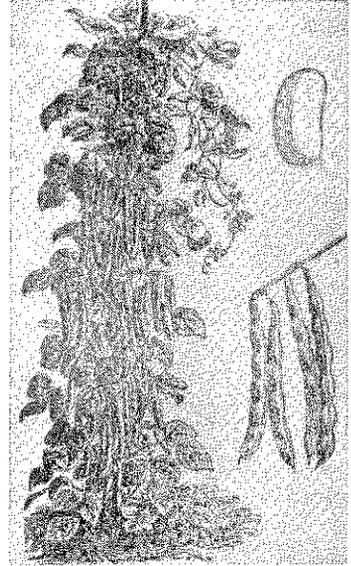


Fig. 1 — Feijão de trepar ou de corda.

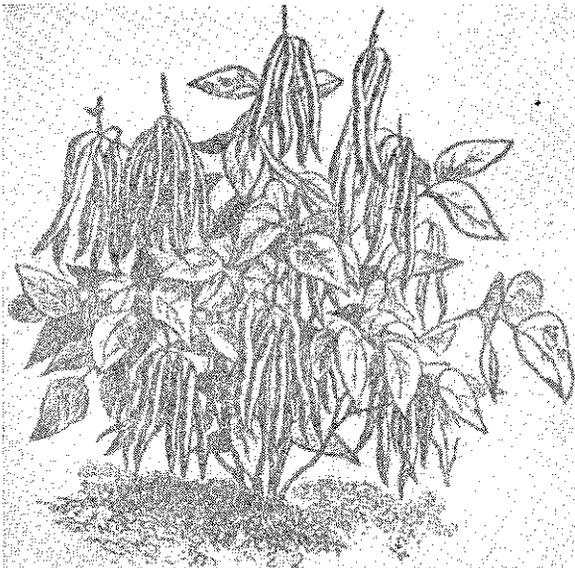


Fig. 2 — Feijão anão ou de arrancar.

FRUTO — É uma espécie de cápsula denominada legume, de forma cilíndrica ou achatada, curta ou comprida (de 12 a 15 cm ou mais), reta ou ligeiramente curva e de variadas cores, segundo as variedades.

Consoante LERENA (1945), o feijão pode ser classificado, conforme a consistência da vagem, em dois grupos:

- a) Frutos com pergaminho — Vagens geralmente muito duras, sendo consumidos unicamente os grãos ou sementes, verdes ou maduras.
- b) Frutos sem pergaminho — Vagens tenras, muito apreciadas para serem consumidas ainda verdes e os grãos utilizados verdes ou maduros (secos). A estrutura microscópica do fruto verde (vagem) será tratada no trabalho LEGUMES.

MORFOLOGIA DA SEMENTE — A semente é, de ordinário, reniforme, podendo se apresentar, todavia, ovóide, alongada ou quase esférica, tôdas estas formas, de algum modo, achatadas. Mostra variedade de côres: verde, amarela, parda, vermelha, branca, preta, violeta ou rajada com manchas escuras; hilo elíptico ou oval, às vêzes, saliente, prêso unicamente à casca, de côr branca, preta ou parda, medindo, no máximo, 1/3 do comprimento do grão; o estrofiolo formado por duas protuberâncias redondas e situado logo abaixo do hilo; micrópila visível, próxima ao hilo, na sutura superior e a rafe, implantada na região inferior como sulco ou costura do espermoderma, partindo do estrofiolo até a extremidade inferior do grão.

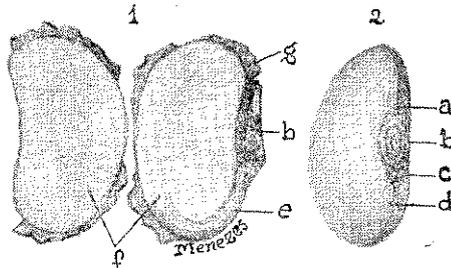


Fig. 3 — Morfologia da semente de feijão comum. 1. Semente aberta — 2. Semente ao natural: a) micrópila; b) hilo; c) estrofiolo; d) rafe; e) plântula; f) cotilédones; g) restos de espermoderma (película). A plântula (e) está colocada na extremidade do grão, próxima à micrópila.

O embrião ou plântula é cilíndrico, estreito, alongado como um cordão, curvo, e se acha entre os dois cotilédones. Êstes permanecem aderentes lateralmente à plantinha, durante a germinação. A semente tem poder germinativo que se prolonga por dois a três anos.

Pêso das sementes — Cem sementes pesam:

Variedades de grãos pequenos	de 18 a 22 g
Variedades de grãos médios	de 27 a 34 g
Variedades de grãos grandes	de 34 a 45 g

O desenho abaixo, representando os caracteres histológicos do feijão torrado, pertence ao nosso trabalho FRAUDES DO CAFÉ (1952), e aqui o reproduzimos para ilustrar a estrutura microscópica do feijão cru, pela simples razão de, praticamente, não sofrer o feijão, pelo aquecimento, modificação em seus tecidos, a não ser no conteúdo celular do parênquima amilífero, como se pode notar na respectiva figura.

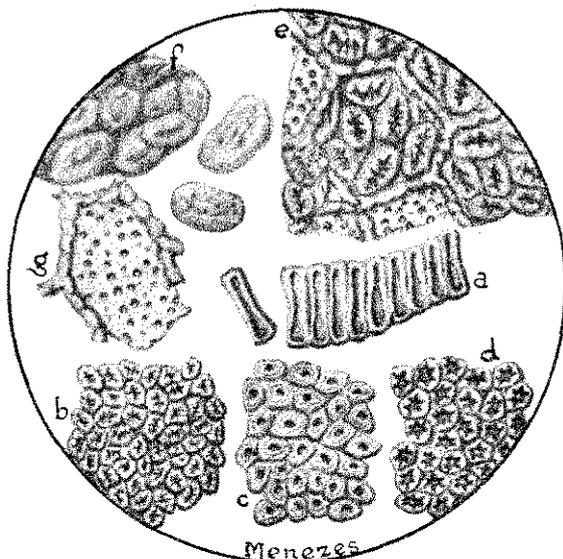


Fig. 4 — Elementos histológicos do feijão torrado (400 x). Original.

ESTRUTURA MICROSCÓPICA — Espermoderma — a) Células paliçádicas, estreitas e moderadamente alongadas, com aproximadamente 60 μ de largura; b) camada de células paliçádicas observada pela parte superior ou externa; estas células são ligeiramente poligonais, pequenas, sulcadas por pequenos raios à semelhança de grãos de amido do próprio feijão; c) camada de células paliçádicas observada pela parte inferior ou interna; são isodiamétricas ou levemente poligonais, um pouco mais largas que as da parte externa e possuem pequenas manchas ou perfurações circulares

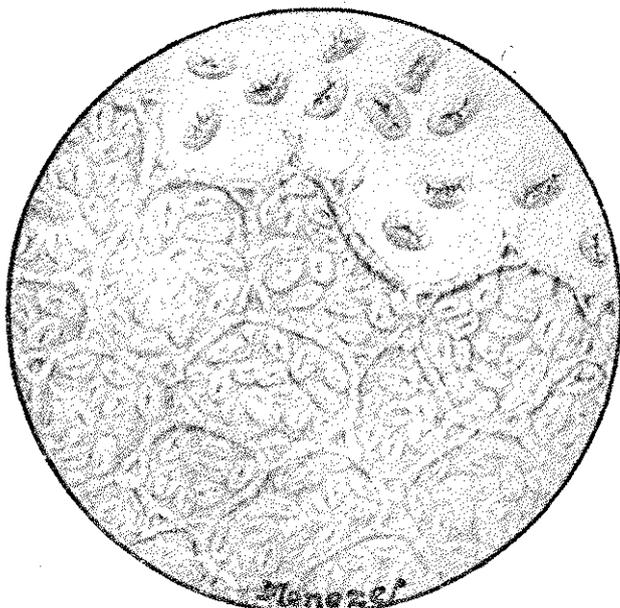


Fig. 5 — Parênquima amilífero do feijão cru — Corte transversal (400 x). Original.

na parte central; d) subepiderme de células isodiamétricas, apresentando pequenas estrelas no interior, quando observadas de

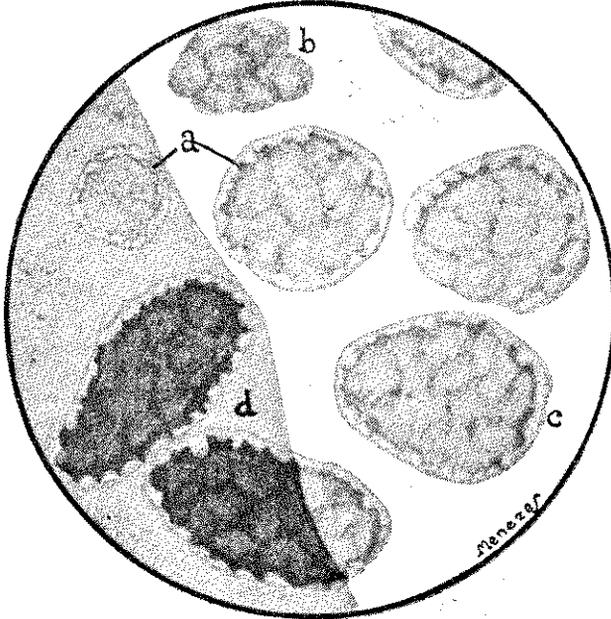


Fig. 6 — Feijão cozido em água — células amilíferas, alteradas e sob a ação do lugol (400 x). Original.

superfície; em corte transversal da semente, esta camada se constitui por fileira de células quadrangulares com cristais monoclinicos em cada uma delas, não exibindo, entretanto, as características células em forma de carretéis, peculiares às leguminosas-papilionáceas. Embrião — e) Parênquima amilífero, constituído por células poligonais ou isodiamétricas, de paredes grossas, nodosas, e grãos de amido reniformes, elípticos ou triangulares, com hilo linear, ocupando quase o comprimento do grão, donde partem pequenos raios; f) substância amilífera do conteúdo celular, fortemente alterada pelo calor e que se desprende inteira, do interior das células, pela ruptura das mesmas; g) membrana celular, de paredes nodosas, apresentando poros arredondados.

Os cotilédones do feijão cru são constituídos de células isodiamétricas, de paredes grossas, porosas, e meatos intercelulares em quase tôdas as suas ligações. Por efeito de aquecimento, entretanto, sensível transformação se passa no parênquima amilífero dos cotilédones do feijão, conforme se pode notar na fig. 6.

MENEZES (1946), em estudos sôbre alterações da estrutura vegetal pela ação do calor, constatou que, após cozimento em água, as células do parênquima se desprendem, aumentam de volume, tomam coloração amarelada e adquirem aspecto de ôvo de parasito. A membrana celular apresenta contornos mais vivos e os espaços constituídos pelos poros assemelham-na a esclérulas, fig. 6, a; em b,

um pequeno bloco de grãos de amido bastante alterados por efeito do cozimento; êste bloco se destaca do envoltório celular partido e permanece intacto, devido à goma que une os grãos entre si;

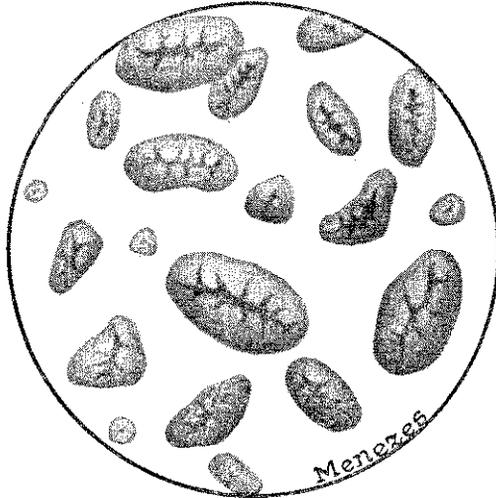


Fig. 7 — Amido de feijão (400 x). Original.

O amido apresenta-se, ao microscópio, sob a forma de grandes grãos reniformes, ovóides, irregularmente cilíndricos ou quase esféricos. O hilo é bem marcado, linear, ocupando quase todo o comprimento do grão e emitindo, de um e de outro lado, pequenos prolongamentos. As estrias são bem visíveis e, à luz polarizada, a cruz é bastante acentuada.

O amido de feijão não é preparado para fins culinários e industriais. Os japoneses utilizam a massa de feijão cozido na manufatura de certos doces (manju).

PARASITOS — Estão compreendidos entre os insetos, os acarinos e os vermes, os numerosos parasitos que atacam o feijão, quer no campo, quer nos armazéns ou depósitos.

BENLLOCH (1955) considera, de todos os insetos que atacam as leguminosas, o *Bruchidius (Acanthoscelides) obtectus* Say., o que maiores danos causa ao feijão. Êste gorgulho ataca

as sementes no campo e nos depósitos, por contínuas gerações, destruindo completamente as sementes maduras do feijão. O inseto voa do campo para os armazéns e penetra o grão, fazendo pequenas

c — célula amilífera inteira com o conteúdo acentuadamente alterado; *d* — duas células amilíferas sob a ação do lugol, vendo-se a característica reação de côr azul sofrida pelo amido, quase todo transformado em goma.

AMIDO DO FEIJÃO —

O amido apresenta-se, ao microscópio, sob a forma de grandes grãos reniformes, ovóides, irregularmente cilíndricos ou quase esféricos. O hilo é bem marcado, linear, ocupando quase todo o comprimento do grão e emitindo, de um e de outro lado, pequenos prolongamentos. As estrias são bem visíveis e, à luz polarizada, a cruz é bastante acentuada.

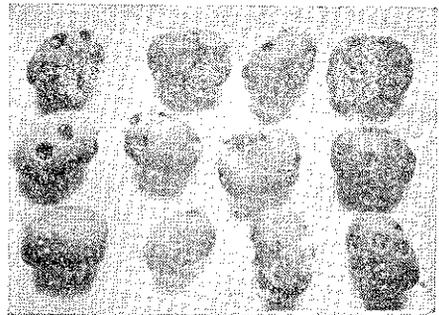


Fig. 8 — Sementes perfuradas pelo gorgulho do feijão.

perfurações circulares e deixando, à superfície, numerosos ovos que se apresentam como diminutos pontos brancos (fig. 8).

BONDAR (1930) cita os seguintes insetos como os principais inimigos do feijoeiro:

Sphallenum setosum Germ. — Larva da haste.

Neobrotica sexplagiata Jac. — Besourinho dos feijões *Dolichos*, como o mangalô; perfura as fôlhas.

Anoplitis canavaliae Mek — Ataca as fôlhas.

Xenochalepus ancora Chap. — Os adultos alimentam-se das fôlhas.

Zurus aurivillianus Hllr. — Larvas dos tecidos do caule, no qual fazem galerias longitudinais.

Metoposoma canavaliae Marsh. — Broca das hastes.

Conotrachelus phaseoli Marsh. — Broca da raiz, do colo e da haste.

VARGAS SACO (1954) menciona, como mais comuns no Peru, os parasitos seguintes:

Bruchus rufimanus Boh. — Gorgulho do feijão.

Rhizopertha dominica Fabr. e *Sitophilus oryzae* L. — Parasitos das gramíneas (cereais), porém, atacam os grãos de feijão armazenados.

Epinotia opposita Heinr. — Perfura o caule.

Laspeyresia leguminis Heinr. — Perfura as vagens.

Agromyza virens Loew. — Mósca minadora da fôlha; ataca a planta em sua primeira idade.

Urbanus proteus L. — Enrolador da fôlha.

Elasmopalpus lignosellus Sell. — Gusano da terra; come o colo da raiz.

Laphygma frugiperda Smith & Abbot — Lagarta dos cereais; as larvas destroem o colo da raiz.

Acheta assimilis Fabr. — Grilo pardo-avermelhado; destrói os brotos e o colo da raiz.

O feijão é prejudicado, ainda, por nematóides (*Heterodera* sp.), cujas larvas perfuram a raiz formando galhas de formas e tamanhos diversos; e por aranhas, pulgões, ácaros, etc.

O feijoeiro é considerado uma das plantas mais susceptíveis ao ataque de nematóides parasitos. Em nosso Estado, várias zonas têm sofrido, em lavouras de feijão, danos graves, bem assim, as de Estados vizinhos, como Paraná e Minas Gerais. LORDELLO (1959) constatou, em exames de plantas decedentes, a presença de minuscúlos nematóides filiados ao gênero *Meloidogyne*, difícil de serem vistos a olho nu e que produzem galhas ou engrossamento das raízes, facilmente diferenciáveis dos nódulos normais dos órgãos fixadores da planta. Tais nódulos, formações laterais, menores que as galhas e mais regulares, prendem-se às raízes por meio de curto pedúnculo.

MOLESTIAS — As condições do terreno, do clima e má qualidade das sementes impossibilitam a seleção genética de plantas, resultando em fracasso na produção e na falta de resistência do produto ao ataque de pragas e de moléstias.

PEIXOTO (1958) cita, como principais responsáveis pelas enfermidades do feijoeiro, os seguintes fungos, bactérias e vírus:

- a) Podridão do caule — Ocasionalada pelo fungo *Rhizoctonia solani*, que ataca os grãos antes da germinação e as plantinhas recém-surgidas.
- b) Cinza ou Oídio — Conhecida também por neve, polvilho e môfo branco, comum nos lugares úmidos, sombreados, e nas plantações densas. Ataca o caule e as vagens, as folhas amarelecem, as vagens se atrofiam e caem antes da planta morrer.
- c) Ferrugem — Muitas variedades são susceptíveis aos fungos *Uromyces appendiculatus* Fr. e *Uromyces phaseoli*, que atacam as folhas o caule e as vagens. O feijão da variedade preta é mais resistente ao ataque por êsses fungos.
- d) Murcha — Devida a fungos do gênero *Fusarium* que fazem amarelecer, murchar e cair as folhas, destruindo as raízes, matando por fim o feijoeiro.
- e) Antracnose, Carvão ou Variola — Motivada pelo fungo *Collectotrichum lindemuthianum* que ataca tôda a planta, menos as raízes.

Vários fungos podem, ainda, ocasionar moléstias cujos sintomas se caracterizam por pequenas manchas nas folhas, nas vagens e

nos caules. Entre eles estão os pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Isariopsis*, *Cercospora* e outros. *Botrytis cinerea* ataca os caules, bainhas e folhas na forma de polvilho cinzento-esverdeado.

Certas bactérias aeróbias, como *Pseudomonas phaseolica*, atacam e danificam as folhas, os brotos, os caules e vagens dos feijões.

O Mosaico do feijão é moléstia produzida, por várias espécies de vírus, de alta gravidade para esta leguminosa. ZAUMEYER & HARTER (1943) estudaram dois novos vírus causadores de mosaico no feijão que, de acôrdo com o sistema de classificação de HOLMES (1939), foram identificados como sendo *Marmor laesiofaciens* e *Marmor laesiofaciens* var. *minor*. O vírus do mosaico anão (clorose infecciosa das malváceas) é transportado, segundo SILVA (1960), desta última para o feijão, por pequena môsca, pois várias plantas são hospedeiras de vírus e outros microrganismos que infestam os feijoeiros.

Algumas das principais moléstias do feijoeiro são disseminadas pela semente contaminada, motivo pelo qual devem ser expurgadas antes da semeadura para garantia de sucesso na cultura, pois, muitos microrganismos responsáveis por moléstias do feijoeiro podem viver no solo durante diversos anos, com capacidade de infestar novas culturas de feijão.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA — São de König os seguintes dados referentes à composição química de 100 gramas de sementes de feijão:

água 12,72; proteína 21,39; gordura 1,45; carboidratos 60,10; celulose 3,81, e cinza 3,17.

LÖBBE (1942) dá a composição química dos feijões Prêto e Mulatinho, que são os de maior produção e consumo no Brasil, obtida de análises realizadas pelo Dr. R. Holliger, do Instituto Agrônomo do Estado, com os resultados percentuais seguintes:

<i>Substâncias</i>	<i>Prêto</i>	<i>Mulatinho</i>
Proteína	16,66	17,97
Amido	46,99	45,26
Açúcar e dextrina	6,69	8,32
Ácido fosfórico	0,80	0,90

BETHLEM & col. (1953), em interessante trabalho sôbre a "composição centesimal de 50 variedades de feijões existentes no

Brasil", dão, para as variedades Prêto e Mulatinho, as médias seguintes, obtidas de 5 amostras de cada uma destas variedades:

<i>Substâncias</i>	<i>Prêto</i>	<i>Mulatinho</i>
Umidade	11,784	13,128
Proteínas (6,25)	20,744	22,897
Lípides	1,271	1,404
Glicídeos e indeterminado ..	62,322	61,932
Minerais totais	3,880	3,536

A celulose está incluída no indeterminado.

PROTEÍNAS — A riqueza em proteínas do feijão varia de 16,80 a 27,62%, em média 21,00%.

A principal proteína do feijão é a *phaseolina*, cujo isolamento se deve a RITTHAUSEN (1884). Mais tarde, OSBORNE (1894) estudando as proteínas do feijão, num total de 23,5%, separou 15% de *phaseolina*, 2% de uma albumina que denominou *faselina*, 3,5% de uma proteose álcali-solúvel, mas insolúvel em solução saturada de cloreto de sódio e 3% de outra proteose álcali-insolúvel.

Nos diferentes feijões do gênero *Phaseolus*, há, praticamente, concordância na composição de suas proteínas, que são constituídas por duas globulinas — alfa e beta.

Vários autores estrangeiros, como Osborne, Jones, Waterman, Finks, Tillmans, Mac-Collum e muitos outros, fizeram estudos dos aminoácidos, podendo-se notar, de seus experimentos, o interesse que diferentes aminoácidos, em particular, despertaram a êste ou aquêle autor. Isto se prende ao fato de que o valor biológico da proteína depende, não somente do conteúdo absoluto de aminoácidos essenciais à dieta, mas também, da distribuição e equilíbrio na molécula protéica, de forma a poderem ser utilizados pelo organismo para fins de nutrição.

Em virtude da insuficiência de dados sôbre a composição dos feijões cultivados em nosso país, onde os trabalhos sôbre o assunto se restringem à citação de resultados referentes a feijões produzidos no estrangeiro, BETHLEM & col. (1954), dando prosseguimento ao plano de pesquisas elaborado sôbre esta leguminosa, iniciaram estudos sôbre os respectivos aminoácidos, com a aplicação do método químico ponderal de Kossel & Kutscher, comparados, posteriormente, os resultados obtidos por método cromatográfico.

Os primeiros resultados dêste trabalho referem-se aos teores de Histidina, Arginina e Lisina de algumas variedades de feijões cultivados no Brasil, conforme demonstra o quadro seguinte:

VARIEDADES	EM 100 g DE FEIJÃO (%)						RESÍDUO OBTIDO EM 100 g DE PROTEÍNA		
	PRD TEÍNA	N-do hidrolizado (6,25)	N-Amo-niacal NH ₃	N-Hu-mina (6,25)	N-His-tidina (6,25)	N-Argi-nina (6,25)	Histidina	Arginina	Lisina
Chumbinho ...	19,350	5,95	0,32	2,30	0,10	0,03	0,210	0,778	0,709
Branco miúdo .	19,937	19,00	0,50	18,40	1,02	0,50	3,566	1,218	0,601
Enxófre	16,760	8,70	0,22	24,90	0,23	—	0,787	0,334	0,208
Macassa-Fradi-dinho	21,220	4,15	0,22	16,04	5,60	—	1,488	0,639	5,513

(*) Os resultados se referem às determinações de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, realizadas no decorrer do método para controle das operações feitas depois da hidrólise e durante a separação da Histidina e da Lisina.

CARBOIDRATOS — Vários carboidratos estão presentes no feijão comum, sendo o amido considerado o principal por estar contido no extrato seco, geralmente, na proporção de 60%.

PETERSON & CHURCHILL (1921) encontraram os seguintes teores porcentuais de glicídeos no feijão branco, ainda fresco: açúcares totais 1,59; amido 35,20; pentosanas 8,37; galactanas 1,33; dextrinas 3,71; hemiceluloses 0,83; celulose 3,11 e umidade 12,96.

CONSTITUINTES MINERAIS — A composição média centesimal dos constituintes da cinza do feijão, de acordo com 13 análises realizadas por Wolff (*Aschenanalysen*), citadas por WINTON & WINTON (1935), é a seguinte:

Cinza	K ₂ O	Na ₂ O	CaO	MgO	Fe ₂ O ₃	P ₂ O ₅	SO ₃	SiO ₂	Cl
3,22	44,01	1,49	6,38	7,62	0,32	35,52	4,05	0,57	0,86

FRANCO (1951) apresenta os teores seguintes de cálcio, fósforo e ferro das variedades mais cultivadas e aceitas no mercado, correspondentes a 100 g de sementes:

VARIEDADES	Cálcio g	Fósforo g	Ferro g
Feijão preto	0,145	0,471	7,00
Feijão mulatinho	0,145	0,442	5,30
Feijão branco	0,476	0,439	11,90

BETHLEM & col. (1953) e MALOUK & col. (1952) determinaram os teores de cálcio, fósforo, ferro e manganês de 50 variedades de feijões existentes no Brasil, das quais daremos os resultados referentes aos feijões Prêto, Mulatinho e Branco:

Variedades	Cálcio g % CaO	Fósforo g % P ₂ O ₅	Ferro mg % Fe ₂ O ₃	Manganês mg % Mn
Prêto	0,114 a 0,280	0,163 a 0,870	2,516 a 8,265	1,680 a 2,980
Mulatinho ..	0,011 a 0,280	0,320 a 0,541	7,064 a 13,213	1,740 a 3,120
Branco	0,005 a 0,189	0,497 a 1,380	3,603 a 6,506	1,880 a 2,480

Em outras espécies e variedades de feijões cultivados em nosso país, êstes autores obtiveram teores bem mais elevados dêstes constituintes, tais como: CaO 1,546% (Mulatão da Moita), P₂O₅ 3,070% (Bico de Ouro), Fe₂O₃ 14,586 mg % (Macassa Fradinho) e Mn 4,340 mg % (*Adzuki*).

A soja apresenta teores mais altos de ferro (Fe₂O₃ 16,216 mg %) e de manganês (Mn 5,000 mg %), porém é menos rica em cálcio e fósforo que muitos feijões.

VITAMINAS — O feijão maduro e sêco conserva, ainda, apreciável quantidade de tiamina, riboflavina e niacina. O teor de carotênio é maior nas sementes em fase mediana de maturação, sendo diminuto nos feijões muito maduros.

OUTROS COMPONENTES — O feijão contém, ainda, pectina (pectato de cálcio), fosfatase, amilase, deidrogenase (enzimas oxidantes), alantoína, ácido alantóico, alantoínase, uricase e flavona. As flavonas estão presentes no tegumento das sementes de *Phaseolus vulgaris*, que, consoante SKALINSKA (1925), podem transformar-se em antocianina.

USOS — O feijão é um dos mais importantes alimentos do povo brasileiro, está sempre à mesa quer do rico, quer do pobre e tem sido considerado como a fonte mais barata de proteína entre as substâncias nutritivas mais comuns. Pode ser usado sob a forma de sementes verdes, sêcas e como legume (vagem) verde, em saladas, cozidos, com carnes, ovos, etc. Com o feijão prêto se prepara a feijoada e com os de côr o tutu de feijão, pratos caracteristicamente brasileiros, muito apreciados.

Na indústria, diferentes variedades de feijão são utilizadas na manufatura de diversas espécies de produtos alimentícios enlatados. O feijão é usado na preparação de macarrão, geralmente de mistura com a farinha de trigo, e na confecção de doces (*manju*, *koful*) de

origem japonêsa. Tem sido usado, aliás, como tôdas as sementes leguminosas, como sucedâneo do café e na prática da fraude do produto em pó.

EXIGÊNCIAS REGULAMENTARES — São considerados impróprios para o consumo os feijões úmidos, infestados por parasitos, larvas e bolores e os que tiverem sofrido qualquer avaria que lhes altere a qualidade. É expressamente proibida a mistura de diferentes espécies de feijão e as sementes que forem consideradas impróprias para a alimentação humana só poderão ser aproveitadas para fins industriais.

O decreto federal n.º 7.260, de 28-5-41, aprovou as especificações da exportação do feijão, visando à sua padronização. O feijão será ordenado por classes, segundo as respectivas espécies e variedades e as classes em 5 tipos com as seguintes características: grãos perfeitos, uniformes, maduros, secos, sãos, polidos, tamanho e côr próprios e isentos de impurezas, para o tipo 1, que tolera, ainda, 0,5% de grãos carunchados ou danificados por insetos, e 1% de defeituosos.

Nos demais tipos há um progressivo teor de tolerância para os defeitos e impurezas.

São considerados **DEFEITOS** os grãos chochos, ardidos, brotados e mofados, e **IMPUREZAS** os torrões, grãos podres, fragmentos de talos de vagens, grãos de outros cereais e detritos de qualquer espécie ou natureza.

O feijão em que fôr verificada a presença de carunchos vivos, deverá ser expurgado para posterior classificação.

TIPOS COMERCIAIS DO FEIJÃO
(Decreto 7.260, de 28-5-41)

GRUPOS	CLASSES	TIPOS	IMPUREZAS % torrões, pedras, fragmentos de talos de vagem, detritos de qual- quer natureza e grão de outros cereais	DEFEITOS %	
				Carunchados ou danificados por insetos	Defeituosos (grãos quebra- dos, chochos, ardidos, brota- dos, mofados)
T O L E R Â N C I A %					
São 5, conforme características da vegetação, formato e consistência.	Determinadas pela coloração (côr) e variedades ou espécies definidas.	1	0,00	0,50	1,00
		2	0,25	0,50	1,00
		3	0,50	1,00	2,00
		4	1,00	2,00	3,00
		5	1,50	3,00	5,00

RESUMO

No presente trabalho, o A. faz um estudo do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), produto de grande consumo em nosso país, como alimento de alto valor nutritivo, considerado a principal fonte de proteína das classes menos favorecidas e das populações rurais. Reúne os conhecimentos mais interessantes sobre o assunto, desde a origem da planta, classificação botânica, variedades e raças cultivadas não só em nosso país, como nos Estados Unidos, Peru e Argentina; cita as épocas de plantio e de colheita, bem como a produção nos principais estados brasileiros, que se dedicam à cultura da leguminosa, e em muitas outras regiões produtoras do globo, para o que apresenta dados estatísticos oficiais do Ministério da Agricultura e da FAO.

Refere-se aos caracteres botânicos da planta, e, de modo especial, à morfologia e à histologia da semente, parte essencial à identificação microscópica deste importante grão, utilizado em grande proporção na indústria de conservas e na preparação de pratos especiais de restaurantes, sujeitos à análise fiscal.

Descreve minuciosamente as características do amido da leguminosa, tece considerações sobre as moléstias e pragas que infestam a plantação e as sementes armazenadas, e faz apreciação da composição do feijão, na qual as proteínas, os aminoácidos e os constituintes minerais mereceram especial atenção, principalmente das variedades nacionais: mulatinho, prêto e branco.

Indica os principais usos do feijão, as exigências regulamentares e a classificação comercial do produto, com base no Decreto 7.260, de 28-5-41, alterado pelo Decreto 21.971, de 22-10-46, D.O. 24-10-46.

O trabalho, ilustrado com fotografias e desenhos originais do A., contribui, decisivamente, para apreciação de diferentes detalhes e, de modo especial, para elucidação da estrutura microscópica da semente *Ph. vulgaris* L.

SUMMARY

COMMON BEAN

A study of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) largely consumed in Brazil is made. The bean is the principal source of protein for the city people and countrymen. The origin, botanic classification, varieties and species cultivated in Brazil, United

States, Peru and Argentina are presented. Proper time for seeding and harvesting is suggested as well as the amount of production in each Brazilian state in which the culture of this vegetable is made, and in other regions where the bean production is in a large scale. Statistical data of the Agricultural Department and of the FAO are reported. Botanical characteristics, mainly the morphology and histology of the seed, contribute to identify this important grain which furnishes a great variety of canned food and several foods served in hotels and restaurants and subjected to official control.

Starch in bean is carefully investigated and several considerations are made about illnesses and plagues attacking cultures and stored seeds. Chemical compounds of bean are studied, emphasizing the importance of proteins, amino-acids and mineral constituents mainly in the Brazilian varieties: brown, black and white. Principal uses of bean are reported as well as official regulations and commercial classification of the product. This work illustrated by photos and diagrams showing different aspects of the investigation helps the elucidation of microscopical structure of the *Ph. vulgaris* L. seed.

BIBLIOGRAFIA

ALLARD, H. A. & W. J. ZAUMEYER — Responses of beans (*Phaseolus*) and other legumes to length of day. *Technical Bulletin*, n.º 867, U.S. Dept. of Agric., Washington, 1944.

BENLLOCH, M. — El gorgojo de las judias. *Hojas Divulgadoras*, n.º 4 — 55H, Minist. Agric., Madrid, 1955.

BETHLEM, M. L. B., F. MALOUK, H. P. NEVES & M. TAVEIRA — Teor de cálcio e fósforo em 50 variedades de feijões existentes no Brasil. *Rev. Quím. pur. aplic.*, Pôrto, Portugal, 4: 141-156, 1953.

BETHLEM, M. L. B., H. P. NEVES, F. MALOUK & M. TAVEIRA — Composição centesimal de 50 variedades de feijões existentes no Brasil. *Rev. bras. Farm.*, 34: 259-274, 1953.

BETHLEM, M. L. B., F. MALOUK, H. P. NEVES & M. TAVEIRA — Teor de ferro em 50 variedades de feijões existentes no Brasil. *Rev. bras. Farm.*, 34: 385-398, 1953.

BETHLEM, M. L. B., H. P. NEVES, F. MALOUK & M. TAVEIRA — Teor de amino-ácidos de algumas variedades de feijões existentes no Brasil. *Arq. Bromat.*, 2: 3-17, 1954.

FRANCO, G. — Tabela de composição química dos alimentos. SAPS, Rio de Janeiro, 1951.

BONDAR, G. — Insetos daninhos e moléstias dos feijões cultivados na Bahia. *Boletim* n.º 9, Lab. Pat. Veg., Secret. Agric., Bahia, 1930.

- HOLMES, F. O. — Handbook of Phytopathogenic Viruses. Minneapolis, Minn., pág. 221, 1939.
- LERENA, G. A. — Cultivos de Huerta. Edit. Albatros. Buenos Aires, págs. 455, 456, 1945.
- LÖBBE, H. — Os feijões mulatinho e prêto. 2.^a ed. Serv. Inf. Agr., Minist. Agr., Rio de Janeiro, pág. 3, 1942.
- LORDELLA, L. G. E. — Moléstia do feijoeiro causada por nematóides. *Sítios e Fazendas*, 5: 52, 1959.
- MENEZES JÚNIOR, J. B. F. — Investigações sobre alterações da estrutura vegetal pela ação do calor. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 6: 183-192, 1946.
- MENEZES JÚNIOR, J. B. F. — Fraudes do Café. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 12: 110-144, 1952.
- NEME, N. A. — Culturas acessórias na fazenda de café: feijão. *Bol. Superint. Serv. Café*, 220: 3-7, 1945.
- OSBORNE, T. B. — *J. Am. Chem. Soc.*, 16: 633, 703, 757, 1894.
- PEIXOTO, A. — Feijão. Série Produtos Rurais, n.º 8, Serv. Inf. Agric., Minist. Agric., Rio de Janeiro, 1958.
- PETERSON, W. H. & H. CHURCHILL — *J. Am. Chem. Soc.*, 43: 1180, 1921.
- PIMENTEL, F. — Aspectos gerais da cultura do feijão no Rio Grande do Sul. *Boletim Série C. Sec. Inf. Pub. Agric., Secret. Agric., Pôrto Alegre*, 1948.
- RITTHAUSEN — *J. prakt. Chem.*, 29: 448, 1884.
- SKALINSKA, M. — Contribution a la connaissance des pigments dans le tégument des graines de *Phaseolus vulgaris*. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 93: 780-782, 1925.
- SILVA, G. C. — Contrôlo das moléstias do feijoeiro. *Supl. Agric. do jornal "O Estado de S. Paulo"*, 6 (263): 6, 1960.
- VARGAS SACO, R. — Cultivo del frijol en la costa central del Peru. *Boletim* n.º 54, Ext. Exp. Agric. "La Molina", Min. Agr., Peru, 1954.
- VIEIRA, C. — O feijão comum e sua lavoura. *Lavoura e Criação*, 117: 23-29, 1959.
- WINTON, A. L. & K. B. WINTON — The Structure and Composition of Foods. Vol. 2. John Wiley & Sons, Inc., New York, págs. 347, 348, 1935.
- ZAUMEYER, W. J. & L. L. HARTER — Two new virus diseases of beans. *J. Agric. Research*, Washington, D. C., 67: 297-320, 1943.

MÉTODO DE PADRONIZAÇÃO DA TORRAÇÃO E MOAGEM DO CAFÉ

J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR (*)

E

BENTO AUGUSTO DE ALMEIDA BICUDO (**)

Há longos anos, procedendo a uma série de estudos e observações sobre o café, concluimos pela urgente necessidade da realização de um método de padronização da torração e moagem, considerado indispensável à fiscalização do produto.

Em 11 anos de trabalho no Instituto Adolfo Lutz, foram feitos mais de 40.000 exames microscópicos em amostras de café torrado

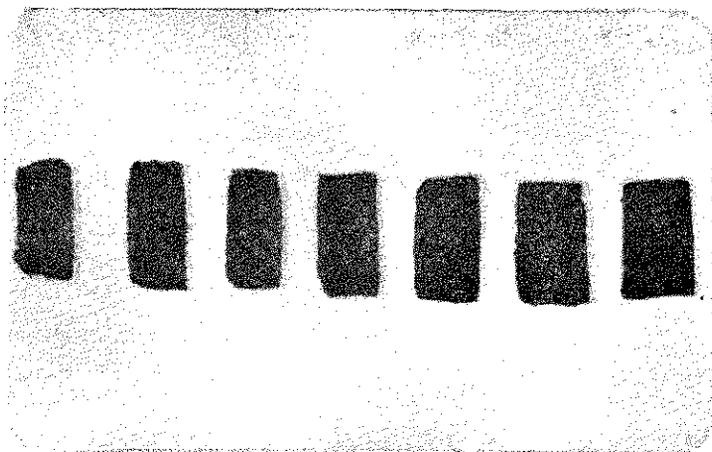


Foto n.º 1 — Café torrado e moído, provando a irregularidade da torração.

e moído, colhidas oficialmente, para fins de análise, em 13 Estados da União, e, ainda, o de centenas de amostras, procedentes de outros

(*) Químico-Chefe do Instituto Adolfo Lutz.

(**) Classificador de Produtos Vegetais da Secretaria da Fazenda, comissionado no Instituto Adolfo Lutz.
Recebido para publicação em 25 de junho de 1960.

Estados e por nós solicitadas, que vieram confirmar o nosso ponto de vista.

Verificou-se que, grande porcentagem do café torrado e moído, em nosso país, não obedece a um padrão de uniformidade, e está em completo desacôrdo com as características normais de torração e moagem predominantes em quase todo o território nacional.

A côr do café torrado e moído das amostras examinadas varia desde o castanho bem claro até o castanho bem escuro, apresentando-se, muitas vêzes, totalmente enegrecida, com parcial carbonização do produto, como provamos pela foto n.º 1.

Quanto à moagem, verificamos que a textura e a granulação do pó de café, também não primam pela uniformidade, existindo

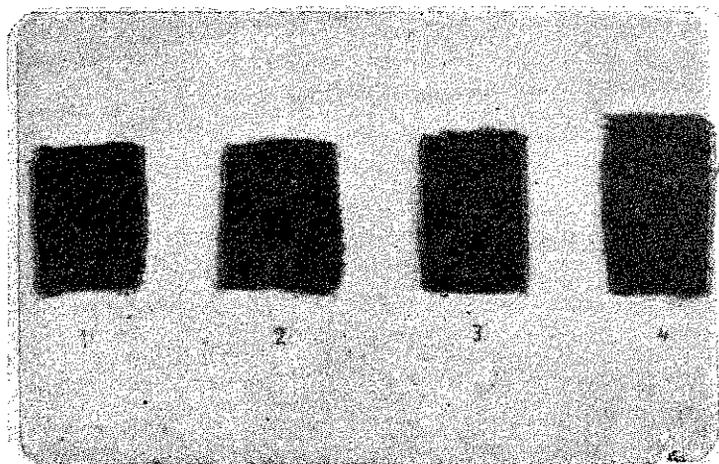


Foto n.º 2 — Café torrado e moído provando a irregularidade na moagem.

amostras constituídas de pó muito fino, quase impalpável, e outras, de granulação irregular e grosseira, contendo fragmentos grandes de café torrado e moído, apesar de ser esta irregularidade, em escala muito menor do que a verificada na torração (vide foto n.º 2).

Dentro das características que prevalecem em nosso país, a torração normal do café é mais clara ou mais escura, de acôrdo com o critério da indústria e segundo a preferência do consumidor, atendendo aos hábitos e costumes de determinadas regiões. Estas variações foram por nós perfeitamente estudadas e enquadradas neste método de padronização.

O objetivo do nosso método é evitar que seja entregue ao consumo público, café torrado e moído em desacôrdo com o que é

normal, não admitindo falhas e absurdos, nocivos ao consumidor, prejudiciais aos interesses da indústria e à qualidade da bebida do nosso principal produto, como teremos oportunidade de provar no decorrer deste trabalho.

Segundo a opinião dos mais conceituados autores, que se dedicaram ao estudo do assunto e diante do precioso material de que dispunhamos, conseguimos selecionar, com toda a segurança, os padrões que devem obedecer à torração e à moagem do café, em nosso país. Estes padrões objetivam a melhoria do paladar do café, o seu rendimento, a sua conservação e o seu aproveitamento em benefício da qualidade e aumento de consumo.

Feitas estas considerações, passamos ao estudo da matéria, citando, inicialmente, a opinião de eminentes autores.

GODOY & OLIVEIRA (1933) emitem várias considerações, no tocante ao problema da torração do café, concluindo que: A torração, além de determinado limite, acentua o sabor amargo da bebida, ao mesmo tempo que surgem produtos empireumáticos prejudiciais à saúde.

Aconselham adotar, como tipo de café torrado para o nosso consumo, o correspondente ao ponto que antecede o início do aparecimento da gordura, exsudação dos grãos, por ser o de mais intenso desenvolvimento de sabor e aroma.

Com referência à moagem, observaram que: A quantidade de extrato, em todas as torrações, decresce à medida que aumenta a grossura dos grânulos. Infere-se, daí, não ser aconselhável adotar na prática, em favor do número de xícaras da bebida, finura aquém ou além de certo limite.

O pó muito fino, oferecendo maior rendimento, por ceder maior proporção de matérias extrativas e facilitar a evolução do aroma, é de conservação precária, oxidando-se facilmente, por apresentar maior superfície de exposição ao ar, em relação ao pó grosso.

Para razoável rendimento em xícaras e mais demorada conservação das boas qualidades do pó de café, aconselham a adoção de finura ou granulação média, correspondente à peneira de 14 fios por centímetro.

Segundo JOHNSON (1935), quanto mais excessiva fôr a torração, tanto maior será a decomposição da gordura, ocasionando alterações em quase todos os princípios que dão ao café aroma e sabor.

À medida que se processa a torração, verificam-se as decomposições químicas, reveladas pelo escurecimento progressivo dos grãos, originando-se o dióxido de carbono, produto característico de combustão.

Exercendo a finura do pó influência sôbre o sabor do café, ficou estabelecido que o café pulverizado seria aquêle que passasse por um crivo de 30 orifícios por polegada quadrada, correspondendo este grau de moagem ao termo empregado nos produtos moídos (*meal*), usado também pelos negociantes de café.

O café em pó, correspondente à moagem média ou corrente, é o que atravessa um passador de 10 orifícios por polegada, e à moagem grossa, um passador de 8 orifícios por polegada.

Consoante PATAU FILHO (1935), a qualidade do extrato depende em grande parte da torração dos grãos de café.

Consumidores de café usam graus diferentes da torração, esta sendo detida em alguns países quando os grãos se tornam levemente pardos e em outros quando se inicia a carbonização do produto. Ambas as práticas são condenáveis, porque, na primeira, o aroma não se desenvolve completamente, e, na segunda, aumentam-se as quantidades de substâncias amargas e empireumáticas que em nada beneficiam o produto obtido.

Para se evitar a perda de aroma desenvolvido durante a torração, devem-se resfriar, o mais depressa possível, os grãos depois de torrados.

A temperatura da torração varia entre 200 e 220° C.

O aumento de volume dos grãos, provocado pela torração, é de 1/3 a 1/2, ou seja, um litro de café cru dá de 1,3 a 1,5 litros de café torrado.

O grau de moagem do café é também de grande importância, pois, finamente moído, facilita a extração da parte solúvel, muito embora apresente o sério inconveniente de se aglomerar com facilidade, impedindo, desta forma, o maior contato da água com o pó.

O café, finamente moído, produz um pó que atravessa facilmente as malhas dos filtros, turvando o líquido obtido. As partículas de pó vão ficando retidas porque penetram nos interstícios do tecido, obstruindo-os em pouco tempo.

ÂNGELO (1937) estudou as modificações químicas que sofre o grão do cafeeiro, durante a fase de torração, como teremos opor-

tunidade de verificar nas observações seguintes: No ato da torração do café, atingida a temperatura de 130 a 150° C, a côr de grão se torna mais amarelada, há perda de pêso de 10 a 11% e o volume continua a diminuir, mais lentamente do que no período anterior.

O aroma dos óleos etéreos do café, não torrado, diminui, ficando picante. Nesta fase da torração o café perderá tôda a umidade, dando-se o fenômeno da caramelização dos açúcares existentes. À temperatura de 160° C, a côr torna-se ligeiramente castanha e assim se mantém até atingir 200° C. O pêso vai lentamente se reduzindo de 12 a 13%. Da segunda metade desta fase, isto é, dos 175° C em diante cessa a contração dos grãos, começando o aumento de volume, a distensão ou elasticidade, ficando muito poroso, dando lugar ao aparecimento do aroma característico. A caramelização dos açúcares, nesta fase, já se acha muito avançada.

A celulose, a cafeína, a matéria graxa e a matéria tanante, sofrem, até 200° C, muito pouca transformação. Entretanto, a 230° C, o café se torna castanho mais escuro; a perda de pêso é rápida, chegando até 15%; a celulose e a proteína sofrem, nesta fase, grandes modificações.

À temperatura de 240° C, a cafeína começa a se decompor e a se volatilizar. A côr castanha do grão vai se tornando cada vez mais escura, indicando que a torração deverá terminar, nesta temperatura, nunca ultrapassando a 250° C.

A perda de pêso é, então, muito rápida, atingindo a 19%. O volume aumenta de 40%. Os grãos arrebentam-se com ruído característico, deixando escapar um vapor azulado. Os açúcares se acham completamente caramelizados. A volatilização da cafeína chega até 3% de seu total. A matéria graxa e os óleos etéreos se decompõem, em grande parte, dentro das paredes das células. O último fenômeno dêste período é a destilação sêca da celulose. Acima da temperatura de 250° C, a côr adquire tonalidade escura e brilhante. Há perda de pêso de 30%. O volume aumenta e, em seguida, diminui, imprimindo aos grãos, estrutura esponjosa, de superfície rugosa. Os carboidratos se decompõem emitindo vapores azulados. Os óleos e graxas se queimam, completamente; o caramelo torna os grãos amargos; produtos empireumáticos se formam, desprendendo-se aroma desagradável.

UKERS (1935), sôbre a eficiência na torração, menciona A. L. Burns de Nova York, reconhecendo que está credenciado para informar sôbre o assunto: Nos processos industriais, hoje em dia, a

máquina, por si só, se tornou indispensável e realmente eficaz, cabendo, apenas, ao operador igualar e manter a rotina correta e infalível. Porém, correção infalível é uma rara qualidade humana e as pessoas que superintendem a melhor maquinaria de torrar café, atualmente, deveriam ser cuidadosamente escolhidas e tratadas com dupla consideração.

Em todo o caso, a habilidade manual antiga está reduzida apenas ao essencial, que exige a mesma intensidade de atenção e o bom julgamento.

Tocar em uma válvula de controle é serviço que até uma criança executa, mas é um verdadeiro encargo fazer um ajuste exato com os respectivos graus.

Quando o café é torrado corretamente, é necessário que se verifique uma definida perda no peso, a maior parte pela evaporação da água, para a qual não há forma lógica de medir. Esta perda é estimada em cerca de 16%, e varia com o tipo e a idade do café.

A eficiência deveria, é claro, ser mantida em qualquer operação necessária na preparação do café, desde a plantação distante até a torração e ninguém pode afirmar, com autoridade, que certos estágios críticos, no tratamento do fruto de café, não possam afetar o valor final até a posterior mágica da operação torradora.

Assim, parece de grande importância, tanto na torração do café como nas operações mecânicas, que uma nova e ampla eficiência deva ser adquirida, baseada nos últimos conhecimentos científicos. Mas isto implica numa total cooperação entre o comércio e a capacidade mental dirigida honestamente na pesquisa da indústria cafeeira, a qual está intensamente caracterizada nas atividades atuais.

WINTON & WINTON (1939), entre outras considerações científicas, apreciam também o problema da torração e da moagem do café, emitindo as considerações seguintes: "A torração desenvolve o aroma e modifica a composição, em outros aspectos. A torração é feita em maquinaria especial que requer cuidadoso ajustamento das temperaturas".

De acordo com a opinião de Punnett e Balard, citados por WINTON & WINTON (1939), o aumento de 50 a 100% em volume do café, durante a torração, é devido à formação de dióxido de

carbono (90 a 95%) e à pequena quantidade de monóxido de carbono que dilatam as células a uma pressão de cerca de 100 libras por polegada quadrada.

CAMARGO & QUEIROZ TELLES JR. (1953) apreciam, pormenorizadamente, os problemas da torração e moagem do café, cujas principais observações, são as seguintes: Quando o café é submetido à torração, uma série enorme de reações toma lugar dentro de cada grão, iniciando-se pela destilação da própria água, para terminar com ações de oxidação e redução destrutivas de vários de seus componentes, a ponto de sua composição se tornar completamente diferente da do mesmo grão quando cru.

A torração do café em lenta combustão, poderá transformar esta operação em morosa destilação do produto, com perdas

para a qualidade, ao mesmo tempo que, rápida e a todo o fogo, não realiza o fenômeno empírico com as devidas transformações das matérias graxas, ácidos, glicosídeos, etc., como se deve exigir para um bom café.

A celulose poderá ser incinerada na superfície sem que o calor atinja a parte interna da massa dos grãos.

Considerando-se o aparelho de torrar café já quente, com capacidade para graduação do calor, o tempo gasto na torração deverá ser de 18 a 20 minutos.

Durante esse tempo, o café perde cerca de 20% de seu peso total, sendo 10,5 a 11% da água de que é constituída e 9% de pro-

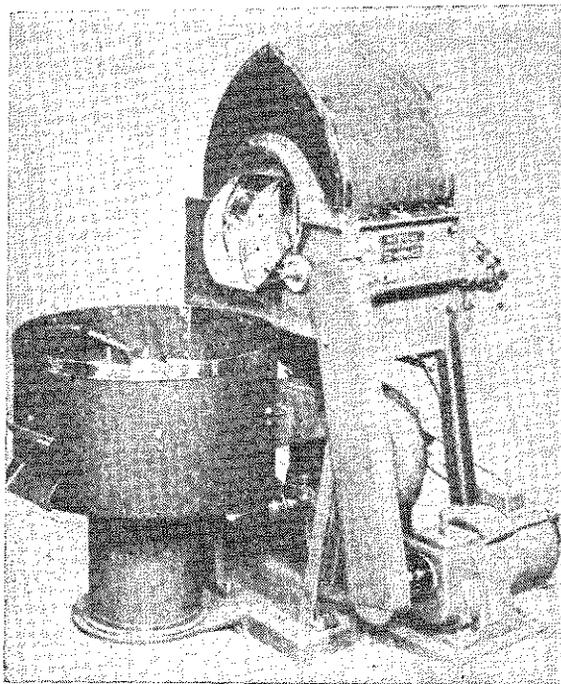


Foto n.º 3 — Torrador de fabricação inglesa, modelo antigo, para pequena produção (segundo UKERS).

duto voláteis, mormente em óleos, ácidos, ésteres e outros produtos formados durante a torração, e que se volatilizam, em parte, na forma de gás carbônico.

Durante a torração, a temperatura não deverá exceder de 240 a 250° C porque, então, se rompem os alvéolos celulares pela pressão interna dos diversos componentes e os óleos (ésteres de glicerina e os ácidos oléico, palmítico e esteárico) ganham a parte externa dos grãos, o que deve ser evitado.

Com relação à moagem, devemos considerar que os grãos do café triturado, deverão propiciar fácil saída dos elementos constitutivos de uma infusão rica, sem contudo deixar que a celulose carbonizada faça parte da bebida.

Assim, pois, a moagem muito fina poderá ser prejudicial, sem nenhuma vantagem para as qualidades organolépticas do produto.

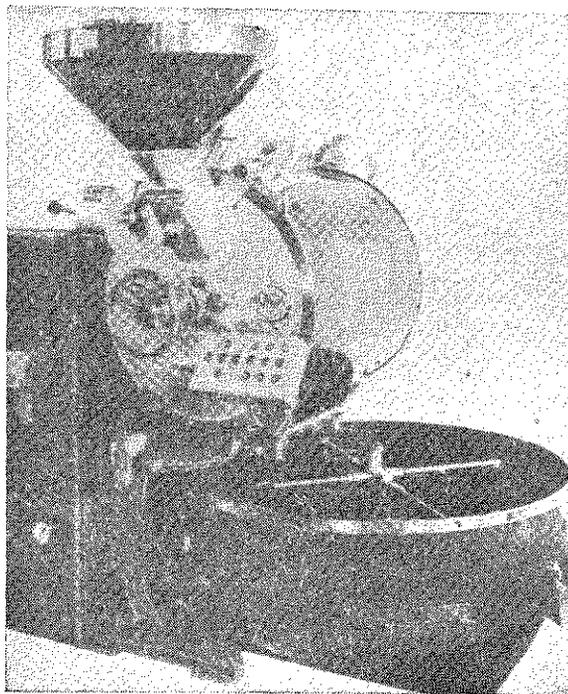


Foto n.º 4 — Torrador automático, de fabricação recente (segundo COSTE & col.).

Moagem de granulação média, e que se padroniza pelas malhas do *tamis* de 14 fios por centímetro, é considerado a melhor.

COSTE & col. (1959), em recente obra publicada em Paris, apreciam, minuciosamente, o problema em questão, cujas principais observações são as que passaremos a mencionar: “As qualidades aromáticas do café só aparecem e se desenvolvem sob a ação de altas temperaturas a que é submetido durante a torração, que é uma destilação sêca. Além das modificações do seu aspecto exterior, no que concerne à côr e volume, o produto está sujeito a profundas alterações em sua composição química, das quais, algumas geram o aroma”.

A ação de temperaturas progressivas na torração do café, provocam as verificações seguintes: A 100° C a côr verde dos grãos começa a ficar amarelada; a dessecação se traduz por um desprendimento de vapor d'água e cheiro de pão torrado; acima de 120 a

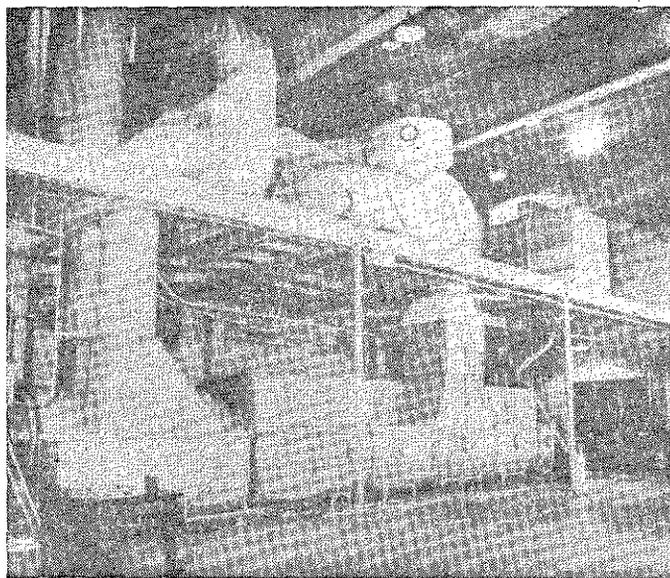


Foto n.º 5 — Torrador contínuo, de fabricação recente (segundo COSEE & col.)

130° C o grão toma uma coloração castanha, que se acentua aos poucos, com tendência para o castanho mais ou menos escuro; a 150° C o café começa a desprender cheiro que lembra o dos grãos tostados, sem que se possa perceber seu aroma característico; êste, a 180° C, aproximadamente, é que começa a se desenvolver. Nesta temperatura, os gases de combustão aparecem sob forma de fumaça branca azulada, com depreendimento de CO₂ e CO. Verifica-se também que os grãos se tornam de côr castanha e que seu volume aumenta; à temperatura mais elevada, o desprendimento de gás é mais abundante e as tonalidades de côr são mais acentuadas. O aroma atinge, então, pleno desenvolvimento. Os grãos aumentam de volume, estalam e uma exsudação brilhante aparece em sua superfície; aproximadamente a 270° C, o desprendimento de fumaça diminui, os grãos enegrecem e aumentam, ainda, de volume; aproximadamente a 300° C, se tornam pretos, com características de carvão, friáveis a uma pequena pressão, desaparecendo totalmente

o aroma. Neste estado, de excessiva torração, o café está carbonizado.

Os especialistas no assunto situam a zona de torração entre 185 e 240° C, sendo o "optimum" entre 210 a 230° C. Acima dessa temperatura, começa a supertorrção.

A complexidade dos fenômenos a que está sujeito o café, no ato da torração, foram estudadas por Orosco, citado por COSTE & col. (1959), que observou, durante a torração, a produção de quatro grupos principais de reações (desidratação, hidrólise, desmólise, catálise), cujas ótimas intensidades se situam em temperaturas bem determinadas. Verificou, ainda, que algumas destas reações começavam quando outras não tinham terminado.

A duração da torração é habitualmente da ordem de 12 a 15 minutos, mais rápida com determinados aparelhos, e pode estar terminada, até em 5 minutos, com as técnicas americanas, ditas das torrações contínuas.

Por outro lado, existem técnicas, aplicadas à torração lenta, que demandam 25 minutos, mais ou menos. É bom recordar que, no início do século, a duração normal da torração, com pequenos aparelhos a gás ou a carvão de lenha, era de 40 a 45 minutos.

COSTE & col. examinaram, também, as modificações físicas e mecânicas atribuídas ao café, pela torração como veremos a seguir: a) PERDA DE PÊSO; b) AUMENTO DE VOLUME; c) CÔR DOS GRÃOS; d) TEXTURA INTERNA; e) RESISTÊNCIA À PRESSÃO.

PERDA DE PÊSO — A perda de peso é devida, essencialmente, à evaporação da água que o café verde contém em proporções variáveis, geralmente compreendidas entre 10 a 12%, depois de relativo período de armazenagem, em clima temperado.

Até 90 a 100° C de temperatura, a água é evaporada lentamente, depois, rapidamente, entre 100 a 130° C, e fica constante, em seguida, para acusar queda, entre 250 a 280° C, com a dessecação total aos 300° C.

A perda de peso do café, ao ser torrado, varia dentro de limites extremos, que se situam entre 14 e 23%, em função da origem botânica, do modo de preparar os grãos no local de produção, das condições de armazenamento, das técnicas empregadas na torração, etc. Nas condições habituais da torração francesa, atinge e ultrapassa mesmo a 20%. Evidente que, em torrações menos acentuadas (americanas, alemãs, etc.), a perda de peso é inferior a esta última de 2 a 5%.

Não é apenas a evaporação da água a única responsável pela perda de peso do café torrado. A torração elimina também a película prateada (espermoderma), na ordem de 0,2 a 0,4%, conforme esta exista nas fendas medianas e sobre o grão cru, e há, ainda, uma redução, pelo calor, de certas substâncias, notadamente de carboidratos.

AUMENTO DE VOLUME — Rabechault, um dos colaboradores de COSTE (1959), apresenta uma contribuição bastante instrutiva ao estudo do fenômeno relativo ao aumento de volume do café, pela torração, que parece ser provocado pela expansão de gases (CO₂ e CO) que se formam nos grãos, nestas temperaturas.

Seja qual fôr o aumento de volume dos grãos, estes variam de 30 a 100%, sendo as normas mais correntes de 50 a 80%.

A origem botânica e o local de procedência são elementos que parecem de primordial importância. É sabido que, nas mesmas condições de temperatura, os cafés da espécie *arábica* aumentam de volume, muito mais que os da espécie *canephora*. Os primeiros acusam um aumento de volume de 80 a 100%, contra 30 a 70% dos outros.

O quadro seguinte, constante do referido trabalho, permite seguir a expansão volumétrica de café *arábica* colombiano, tipo Líbano, segundo a temperatura final da torração.

**EXPANSÃO VOLUMÉTRICA DO CAFÉ ARÁBICO
("LÍBANO" COLOMBIANO)**

TEMPERATURA FINAL DA TORRAÇÃO	EXPANSÃO VOLUMÉTRICA (%) EM RELAÇÃO AO GRÃO VERDE	DENSIDADE APARENTE
215° C	9,3	0,662
220° C	25,4	0,568
222,5° C	40,7	0,497
225° C	46,6	0,472
227,5° C	52,5	0,449
230° C	58,5	0,429
232° C	64,4	0,411
235,5° C	72,9	0,388
238° C	80,5	0,369
242° C	85,6	0,352

(Segundo "Acidity of Roasted Coffee", por Nat. Fed. Coffee Growers of Colombie, 1947)

CÔR DOS GRÃOS — A côr dos grãos é, provavelmente, função do tipo do café e, de modo principal, segundo a intensidade e duração da torração. Assim, os cafés torrados lentamente, à baixa temperatura, não têm coloração tão acentuada quanto os outros. O resfriamento dos cafés, ao saírem dos cilindros dos torradores, produzem modificação de tonalidades. Nota-se que a côr da superfície dos grãos se identifica raramente com aquela do produto moído, porém é, na maioria das vèzes, mais clara.

Segundo o grau de torração obtido, emprega-se um dos qualificativos seguintes: ocre, tijolo, canela, cacau, castanho-avermelhado, castanho, castanho-escuro, grafitado, etc.

O gôsto da clientela tem importância maior, assim é que, existem torrações clara, média ou escura, obedecendo tantos quantos critérios correspondentes a um determinado aroma.

Nota-se, todavia, a necessidade, para os técnicos, de uma padronização internacional de côres, pois as definições e apreciações pessoais variam ao infinito e proibem qualquer comparação.

Sabe-se que a clientela norte-americana prefere os cafés de torração clara (*light roast*), na costa oeste; no interior dos Estados Unidos e na Califórnia, dão preferência à torração média (*medium roast*); ao passo que, em Nova Orleans, é habitualmente mais apertada (*full roast*).

Os cafés, consumidos na França e na Itália, são geralmente bem escuros (*French roast, Italian roast*), em particular os *Cane-phora*. Na Alemanha, ao contrário, a clientela prefere cafés mais claros, *blonds* (*light roast* e *cinnamon roast*).

Com referência à moagem, COSTE & col. (1959) dizem o seguinte: “O grau de moagem do pó do café é um dos pontos importantes, pois, se é muito grosso, a água escoá-se rapidamente e a bebida fica com insuficiência de princípios aromáticos, mais fraca e de menor sabor. Ao contrário, se o pó é muito fino, ao ser coado, a água arrasta partículas que se depositarão no fundo da xícara; a operação se processa com lentidão, esfriando progressivamente a água e dificultando a extração.”

É entre êsses extremos que se situa a moagem mais indicada para cada tipo de cafeteira, a saber: média para as cafeteiras de uso doméstico; fina para os aparelhos de pressão; adequada para os coadores; e ultrafina para o café à moda turca, etc.

MENEZES & BICUDO (1960) concluíram que as sementes de café livres dos envoltórios, sofrem, por meios mecânicos, torração a temperaturas que atingem de 200 a 250° C, dando origem à formação de novos produtos, principalmente aromáticos e oleosos, enquanto que inúmeros outros constituintes são desdobrados e alguns parcialmente destruídos ou volatilizados, de acôrdo com o grau de torração a que o café foi submetido.

Em seus trabalhos de rotina, examinando diàriamente, ao microscópio, amostras de café torrado e moído, para determinar o grau de pureza do produto, concluíram que a torração e a moagem do café, destinado ao consumo interno do país, eram irregulares, e, mesmo, absurdas, em alguns casos.

Em milhares de exames microscópicos constataram a existência de amostras cuja coloração do pó evidenciava a falta ou o excesso de torração, havendo mesmo, neste último caso, algumas enegrecidas, demonstrando parcial carbonização do produto, o que, em consequência das transformações dos princípios empíreumáticos, empresta, ao café de bebida *mole* (fina), gôsto amargo e mesmo repugnante.

Os cafés pouco torrados, prejudicam o paladar e o rendimento normal do número de xícaras, por não terem sido completadas as benéficas transformações químicas, produzidas pela torração perfeita.

Provaram assim a necessidade de se enquadrarem, torração e moagem do café, dentro de uma faixa de coloração padronizada, para o ponto ideal de torração, em que, limites mínimo e máximo de tolerância não alcancem a falsa de torração branda ou a de torração excessiva, lembrando também, o interêsse de se padronizar, por meio de tamis, a moagem do produto.

Após estas considerações técnico-científicas de estudiosos do assunto, passamos às nossas conclusões, frente aos estudos realizados.

TORRAÇÃO DO CAFÉ

Durante a torração, desde a temperatura inicial até à de 100° C, as transformações químicas e as alterações do grão são mínimas, e, praticamente, não interessam ao nosso estudo.

Com a progressão da temperatura, depois de 100° C, notam-se: pequena transformação no aroma; desprendimento de vapor d'água; e perda da côr natural, que se torna amarelada. A 150° C diminui a resistência, desenvolve-se o aroma característico e ligeiro aumento de volume, com pequena perda de pêso. A 200° C, a côr já é castanha, o aumento de volume é notório, a perda de pêso se acentua, desprendendo-se vapor branco com regular intensidade. Entre 220 e 230° C caracteriza-se o aroma do café torrado. Os grãos estouram, pela dilatação dos tecidos, e as benéficas transformações químicas atingem o ponto ideal, indicando a fase final do processo de torração. Neste ponto, o café torrado deve passar, imediatamente, para o resfriador a fim de se evitar a torração excessiva.

Mantendo o café, ainda no torrador, e aumentando a temperatura, a matéria graxa existente no grão começará a ser expelida para a sua parte externa, tornando-o de aspecto oleoso e brilhante.

Prosseguindo, ainda, o processo de torração, verifica-se que os vapores se tornam cada vez mais intensos para, em seguida, se reduzirem, e o grão de café se transforma, então, num carvão de côr metálica, brilhante, de contextura esponjosa e friável, desaparecendo quase completamente o aroma.

O café excessivamente torrado, traz sérios prejuízos, pois, os óleos e as graxas se queimam, o caramelo produz o amargo característico e outros produtos empireumáticos se formam, concorrendo para um aroma desagradável e até mesmo repugnante.

Durante a torração, até o ponto que consideramos normal para o consumo, o café da espécie *arábica* perde a água que contém, na proporção variável de 10 a 12%.

Logo após a torração, dentro dos pontos que consideramos normais, o grau de umidade do grão de café reduz-se a traços apenas, mas aumenta à medida que o produto permanece em contato com o ar ou é submetido à moagem, fato que concorre para justificar a medida legal que limita os prazos de entrega, ao consumo público, de 20 dias para o café torrado em grão e de 10 dias para o produto moído.

A perda de pêso de *Coffea arabica*, cujas principais variedades representam, praticamente, a totalidade dos cafés existentes no país, é normalmente de 19 a 20%, sofrendo pequenas variações, segundo os processos de secagem, tamanho dos grãos, grau de torração, safra, condições de armazenamento, etc.

Esta perda de pêso corre por conta da eliminação quase total da água existente no café cru, na proporção variável de 10 a 12%, e o restante, em consequência da volatilização de vários produtos, que se formam durante a torração.

O aumento de volume varia, segundo inúmeros fatores, podendo ser estimado entre 60 a 100% nas variedades de *Coffea arabica* existentes no país.

O tempo gasto na torração do café é variável, segundo o tipo de torrador empregado, o processo de combustão, a temperatura inicial e final, o grau de umidade existente no café cru, o ponto de torração, etc.

Nos torradores alimentados por combustão a gás e já aquecidos, o tempo gasto para torração normal, é de cerca de 15 a 20 minutos.

Feitas estas considerações passamos à descrição dos processos de padronização da torração e moagem do café.

PADRONIZAÇÃO DA TORRAÇÃO DO CAFÉ

Visando à padronização da torração do café em nosso país, concluímos pela adoção de padrões comparativos, tanto para o café torrado em grão como para o produto moído, representados por amostras padrões, periódicamente renovadas, por sofrerem a ação do tempo, ou por fotografias coloridas como as que ilustram êste trabalho.

Levamos em conta, na adoção dos padrões, a coloração de milhares de amostras de café torrado e moído, em condições normais, as quais traduzem o critério das indústrias de torrefação e moagem de café existentes no país, atendendo à preferência dos consumidores, e, principalmente, o real aproveitamento dos princípios extrativos do café, em benefício do paladar, da conservação e do bom nome do nosso principal produto de exportação.

A coloração a que fizemos referência e que consideramos normal para a torração do café em nosso país, está representada nas 18 amostras, correspondentes à foto n.º 6.

Assim, adotamos como critério para a padronização da torração do café, dentro da necessária tolerância, que vai do grau mínimo

ao grau máximo, o processo seguinte: estudamos o comportamento do café durante a torração, selecionando as necessárias amostras

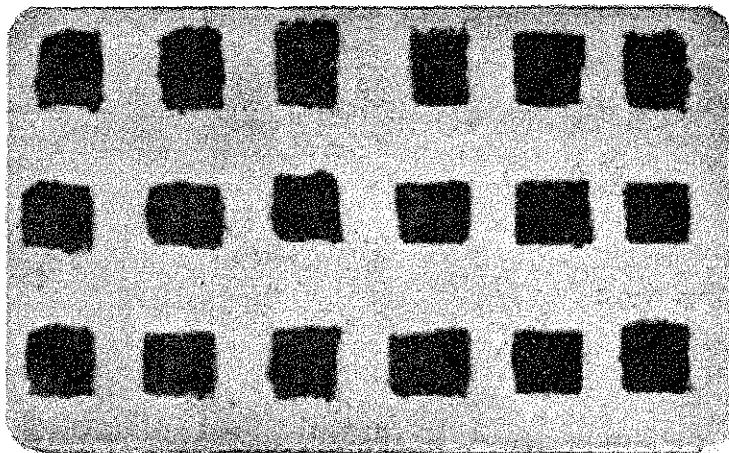


Foto n.º 6 — Amostras de café em pó, normalmente industrializadas e que representam os pontos de torração predominantes em nosso país.

que caracterizam o produto desde um ponto mínimo até o excesso de torração; reunimos estas amostras, quer do produto torrado em grão, quer do seu correspondente moído, na foto n.º 7, colorida, cujas amostras são numeradas de 1 a 7, de acôrdo com a progressão do grau de torração.

Pelo que se verifica da foto n.º 7, a amostra n.º 4 é a que mais se assemelha, pela coloração, às características das amostras constantes da foto n.º 6, que representam os pontos de torração dos cafés, normalmente industrializados em nosso país.

No entanto, considerando a necessidade de uma tolerância, principalmente em obediência ao critério, que deve ser observado no que concerne à torração do café, admitimos, para o consumo público, todos os cafés torrados ou moídos que se enquadrem entre a coloração das amostras de ns. 3 a 5, mencionadas na foto n.º 7. As amostras de ns. 1 e 2 referem-se ao produto pouco torrado e não representam um mínimo da preferência do público brasileiro. As amostras de ns. 6 e 7, constantes da foto n.º 7, dizem respeito ao produto excessivamente torrado, onde já se observa evidente exsudação nos grãos de café, em flagrante desacôrdo com o que é lógico e admissível, para a torração normal. Pelo exposto, consideramos normais e aprovadas as torrações que se constituírem de

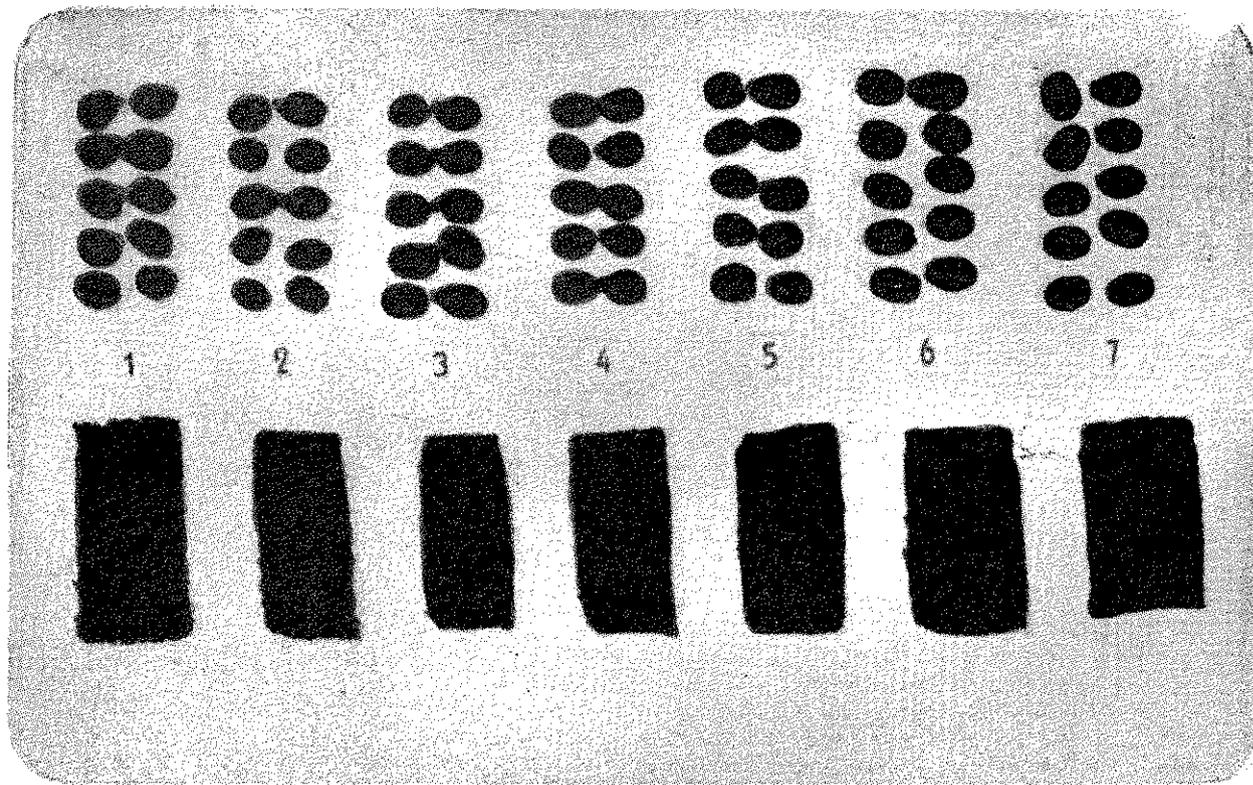


Foto n.º 7 — Sete amostras de café torrado, em grão, e suas correspondentes em pó, desde a de grau mínimo até a de excesso de torração.

grãos ou de pó de café, cuja coloração se enquadre entre os números 3 e 5. É evidente que, dentro do admissível pela coloração nas torrações correspondentes às amostras de ns. 3 a 5, outras colorações características, de pontos de torração, poderão existir. O que não se pode admitir é que o grau de torração seja inferior ao da amostra n.º 3 ou superior ao de n.º 5.

O padrão de torração pode ser obtido, também, por meio de desenho de retículos coloridos e numerados, conforme se verifica na figura n.º 8, representando a padronização a ser adotada, de acôrdo com a foto n.º 7.

Este desenho de retículos coloridos deve ser mantido ao abrigo da luz, a fim de melhor conservar as suas côres.

Assim, acreditamos ter proposto a padronização da torração do café destinado ao consumo público em nosso país, passando ao assunto concernente à padronização da moagem.

PADRONIZAÇÃO DA MOAGEM DO CAFÉ

Segundo COSTE & col. (1959), nos Estados Unidos, as normas de "granulação do café", padronizadas pela "Commodity Standard Division of the National Bureau of Standards", de Washington, são as mencionadas no quadro seguinte:

PADRONIZAÇÃO AMERICANA DE MOAGEM DO CAFÉ					
TIPOS DE MOAGEM	QUANTIDADE DE CAFÉ RETIDOS PELOS TAMIS		QUANTIDADE DE CAFÉ QUE ATRAVESSA O TAMIS N.º 30 (*)	TOLERÂNCIA PARA OPERAÇÃO PRECE- DENTE	
	12 e 16 (*) %	20 e 30 %		Mínima %	Máxima %
"REGULAR"	33	55	12	9	15
"DRIP"	7	73	20	16	24
"FINE"	0	70	30	25	40

(*) Padrões americanos correspondentes a uma abertura de 0,065, 0,046, 0,0328 e 0,0232 polegadas, respectivamente. Na classificação denominada "Tyler", estas aberturas correspondem aos tamises números 10, 14, 20 e 28, respectivamente.

Vários autores, estudiosos dos problemas relativos à moagem do café, limitam-se a fazer referência ao tamis de 14 fios por cen-

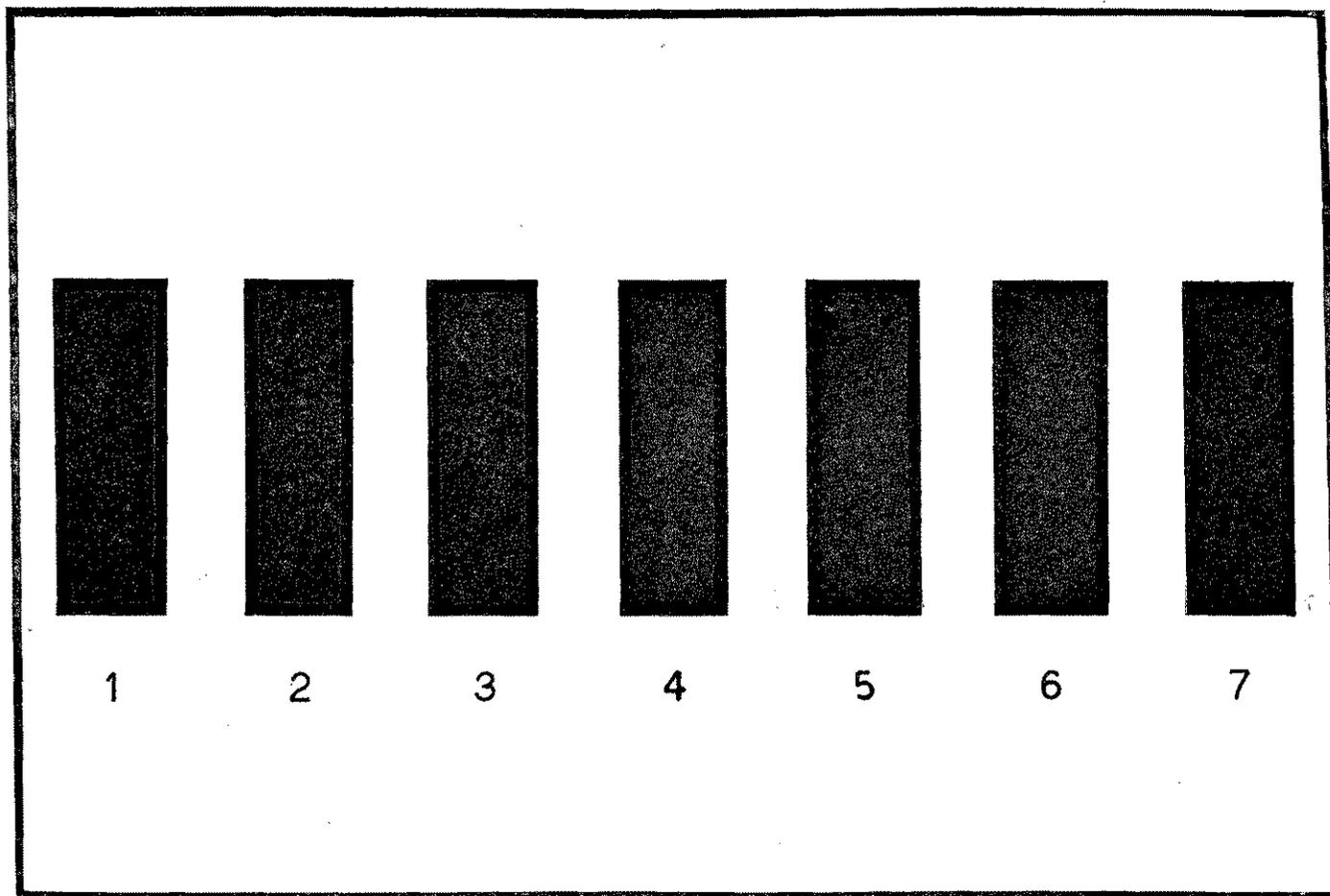


Fig. n.º 8 — Desenho de retículos coloridos e numerados que correspondem e podem substituir o padrão da foto colorida n.º 7.

tímetro, como o mais indicado na obtenção de uma boa bebida, sem maiores observações a respeito, o que nos faz acreditar tratar-se do tamis de n.º 14, de acôrdo com a classificação denominada "Tyler".

Segundo a padronização americana a moagem do café está situada dentro dos limites seguintes:

- retenção pelos tamises ns. 10 e 14 (Tyler) entre 0 a 33% ;
- retenção pelos tamises ns. 20 e 28 (Tyler) entre 55 a 70% ;
- vasamento no tamis n.º 28 (Tyler) entre 12 a 30% ;
- tolerância para a operação precedente — mínima de 9 a 25% e máxima de 15 a 40%.

O nosso ponto de vista, fundamentado em estudos realizados, é que a citada padronização satisfaz plenamente, pois, bastante tolerante, poderá também ser adotada em nosso país.

Os citados tamises necessários à fiscalização do café, poderão ser feitos em nossas indústrias especializadas no ramo, já que possuímos os dados relativos às respectivas aberturas.

CONCLUSÃO

Acreditamos na utilidade dêste nosso trabalho, tanto para a alta administração responsável pelos problemas do café em nosso país, como, também, para a própria indústria das torrefações e moagens do produto, que terão, doravante, um padrão a ser cumprido em benefício da melhoria da qualidade do nosso café.

Outros trabalhos, de nossa autoria, tiveram, por parte dos responsáveis pela fiscalização do café, a melhor acolhida, e foram aplicados à legislação cafeeira com os melhores resultados. Citamos, por exemplo, o método microscópico para verificação da porcentagem de impurezas no café em pó, que tão bons serviços vem prestando na prática, desde 9 de dezembro de 1950, possibilitando eliminar aquelas modalidades de fraude em nosso país.

Esta a razão pela qual acreditamos seja êste trabalho necessário à elaboração da medida legal indispensável à fiscalização da padronização de torração e moagem do café brasileiro.

Entendemos ter prestado, assim, mais uma contribuição ao problema do café brasileiro que tamanha influência econômica e social tem tido no desenvolvimento do nosso país.

Sem dúvida, não são poucos os trabalhos relacionados com o assunto, que foram omitidos, principalmente de autores nacionais, malgrado o nosso empenho em colhêr dados informativos nas fontes especializadas.

Esta contribuição terá o seu mérito, principalmente para aqueles que estão habituados a tratar dos problemas relacionados com o café e que recorrem a tôda sorte de pesquisas, para melhor segurança e realce de seus trabalhos. No entanto, sabemos das dificuldades que encontram para atingir o seu escopo, sem ter a mão, a necessária documentação bibliográfica que traz uma zona de conhecimentos inestimáveis e imprescindíveis na realização de qualquer estudo técnico-científico, fundamentado em alicerces sólidos.

Esta é a razão, ainda, pela qual aproveitamos o ensejo para render as nossas homenagens aos que, de qualquer forma, estudarem o problema em foco, pois, o café é de tamanha importância aos nossos interesses, por qualquer dos ângulos que o abordamos, que tôda e qualquer contribuição em seu benefício, será considerada obra meritória e patriótica.

RESUMO

Os AA., em decorrência do serviço que executam no Instituto Adolfo Lutz, analisando microscopicamente, desde 1950, mais de 40.000 amostras de café torrado e moído, concluíram pela necessidade da padronização da torração e moagem do café em nosso país, frente às irregularidades observadas. Para tanto, consultaram fontes bibliográficas especializadas e, levando em conta a opinião de competentes autores, fizeram experimentações não só para verificar o fundamento do que já fôra realizado nesse terreno e numerosas outras pesquisas indispensáveis ao perfeito estudo do problema. Tiveram o cuidado de acompanhar o comportamento do café durante o processo de torração, coletando as amostras que julgaram necessárias para escalonar os pontos de torração julgados úteis à elaboração da referida padronização. Fundamentaram a padronização da torração do café em nosso país, por método comparativo, com as colorações características dos pontos de torração, ou por fotografias coloridas, e, ainda, por desenho constante de retículos coloridos que retratam as amostras.

Limitaram, com a necessária tolerância, a torração do café, a uma faixa representada por amostras com graus diferentes de torração, quer do produto em grão, quer do seu correspondente em

pó, dentro do que consideram normal, segundo a côr do café torrado e moído, predominante no país, e, ainda, objetivando o seu melhor rendimento, conservação e qualidade.

No que se refere à moagem do produto, os AA. indicam o mesmo critério de padronização adotado nos Estados Unidos pela "Commodity Standard Division of the National Bureau of Standards", de Washington, conforme quadro denominado "Padronização Americana de Moagem do Café", constante dêste trabalho.

Acreditam que os referidos métodos venham a ser utilizados pela alta administração cafeeira do Brasil, visando a normalizar a torração e a moagem do café, em benefício do paladar e aroma do café-bebida.

SUMMARY

COFFEE ROASTING AND POWDERING STANDARDIZATION METHOD

From 1950, facing some irregularities detected in the microscopic analysis of more than 40.000 specimens of roasted and powdered coffee, the necessity, in Brazil, of standardization of coffee roasting and powdering is urged. A review of the literature is made and as advised by experts, experiments were carried on and accurate study of the problem was made.

The follow-up of the coffee during the roasting process furnished several specimens of beans at different degrees of roasting, and various colors which were classified to prepare the standardization. The comparative method of specimens with their characteristic color degrees of roasting was adopted as well as lantern slides and diagrams of those specimens. Coffee roasting limitations were represented in a band with the allowed specimens of roasted seeds and corresponding powder at different stages of roasting and coloration, as the criterium of normality adopted in Brazil to reach a greater profit, longer conservation and quality improvement.

The grinding criterium is the same adopted in the U.S.A. by the "Commodity Standard Division of the National Bureau of Standards", Washington, as shown by the table "American Standardization of Coffee Powdering". The method presented ought to be adopted by the Staff of the Brazilian Coffee Administration to regulate roasting and grinding and to improve flavor and aroma of the coffee drink.

BIBLIOGRAFIA

ANGELO, J. S. — Modificações químicas da torrefação do grão do cafeeiro. 3.º Congres. sul-amer. Quím., Atas e Trabalhos, Rio de Janeiro e São Paulo, 6, (7.ª Secção): 143-148, 1937.

BICUDO, B. A. A. & E. R. OLIVEIRA — Fiscalização do café. Superint. Serv. Café, Sec. Fazenda, São Paulo, Tip. Aurora, 1950; Bol. Superint. Serv. Café, 30 (336): 7-35, 1955.

BICUDO, B. A. A. — Legislação cafeeira. Bol. Superint. Serv. Café, Sec. Fazend., São Paulo, 32 (362): 8-13, 1957.

CAMARGO, R. & A. QUEIROZ TELLES JR. — O café no Brasil. Vol. II. Serv. Inf. Agric., Minist. Agric., Rio de Janeiro, Brasil, 1953.

COSTE, R., H. CAMBRONY, P. NAVELLIER & H. RABÉCHAULT — Les caféiers et les cafés dans le monde. Vol. I (Tom. 2). Editions Larose, 11, rue Victor-Cousin, Paris, Ve, Cap. V, págs. 129-149, 1959.

GODOY, J. M. & F. P. OLIVEIRA — Contribuição para o estudo do café torrado. Rev. Inst. Café Est. S. Paulo, 16 (73): 9-17, 1933.

JOHNSON, H. L. — Processo científico de coar café. Rev. Inst. Café Est. S. Paulo, 19 (107): 2.608-2.612, 1935; 20 (108): 75-79, 1936; 21 (109): 270-275, 1936.

MENEZES JÚNIOR, J. B. F. & B. A. A. BICUDO — Sobre um método microscópico para contagem de cascas no café em pé. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 11: 3-47, 1951.

MENEZES JÚNIOR, J. B. F. — O contrôlo do infuso do café pela densimetria. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 15: 135-154, 1955.

MENEZES JÚNIOR, J. B. F. & B. A. A. BICUDO — Observações técnico-científicas sobre os componentes do café. Bol. Superint. Serv. Café, Sec. Fazenda, São Paulo, 35 (404): 5-9, 1960.

PATAU FILHO, F. — Considerações sobre extrato de café. Rev. Inst. Café Est. S. Paulo, 19 (105): 2.123-2.128, 1935.

UKERS, W. H. — All about coffee. 2.ª ed. The Tea & Coffee Trade Journal Company. New York, 1935.

WINTON, A. L. & K. B. WINTON — The Structure and Composition of Foods. Vol. IV. John Wiley & Sons, Inc., págs. 151, 152, 1939.

O LEITE: COLIMETRIA, FOSFATASIMETRIA E CONTAGEM GLOBAL

Considerações a respeito da detenção de irregularidades na linha de pasteurização do leite, pela utilização das provas colimétricas das diluições e concentrações crescentes

ALEXANDRE MELLO FILHO (*)

No vasto *menu* que a natureza pôs ao alcance do homem para que renovasse as energias gastas na luta pela vida ou para que servisse de argamassa de constituição de seu próprio organismo, na fase de crescimento, o leite, como alimento plástico, tem o primado indiscutível.

Nosso regime alimentar é classicamente, desde os tempos coloniais, senão proteoprivo, pelo menos hipoprotéico. Há os que pleiteiam a favor de uma alimentação pobre em carnes e ovos sob a afirmativa de que a proteinização da alimentação, que se vem verificando nos países de maior vitalidade econômica, se acompanha de uma patologia especial, com predomínio da hipertensão arterial e do diabetes.

Há, também, os que invocam o vasto capítulo de afecções proteinopênicas, em que avultam o edema de fome e a tuberculose, e sob o aspecto morfológico a pequenez da estatura e o atraso da puberdade. Não importam questões doutrinárias ou polemizações de tipo acadêmico. O certo é que, de todos os tempos, na construção do edifício animal, e na manutenção equilibrada do seu funcionamento, o leite é matéria prima definitiva. Até no mundo microscópico é o leite substrato de extraordinário potencial nutritivo, pois constitui para a imensa e variada flora microbiana, fator eugenético de crescimento e difusão.

(*) Bacteriologista da Cooperativa Central de Laticínios. Médico do Hospital Municipal e Assistente da 6.^a Medicina de Homens do Hospital Central da Santa Casa (Serviço do Dr. Alexandre Mello).

Recebido para publicação em 20 de dezembro de 1960.

Junte-se ao fato, circunstância de que, pelas suas próprias condições de produção, em fonte animal, em ambiente de higiene primitiva, inevitavelmente é o leite um vasto caudal onde crescem e se reproduzem assustadoramente centenas de milhares de células bacterianas, em ondas que se sucedem a cada quarto de hora, de novas gerações de extrema prolificidade (FOSTER & col., 1957; HAMMER & col., 1957). É a flora banal do leite, germinações pacíficas que apenas atuam sobre a qualidade do produto, a sua conservação, o seu organoleptismo. Mas há também a interferência da flora de luta, dos patogênicos, que promovem incursões devastadoras e mortíferas contra a sobrevivência humana. Entre nós, em 1938, MELLO & MASTROFRANCISCO evidenciaram a presença do bacilo da tuberculose vivo e virulento, no leite de consumo da Capital, entregue cru à população. Pouco tempo após, RANGEL PESTANA (1942), publicava o resultado de suas verificações, tendo isolado o *Mycobacterium tuberculosis* do líquido céfalorraqueano de crianças com meningite tuberculosa. E esse germe era de origem bovina. Esses trabalhos, feitos na mesma época, fecham o ciclo e caracterizam perfeitamente a perigosa decorrência das contaminações de um produto alimentar que é o principal artifice da criação da vida humana e animal. Note-se que, por feliz circunstância, o bacilo da tuberculose não tem a propriedade de se reproduzir no leite (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953). Esta foi uma citação a êsmo, porque muitos capítulos da patologia poderiam ser desdobrados com enumerações desse tipo, objetivando outros morbos. É nesta altura que intervém a função saneadora e salvadora da pasteurização, cujo efeito fundamental, como técnica industrial, incluída no domínio dos preceitos bromatológicos, é, não só a profilaxia das contaminações humanas, como, também, a transmissão ao produto da durabilidade necessária à distribuição e ao consumo. Segundo VILLARES (1959), os resultados obtidos na estação Experimental de Laticínios de Hillerod, na Dinamarca, pelos processos recentes de pasteurização, na destruição de 99,4 a 99,99 por cento dos germes banais e 100 por cento dos germes patogênicos do leite, com leves modificações nas proteínas solúveis, vitaminas e outros elementos termolábeis, recebem contínuas confirmações em diferentes centros de investigações científicas de várias partes do mundo. Em São Paulo, com maquinaria moderna, a grande maioria das indústrias, empregando o processo de pasteurização rápida com aquecimento a 73-75° C, no período de 15 a 20 segundos, de acordo com

ROGICK (1959), cem por cento dos germes patogênicos do leite e cerca de 99,8 a 99,9 por cento dos germes banais são destruídos. Pelo exposto, chega-se à conclusão de que é o objetivo primordial dos Serviços de Saúde Pública, promover a distribuição de um produto de acurado padrão organoléptico e baixo teor microbiano, porque, embora uma elevada contagem não prove, obrigatoriamente, a presença de bactérias patogênicas, indica, certamente, a ação isolada ou conjunta de fatores diversos tais como: a contaminação na fonte de origem, transporte sob insatisfatórias condições de frigorificação, pasteurização tecnicamente deficiente ou recontaminação posterior ao beneficiamento (MELLO FILHO, 1958; MELLO, 1943). Entretanto, sabe-se que o Regulamento Federal (Reg. Insp. Ind. — Serv. Inf. Agric., 1953), não tem padrão determinado para o leite cru quanto aos coliformes e à contagem global, estipulando apenas que o produto não descobre o azul de metileno (prova da redutase), em tempo inferior a duas horas e meia. Não obstante, em várias cidades da França, Noruega e dos Estados Unidos, adota-se um apurado padrão bacterimétrico de 100.000 germes por ml, embora refira VILLARES (1959), a frequência com que esse severo índice é atingido ou suplantado. Na Itália e Bélgica, contém o leite cru, em média, 13 milhões de germes por ml e no Egito (Alexandria), e nas Ilhas da Madeira (Funchal), um achado de 150 milhões é fato comum (VILLARES, 1959). Em São Paulo, em 1943, consignava MELLO, os valores de 50 a 100 milhões, e, atualmente, para o leite vindo das fazendas, nos entrepostos do interior, e para o produto chegado à Capital, verifica-se, em média, o teor microbiano de 8 a 30 milhões, respectivamente, o que não deixa dúvidas quanto à melhora verificada na qualidade do leite. Também o índice limite, estipulado para o leite tipo C — 300.000 germes por ml — tornou-se um valor extremamente complacente em virtude dos aperfeiçoamentos tecnológicos do beneficiamento e higiênico-sanitários na produção. De fato, estatísticas elaboradas por técnicos do Departamento da Produção Animal, revelaram que 98,8% do produto examinado apresentaram contagem inferiores a 100.000 germes por ml, um padrão adotado em muitas nações do mundo, e que 91,1% das amostras do leite tipo C mostraram a ausência de coliformes em 0,1 ml, índice idêntico ao exigido em muitos países mais avançados em questões de laticínios (VILLARES, 1959; ROGICK, 1959).

OBJETIVOS DESTA PUBLICAÇÃO

Feitas estas considerações iniciais, passaremos ao assunto dêste trabalho, que constará de uma breve recapitulação dos processos colimétricos e fosfatasimétricos comumente empregados nos laboratórios de contrôle sanitário do leite, com um estudo crítico a respeito e comparativo em relação a um outro processo colimétrico, o das diluições e concentrações crescentes, por nós proposto em 1951 (MELLO FILHO, 1951), ilustrado por exemplos que não deixam dúvidas quanto à superioridade destas últimas provas na detenção de irregularidades na linha de pasteurização, e, principalmente, na promoção da sua profilaxia. Segue-se uma análise comparativa das estatísticas numéricas das contagens globais em ágar padrão, em relação aos índices colimétricos.

Como fecho, um breve ensaio experimental, fazendo o confronto do valor da colimetria e da fosfatasimetria na acuidade da determinação de pequenos desvios da técnica de pasteurização, traduzindo-se por subpasteurização, e da recontaminação do leite devidamente beneficiado dentro do próprio pasteurizador, através da mistura indevida com pequenas frações do leite cru, que, nestas condições, agiria como um verdadeiro "inoculum".

COLIMETRIA E FOSFATASIMETRIA — PROCESSOS ROTINEIROS

Desde que não seja viável o emprêgo de métodos rotineiros de contrôle e identificação da presença ocasional de germes patogênicos, como índice de um tratamento higiênico adequado, convencionou-se utilizar o teste da verificação da presença presuntiva dos coliformes no leite e a prova química da fosfatase, como evidência da eficiência maior ou menor dos trabalhos executados.

De fato, os germes patogênicos mais comuns, excluídos os esporulados, são destruídos a temperaturas inferiores àquelas requeridas para eliminar os coliformes e inativar a fosfatase, um fermento termolábil que ocorre normalmente no leite cru.

Verifica-se, pois, que um teste negativo, indicando a destruição da fosfatase no leite beneficiado, não só é uma certeza da ausência de germes patogênicos, como uma afirmativa do tratamento térmico adequado; podendo igualmente a fosfatase revelar recontaminações posteriores pela mistura com quantidades detectáveis de leite cru.

Pelas mesmas razões, não sobrevivendo os coliformes, em número apreciável, a uma pasteurização bem conduzida, o teste positivo

indica sempre uma recontaminação, sendo a prova tão seletiva que permite a detenção daqueles microorganismos mesmo quando se constituam pequena percentagem da flora global.

Em face do exposto, conclui-se que, com a prova da fosfatase como índice de adequada pasteurização e o teste para coliformes como afirmativa de recontaminação, poderemos, seguramente, ter uma poderosa visão de conjunto de toda a linha de pasteurização e uma acurada noção topográfica da sua sanidade segmentar.

Entendendo-se por pasteurização a destruição total da flora patogênica com redução do teor microbiano global, sem prejuízo sensível nas propriedades físico-químicas, bioquímicas e organolépticas do produto, passaremos a analisar o leite tipo C, objeto dos nossos estudos, que obedece, como já foi visto, às seguintes determinações regulamentares: ausência de coliformes em 0,1 (um décimo) de ml; contagem global inferior a 300.000 germes por ml; e controle obrigatório do teor enzimático em fosfatase e peroxidase (Reg. Insp. Ind. — Serv. Inf. Agric., 1953; LOPES, 1954).

É da rotina dos serviços de controle sanitário do leite, para a colimetria, a semeadura do produto em meio bile-lactose-verde brilhante, com tubos de Durham invertidos, lidos os resultados após 48 horas, \pm 3 horas, de permanência em estufa a 32-35 ° C (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953).

Para a contagem da flora global semeia-se o leite em placas de gelose padrão. Entretanto, é importante salientar o caráter de estimativa destes dois métodos, sujeitos a erros frequentes dos quais o principal é o originado pela imperfeita distribuição das bactérias na amostra examinada, causando, portanto, pela sua maior ou menor densidade na parcela semeada, falsos resultados positivos, ou enganadoras respostas negativas.

Dêste conceito, tira-se a noção da obrigatoriedade da extensão dos exames ao maior número possível de frações da amostra em estudo.

De fato, exemplificando, suponhamos que uma dada amostra contenha 1 coliforme por ml, nessas condições cerca de 37 por cento dos tubos de fermentação contendo 1 ml podem acusar resultados negativos, o que não acontece se lançarmos mão do concurso de 5 tubos, semeados com 1 ml (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water..., 1955).

Com a utilização dos 5 tubos, em apenas 1 por cento dos casos ocorreria um resultado completamente negativo, mas, mesmo nessas

condições, a precisão dos resultados obtidos não é de alta ordem, obrigando o analista a grande ponderação quando se interpretam, em termos de significação sanitária, os resultados obtidos com a utilização de poucos tubos em cada diluição da amostra (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water..., 1955).

Pela mesma razão, para a maior acuidade na avaliação dos resultados consignados, faz-se necessário o exame seriado do produto pelo menos em 3 ou 4 amostras, colhidas em dias diferentes, em busca de um resultado médio (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953).

Na verdade, o próprio Regulamento estipula que as sanções a serem aplicadas no caso de discordância com o texto legal, ultrapassando o padrão permitido, devam aguardar a totalização de 3 análises sucessivas, ou 5 interpoladamente em discordância, no período de um mês, o que além de tudo, permitiria as providências saneadoras necessárias.

Na rotina dos serviços públicos de contróle sanitário do leite, tomam-se amostras em cinco situações diferentes: 1.º — no tanque de recepção do leite cru; 2.º — na torneira do pasteurizador (nos processos rápidos, após a refrigeração); 3.º — nos tanques estoques; 4.º — na máquina de engarrafar; 5.º — na máquina para colocação de tampas (MELLO FILHO, 1951; LOPES, 1950).

Esta segmentação da linha de pasteurização tem a vantagem de oferecer, ao analista, indicação exata, topográfica, da contaminação do produto já beneficiado, e, se o mesmo foi convenientemente pasteurizado, facilitando o tratamento local higienizador, através dos processo mecânicos, físicos e químicos conhecidos.

No contróle dos coliformes do leite pasteurizado, tipo C, para o produto colhido no próprio pasteurizador e nos tanques estoques, segue o órgão oficial competente, o método da sementeira em 1,3 ou 5 tubos de fermentação, nas parcelas de 0,1 e 1 ml, e 0,1 e 0,2 ml para o produto quando engarrafado.

Na interpretação dos resultados, a verificação nessa série, de um só tubo gaseificado, é o suficiente para estabelecer, por motivos lógicos, baseados na interpretação do texto da lei, a presença presuntiva indesejável do coliforme.

Essa resposta presuntiva pode-se transformar como informação adicional, em tradução exata, pelo exame completado, pela sementeira dêsse material em meios especiais de identificação, com a devida exclusão da presença de esporulados. Desde que mais de

ESTIMATING COLIFORM GROUP DENSITY

TABLE 21b—TABLE OF PROBABLE NUMBERS (MPN) PER 100 ML OF SAMPLE

Using 5 Tubes

With 10, 1 and 0.1 ml Volumes

POS *	MPN										
10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1	
0 0 0	0	1 0 0	2	2 0 0	4.5	3 0 0	7.8	4 0 0	13	5 0 0	23
0 0 1	1.8	1 0 1	4	2 0 1	6.8	3 0 1	11	4 0 1	17	5 0 1	31
0 0 2	3.6	1 0 2	6	2 0 2	9.1	3 0 2	13	4 0 2	21	5 0 2	43
0 0 3	5.4	1 0 3	8	2 0 3	12	3 0 3	16	4 0 3	25	5 0 3	58
0 0 4	7.2	1 0 4	10	2 0 4	14	3 0 4	20	4 0 4	30	5 0 4	76
0 0 5	9	1 0 5	12	2 0 5	16	3 0 5	23	4 0 5	36	5 0 5	95
0 1 0	1.8	1 1 0	4	2 1 0	6.8	3 1 0	11	4 1 0	17	5 1 0	33
0 1 1	3.6	1 1 1	6.1	2 1 1	9.2	3 1 1	14	4 1 1	21	5 1 1	46
0 1 2	5.5	1 1 2	8.1	2 1 2	12	3 1 2	17	4 1 2	26	5 1 2	64
0 1 3	7.3	1 1 3	10	2 1 3	14	3 1 3	20	4 1 3	31	5 1 3	84
0 1 4	9.1	1 1 4	12	2 1 4	17	3 1 4	23	4 1 4	36	5 1 4	110
0 1 5	11	1 1 5	14	2 1 5	19	3 1 5	27	4 1 5	42	5 1 5	130
0 2 0	3.7	1 2 0	6.1	2 2 0	9.3	3 2 0	14	4 2 0	22	5 2 0	49
0 2 1	5.5	1 2 1	8.2	2 2 1	12	3 2 1	17	4 2 1	26	5 2 1	70
0 2 2	7.4	1 2 2	10	2 2 2	14	3 2 2	20	4 2 2	32	5 2 2	95
0 2 3	9.2	1 2 3	12	2 2 3	17	3 2 3	24	4 2 3	38	5 2 3	120
0 2 4	11	1 2 4	15	2 2 4	19	3 2 4	27	4 2 4	44	5 2 4	150
0 2 5	13	1 2 5	17	2 2 5	22	3 2 5	31	4 2 5	50	5 2 5	180
0 3 0	5.6	1 3 0	8.3	2 3 0	12	3 3 0	17	4 3 0	27	5 3 0	79
0 3 1	7.4	1 3 1	10	2 3 1	14	3 3 1	21	4 3 1	33	5 3 1	110
0 3 2	9.3	1 3 2	13	2 3 2	17	3 3 2	24	4 3 2	39	5 3 2	140
0 3 3	11	1 3 3	15	2 3 3	20	3 3 3	28	4 3 3	45	5 3 3	180
0 3 4	13	1 3 4	17	2 3 4	22	3 3 4	31	4 3 4	52	5 3 4	210
0 3 5	15	1 3 5	19	2 3 5	25	3 3 5	35	4 3 5	59	5 3 5	250
0 4 0	7.5	1 4 0	11	2 4 0	15	3 4 0	21	4 4 0	34	5 4 0	130
0 4 1	9.4	1 4 1	13	2 4 1	17	3 4 1	24	4 4 1	40	5 4 1	170
0 4 2	11	1 4 2	15	2 4 2	20	3 4 2	28	4 4 2	47	5 4 2	220
0 4 3	13	1 4 3	17	2 4 3	23	3 4 3	32	4 4 3	54	5 4 3	280
0 4 4	15	1 4 4	19	2 4 4	25	3 4 4	36	4 4 4	62	5 4 4	350
0 4 5	17	1 4 5	22	2 4 5	28	3 4 5	40	4 4 5	69	5 4 5	430
0 5 0	9.4	1 5 0	13	2 5 0	17	3 5 0	25	4 5 0	41	5 5 0	240
0 5 1	11	1 5 1	15	2 5 1	20	3 5 1	29	4 5 1	48	5 5 1	350
0 5 2	13	1 5 2	17	2 5 2	23	3 5 2	32	4 5 2	56	5 5 2	540
0 5 3	15	1 5 3	19	2 5 3	26	3 5 3	37	4 5 3	64	5 5 3	920
0 5 4	17	1 5 4	22	2 5 4	29	3 5 4	41	4 5 4	72	5 5 4	1600
0 5 5	19	1 5 5	24	2 5 5	32	3 5 5	45	4 5 5	81	5 5 5	2400+

(*) Number of positive tubes with each of 3 volumes used.

TABELA N.º 1 — Tabela dos mais prováveis números (M.P.N.), de coliformes, em 100 ml da amostra, usando 5 tubos (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953).

um organismo coliforme possa ser responsável pela positividade de cada tubo, muitas vezes além da análise qualitativa, lança-se mão da pesquisa quantitativa, baseada no princípio de que o provável número dos organismos é uma função logarítmica dos resultados, quando as frações testadas são da ordem decimal (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water..., 1955).

Para tanto, é suficiente semear o leite em uma série de 3 ou 5 tubos, nas quantidades de 0,1, 1 e 10 ml, e procurar interpretar os resultados de acôrdo com tabelas preexistentes, indicativas dos mais prováveis números (M.P.N.), de coliformes em 100 ml, segundo HOSKINS (1933, 1934), e os trabalhos básicos de MAC-CRADY (1915, 1918).

O emprêgo dêste processo fornece, na maioria das vezes, uma boa noção do grau da poluição da amostra examinada, mas leva, ao nosso ver, o analista ao encontro de uma série de resultados paradoxais. De fato, entre a primeira possibilidade — 15 tubos negativos — índice de zero coliformes em 100 ml e a extrema — 15 tubos positivos — tradução da presença de 2.400 ou mais organismos, existem na tabela valores gradativamente mais ou gradativamente menos em contraposição com o critério do bom senso, chegando a ser admitida a possibilidade de resultados acusando 5 tubos positivos para 0,1 ml e os demais completamente negativos para as quantidades maiores de 0,1 e 10 ml.

Porém, na prática corrente, estas incongruências não são observadas e a tabela funciona, para a média dos casos, perfeitamente.

O MÉTODO COLIMÉTRICO DAS DILUIÇÕES E CONCENTRAÇÕES CRESCENTES

Os processos vistos, adotados, visando o contrôle do teor de coliformes, quer o qualitativo da presença presuntiva ou completo, e mesmo o quantitativo (M.P.N.), apenas registram a situação atual dessa flora, a sua presença no momento do exame e portanto quando o leite pasteurizado já se acha, "ipso facto", contaminado. Entretanto, as leituras das amostras são feitas após 48 horas da sementeira e, mesmo que pudessem ser efetuadas imediatamente, como no método de Breed, não sendo permitido a repasteurização do produto, o mesmo seria entregue ao consumo em contravenção às exigências regulamentares.

As providências decorrentes dos exames são sempre "a posteriori", para o leite do dia ou dos dias seguintes. De modo que, a

instituição de um processo que permitisse a previsão dos resultados, de maneira a entreter o leite estritamente dentro dos padrões legais; ou, mesmo, com uma apreciável margem de segurança mantida acima das limitações regulamentares, seria de inestimável valia, sobretudo levando-se em conta o fato de que as disposições da lei estabelecem uma rigorosa e contínua vigilância sobre toda a linha de beneficiamento do produto.

O MÉTODO DAS CONCENTRAÇÕES CRESCENTES

Ao lado da técnica comum da sementeira em bile-lactose-verde brilhante, do leite pasteurizado colhido nos pontos clássicos — torneira do pasteurizador (T.P.), tanque estoque (T.E.), leite engarrafado (L.E.) — e submetido às diluições de rotina, fazemos, também, a sementeira dessas mesmas amostras, *não diluídas*, ao contrário, em concentrações crescentes, em 3 tubos para cada sementeira, a razão de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 ml e lidas nas mesmas condições, após 48 h em estufa a 35° C. Os métodos que trabalham com leite diluído — rotina dos laboratórios — informam sobre as condições atuais do beneficiamento, sobre a eficiência da máquina pasteurizadora no ato do beneficiamento do produto ou a acuidade da higienização das canalizações, dos tanques-estoques, das máquinas de engarrafar.

Os resultados obtidos pelo método das concentrações crescentes, procedido num leite "in natura", não diluído, propõe-se a esclarecer sobre a situação de toda a linha de pasteurização prevendo, com 24, 48, 72 horas de antecipação, os desvios que o teor colimétrico do leite irá sofrer, possibilitando, em consequência, as devidas providências.

Realmente, no processo comum das diluições, de acordo com os resultados obtidos, o leite é classificado como correspondendo ou não ao padrão legal sem outra qualquer solução, sujeitando-se as usinas às sanções legais. Resultados satisfatórios de um dia não permitem para o dia seguinte, nem sequer para o mesmo dia, em outro ciclo de pasteurização, ou, até em outra amostra do mesmo leite, verificações idênticas, podendo haver largas flutuações nas leituras.

Pelo método das concentrações, por nós proposto em 1951 (MELLO FILHO, 1951), tais surpresas desaparecem, o trabalho do beneficiamento do leite corre em segurança na previsão estudada dos resultados futuros. Sementeado o leite em concentrações crescentes

tes: 0,1 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 ml, e até mais, vai-se obter um teto de segurança fixado pelo tubo anterior àquele que resultou positivo.

Obtida a gasogenia, usando os coliformes como teste, *v.g.*, no tubo de 8 ml de leite, o teto de segurança estará na altura do tubo de 6 ml, sendo as sementeiras de 0,1 - 1 - 2 - 4 - 6 chamadas de margem de segurança do produto e 6 ml o teto de segurança do beneficiamento do produto.

À proporção que o teto vai baixando, diminuindo portanto a margem de segurança, serão intensificados os trabalhos de desinfecção da aparelhagem, a regulação mais exata da temperatura e da velocidade de trânsito. Dentro desse critério, o leite beneficiado de um dia é o teste da eficiência do beneficiamento do dia subsequente. Com um teto de segurança mantido em bom nível, na altura de 4 a 6 ml de leite, os trabalhos das usinas correrão com satisfatória margem de garantia. Excluída a possibilidade de ocorrências de momento, de maior gravidade, quer nos parecer que o método funciona com razoável regularidade e eficiência. Transcrevendo uma ficha do nosso assentamento, relativo a um exame global do leite temos o seguinte.

Ficha n.º 85 —

1.º segmento — Leite cru, de Roseira, tipo C.

10 milhões de colônias por ml (em placa de gelose-padrão).

Coliformes positivos em 1 x 100.000 e 1 x 1 milhão.

Coliformes negativos em 1 x 10 milhões.

Prova da peroxidase +++

2.º segmento — T. P. (Pasteurizador).

Método comum das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

a) Margem de segurança: coliformes negativos em 1 - 2 - 4 - 6 ml;
coliformes positivos em 8 ml.

b) Teto de segurança: igual a 6 ml.

3.º segmento — T. E. (Tanque estoque).

Método comum das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

- a) Margem de segurança: coliformes negativos em
1 - 2 - 4 ml;
coliformes positivos em
em 6 e 8 ml.
- b) Teto de segurança: igual a 4 ml.

4.º segmento — L. E. (Leite engarrafado).

12.000 colônias por ml.

Método comum das diluições: coliformes negativos
em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações crescentes:

- a) Margem de segurança: coliformes negativos em
1 - 2 - 4 ml;
coliformes positivos em
6 - 8 ml.
- b) Teto de segurança: igual a 4 ml.

Prova da peroxidase: ++

Prova da fosfatase: menos de 1 unidade azul Scharer.

Verifica-se o elevado teor da margem de segurança. Em caso de pioramento progressivo das condições higiênicas da linha de pasteurização, muito antes de as deficiências se exteriorizarem com os resultados do método das diluições, começam a incidir sobre os índices do método das concentrações crescentes, rebaixando o teto de segurança, dando margem suficiente para as medidas corretivas, nos setores indicados pelos resultados das respectivas amostras. Exemplificando:

Ficha n.º 182 —

1.º segmento — Leite cru de Jacareí, tipo C.

15 milhões de colônias por ml.

Coliformes positivos em 1 x 100.000 e 1 x 1 milhão.

Coliformes negativos em 1 x 10 milhões.

Prova da peroxidase: +++

2.º segmento — T. P.

Método das diluições: coliformes negativos em 5
tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

- a) Margem de segurança: coliformes negativos em
1 - 2 - 4 - 6 - 8 ml;
coliformes positivos em
10 ml.
- b) Teto de segurança: igual a 8 ml.

3.º segmento — T. E.

Método das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

a) Margem de segurança: coliformes negativos em 1 - 2 - 4 ml;
coliformes positivos em 6 - 8 - 10 ml.

b) Teto de segurança: igual a 4 ml.

4.º segmento: L. E.

13.000 colônias por ml.

Método das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

a) Margem de segurança: coliformes negativos em 1 - 2 ml;
coliformes positivos em 4 - 6 - 8 - 10 ml.

b) Teto de segurança: igual a 2 ml.

Prova da peroxidase: ++

Prova da fosfatase: menos de 1 unidade Scharer.

Teto de segurança igual a 8 ml no 2.º segmento, a 4 ml no 3.º segmento e igual a 2 ml no 4.º segmento. Contaminação localizada no trecho correspondente à canalização que transporta leite do pasteurizador aos tanques de estoque ou nestes. Essa conclusão não poderia ser feita sob a orientação das provas simples das diluições, que apenas acusou:

2.º segmento: T. P. — Coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

3.º segmento: T. E. — Coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

4.º segmento: L. E. — Coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

O leite teria sido dado como de bom teor colifórmico, não se podendo suspeitar da anomalia, ocorrente em caráter progressivo, até o momento em que se apresentasse na diluição de 0,1 ml, o que o retira do padrão mínimo exigido. O método das concentrações é preventivo, faz a profilaxia das infrações regulamentares; o método das diluições é o método dos fatos consumados. Nos casos

porém em que o teste presuntivo para o coliforme seja positivo já nas diluições habituais — 0,1 ml para o leite tipo C — desaparecem as indicações do método das concentrações proposto, que já não terá aplicação. Sucede freqüentemente, que, apesar de todos os cuidados e da atenção a todos os requisitos de ordem técnica, a presença de coliformes persiste, não havendo recursos, nas rotinas usadas, para prever a evolução da melhoria ou da piora de tal situação.

O MÉTODO DAS DILUIÇÕES CRESCENTES

A fim de atender a êsse aspecto do problema é que propusemos o método das superdiluições, que é exatamente um processo inverso ao das concentrações crescentes. Nêle usam-se diluições inferiores às habituais, em busca das margens de segurança negativa e do teto de segurança negativo. À proporção que a negatividade do teste fôr correndo, os tubos, de baixo para cima, da diluição menor para a maior, estamo-nos aproximando da normalidade funcional da aparelhagem e êsses resultados guiam e orientam os trabalhos de desinfecção e regulação da pasteurização. Pelo método rotineiro das diluições, comumente adotado, obteríamos sempre a cada medida higiênica indicada, um inexpressivo resultado: coliformes positivos em 5 tubos e 0,1 ml. É bem verdade que, dificilmente, na prática corrente, chega-se a empregar o processo das superdiluições, pois as medidas saneadoras costumam ser rápidas e de tal modo efetivas que se fazem sentir imediatamente após o resultado desfavorável que colocou o leite fora do padrão. Com a utilização rotineira, desde 1950, do método das concentrações crescentes, em o nosso laboratório de contrôlo sanitário do leite, na Cooperativa Central de Laticínios, abrangendo pois um decênio de observações, não pudemos deixar de consignar a excelência do processo na prática corrente, e, principalmente, quanto à sua finalidade profilática. Pela orientação que adotamos, semeando o leite tipo C, em série de 21 tubos em escala crescente — 0,1 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 ml — , com três tubos de fermentação para cada valor, promovemos a fusão harmoniosa dos três métodos: o qualitativo, da presença presuntivo, o quantitativo, que estabelece o mais provável número, e o profilático, das concentrações crescentes, num verdadeiro "check-up" da linha de pasteurização. A leitura dos mais prováveis números, com o emprêgo de 3 tubos, pela utilização das sementeiras de 0,1 — 1 e 10 ml, contidas naquela série, é interpretada por tabela especial, correspondente, que passamos a transcrever:

TABLE 21c—TABLE OF MOST PROBABLE NUMBERS (MPN)
PER 100 ML OF SAMPLEUsing 3 Tubes
With 10, and 0.1 ml Volumes

No. of positive tubes in dilutions			MPN per 100 ml.	No. of positive tubes in dilutions			MPN per 100 ml.
10 ml.	1 ml.	0.1 ml.		10 ml.	1 ml.	0.1 ml.	
0	0	0		2	0	0	9.1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29				

TABELA N.º 2 — Tabela dos mais prováveis números (M.P.N.), de coliformes, em 100 ml da amostra, usando 3 tubos (Stand, Meth. exam. water..., 1955).

Como ficou consignado, perfazemos então, uma série de 21 tubos utilizando 3 tubos para cada volume semeado e estabelecendo o resultado pela leitura da parcela maior à menor.

10 +++ 8 ++- 6 +-- 4 ---- 2 ---- 2 ---- 0,1 ----

O teto de segurança no caso, é o de 4 ml e a margem de 0,1 a 4 ml. Às vezes, entretanto, podem surgir situações aparentemente incongruentes, como a que vamos apresentar:

10 +++ 8 ++- 6 ---- 4 +-+ 2 ---- 1 ---- 0,1 ----

Fazemos a leitura estabelecendo em 2 ml o teto de segurança, pois, de acôrdo com o critério do próprio "Standard Methods", quando duas ou mais amostras são comparadas, a que melhor indica a estimativa microbiana, possivelmente também será a que mais bactérias contém. Transportando o raciocínio para o caso presente, o tubo contendo 6 ml de leite falhou na sua ação de vigilância, pela irregular distribuição dos coliformes, embora contendo uma parcela maior do material semeado. Não se pode, entretanto, negar, em comparação com êsse resultado negativo, que o tubo seguinte — 4 ml — gaseificou-se porque havia, presuntivamente, presença de coliformes. Para determinar, nos exemplos apontados, o mais provável número de coliformes, procuramos nos valer da tabela correspondente, lembrando que, se os três tubos contendo 10 ml haviam-se positivado, os demais se mostraram negativos tanto para 1 como para 0,1 ml (3/3, 0/3, 0/3). Encontramos, como resultante, o M.P.N. de 23 coliformes por 100 ml ou sejam 2,3 por 1,0 ml.

Com a utilização de 5 tubos, em circunstâncias semelhantes, isto é, 5 tubos positivos para 10 ml e os demais negativos, verificamos, na tabela adequada, que o número encontrado é o mesmo. A identidade de valores entre as duas verificações, no entanto, como facilmente pode ser verificado pela comparação dos dados das tabelas do M.P.N., usando 3 e 5 tubos, nem sempre é absoluta, sendo mais comum obterem-se resultados aproximados, embora bastante coerentes (ver tabela n.º 1 e 2).

Entretanto, ao expor o método por nós idealizado, encontramos muitas vezes a argumentação de que a prova é excessivamente dispendiosa, por se valer de 21 tubos e que com 9 tubos de fermentação (M.P.N. usando 3 tubos para cada volume semeado), ou mesmo 15 tubos (M.P.N. usando 5 tubos), pode-se realizar operação semelhante, de caráter igualmente profilático, baseado no aumento numérico progressivo dos coliformes. Realmente, à primeira vista a argumentação é poderosa, mas, pela longa prática adquirida a respeito, sabemos que o método do M.P.N. também dotado de clarividência, nem sempre conseguiu detectar, com precisão, as situações anômalas ocorridas, acusadas exclusivamente pelo processo das concentrações crescentes. Documentaremos a afirmativa com fato ocorrido na secção de tanques-estoques da Cooperativa Central de Laticínios. Como rotina de laboratório, colhemos e semeamos amostras do leite cru, pasteurizado, dos tanques, e, no engarrafamento, com resultados coerentes em situações normais. Entretanto, certa ocasião, ao examinarmos tanques-estoques, obser-

vamos um resultado divergente: sete tanques isotérmicos, em média, apresentando os seguintes dados:

10 ++++ 8 +++- 6 ---- 4 ---- 2 ---- 1 ---- 0,1 ----
(M.P.N. igual a 23 coliformes em 100 ml).

Porém, já para o oitavo recipiente da série, recebendo o mesmo leite pasteurizado, a resposta coliforme foi bem diferente, denotando evidência de contaminação no local.

10 ++++ 8 ++++ 6 ++++ 4 +- 2 ---- 1 ---- 0,1 ----
(M.P.N. igual a 23 coliformes em 100 ml).

Com os valores apresentados à luz da tabela do M.P.N., encontramos o mesmo e inexpressivo índice numérico - 23 coliformes -, sem evidenciar o ocorrido, o que vem demonstrar que entre 10 e 1, ou 0,1 ml, existe um intervalo silencioso muito grande, só funcionando ativamente o processo do M.P.N. quando os coliformes já estão positivando 1,0 ml ou 0,1 ml, o que também retira o leite do padrão exigido. Para maior exatidão da pesquisa do M.P.N., procuramos também semear os valores 10 - 1 e 0,1 ml em 5 tubos de fermentação encontrando igualmente o índice 23 (5/5 - 0/5 - 0/5), para tôda a série de tanques. Persistindo a anomalia apresentada, durante tôda uma semana de exames, e ainda mais, havendo nítido pioramento da situação pela retração, cada vez maior, da margem de segurança, que rapidamente se aproximava dos valores 1 e 0,1 ml, procuramos estabelecer, no setor apontado (tanque 8), uma ação saneadora enérgica, controlando a eficiência da higienização local, pelo artifício da sementeira de água esterilizada, derramada como teste nas paredes do tanque o que resultou negativo para presença de coliforme, mesmo nos volumes de 10 ml. Entretanto, apesar da excelência da sanitização efetuada, a situação perdurava, denunciada, firmemente, pela escala das concentrações crescentes sob o silêncio das outras provas colimétricas. Confiados, entretanto, na indicação do nosso método, intensificamos a vigilância sobre o setor afetado, e, numa pormenorizada inspeção local, penetramos no interior do próprio tanque, um espaçoso recipiente cônico horizontal. E, finalmente, detectamos a incorreção, pela presença, teoricamente impossível, de uma gôta de leite naquela imensidão higienizada. Surgia lentamente do corpo cilíndrico do eixo sustentador da hélice de homogeneização, colocado na parte central do tanque (ver fig. n.º 1). Retirada, tornava insistentemente a se formar, mostrando provir da parte ôca daquela haste. Estava resolvida a questão. Desmontada a peça, verificou-se a existência de

discreta efração longitudinal que permitia a progressão ascensional do leite, dentro do extenso eixo ôco, obedecendo ao princípio dos vasos comunicantes e que, ao se coagular, formava um conglomerado caseoso, funcionando como "inoculum" para o leite do dia seguinte, pela dispersão através dos movimentos rotativos da haste. O mal foi prontamente sanado e, no mesmo dia, graças às provas de concentrações crescentes, todos os tanques se harmonizaram na estandarização quase que perfeita dos resultados obtidos.

Igualmente, no setor da pasteurização, graves anomalias têm sido detectadas e corrigidas, pelo método acima referido. De fato, ao examinar o leite pasteurizado, de hábito, colhemos amostra, no setor frio, momentos antes do produto se encaminharem aos tanques-estoques.

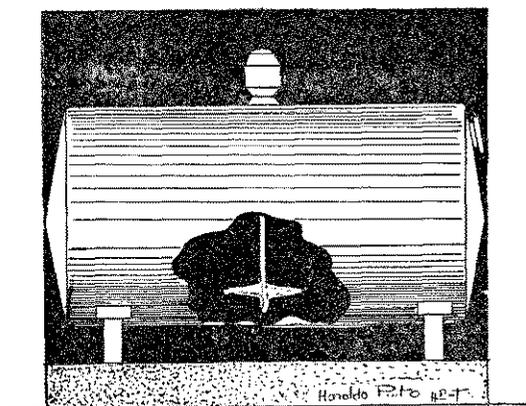


Fig. 1 — Corte esquemático de um tanque-estoque, mostrando o eixo central e a hélice homogeneizadora do leite.

Porém, se os resultados obtidos forem fugindo do esquema conhecido, pela retração progressiva da margem de segurança, devemos então segmentar o exame efetuado, passando também à investigação topográfica do próprio aparelho pasteurizador, que nos métodos rápidos, em placas, possui várias secções, nas quais se processam operações distintas, sempre em circuito fechado: recuperação, filtração, retardamento e refrigeração. Vejamos, para clareza de raciocínio, esquematicamente, como se processa a pasteurização, num aparelho em placas, tipo A.P.V., dotado de duas secções de recuperação e com a capacidade horária de 15 mil litros (ver fig. 2 e 3). O leite cru, penetrando no aparelho em sentido contrário ao leite quente, pasteurizado, que sai demandando a secção de refrigeração, perde frio e ganha calor, em uma operação de dupla troca, no chamado setor de recuperação e, filtrado, dirige-se ao tanque de equilíbrio onde, bombeado, vai às placas de aquecimento e daí ao retardador (15-20 segundos a 75°), onde se encerra a operação quente que constitui a pasteurização propriamente dita. Dêsse trajeto em diante, já pasteurizado, vai perdendo calor, contra

a corrente do leite cru que entra, e, finalmente, refrigerado no setor frio (4-5° C), é recolhido nos tanques isotérmicos e estocado. No aparelho pasteurizador, uma queda brusca accidental da temperatura do beneficiamento (abaixo de 73° C), põe, instantâneamente, em ação um mecanismo de alarme, com retrocesso automático da corrente láctea, através do fechamento da válvula de segurança, situada no final do retardamento e que impede o fluxo do leite subpasteu-

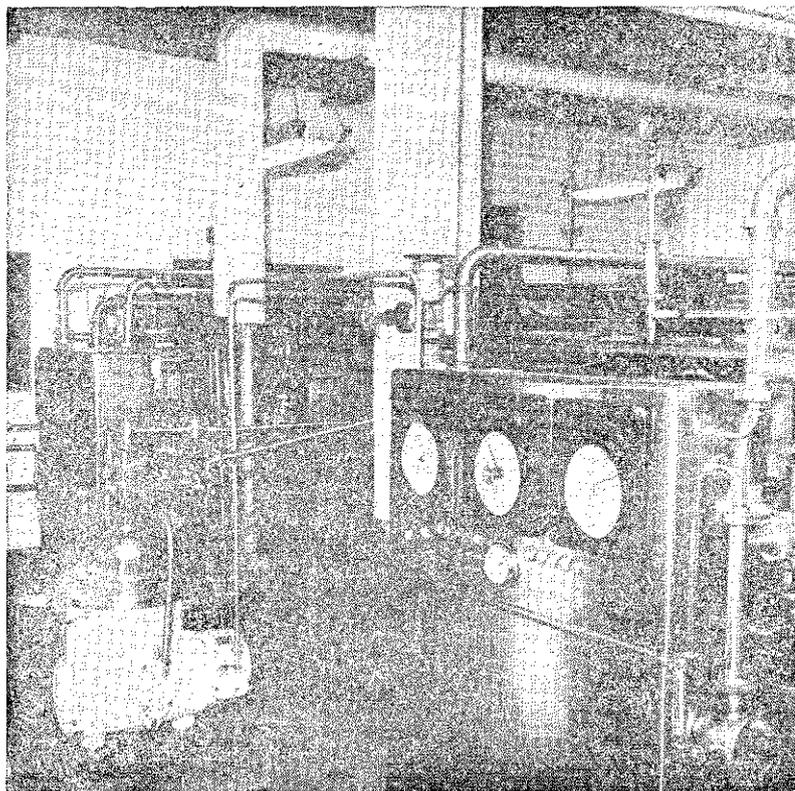


Fig. 2 — Aspecto parcial dos aparelhos A.P.V., de placas, da Cooperativa Central de Laticínios.

rizado, ao tanque-estoque e desvia o seu curso para o tanque de equilíbrio (ver no esquema gráfico), de onde o leite passa ao retardador e novamente ao tanque de equilíbrio, em circuito interno, fechado, sem possibilidade de ir ao estoque, até restauração da normalidade funcional do aparelho. Para a execução de um exame segmentar devemos, pois, colher amostra nas seguintes situações: a) no fim do retardamento, isto é, logo após ter o produto recebido

todo o benefício calórico necessário; b) na primeira secção de recuperação; c) na segunda secção de recuperação; d) e na parte final, após o resfriamento, momentos antes de ir o leite à estocagem.

Um resultado indevido no retardamento delata desajustamento do binômio tempo-temperatura; se na primeira ou na segunda recuperação, acusa perfurações ou mau ajustamento das placas, o que

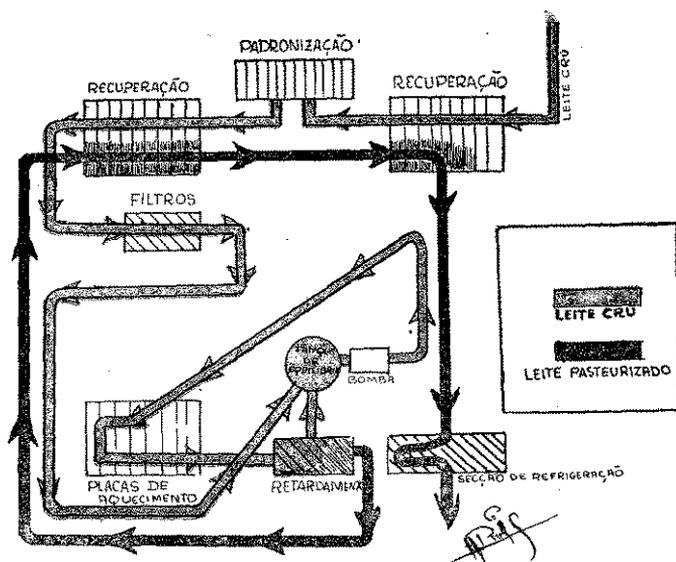
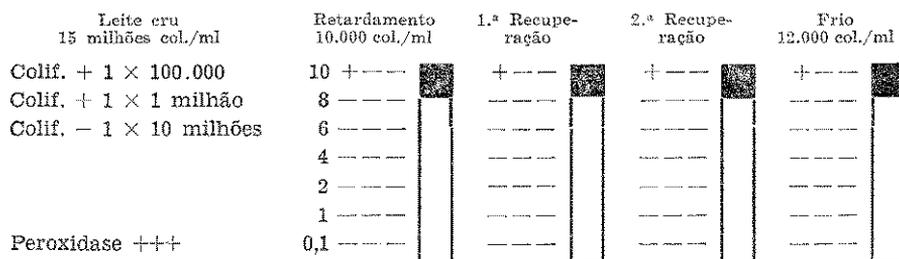


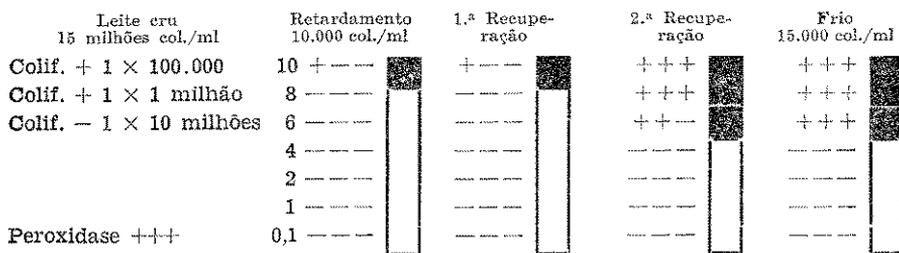
Fig. 3 — Fluxograma representativo do circuito do leite no interior de um aparelho pasteurizador, de placas, dotado de duas secções de recuperação.

permitirá, além do intercâmbio calórico necessário, trocas indevidas entre o leite cru altamente microbiano e o produto já beneficiado. Naturalmente, deve-se, antes de mais nada, excluir a possibilidade da recontaminação do produto, por falta de higienização da maquinaria o que se faz facilmente, pela promoção de uma acurada sanitização, controlada pela sementeira da água quente (85-90° C), que circula no aparelho momentos antes de se iniciarem os trabalhos de pasteurização e colhida na última secção, onde a temperatura é menor (80-85° C). A leitura desta temperatura faz-se no termômetro colocado na secção de salmoura — secção fria. É evidente que esta água, para apresentar resultado satisfatório, não deverá conter coliformes. Acompanharemos o raciocínio feito, com a transcrição do resultado de exame segmentar efetuado em condições de funcionamento normal do aparelho (ver gráfico).



(M.P.N. = 3,6 coliformes por 100 ml)

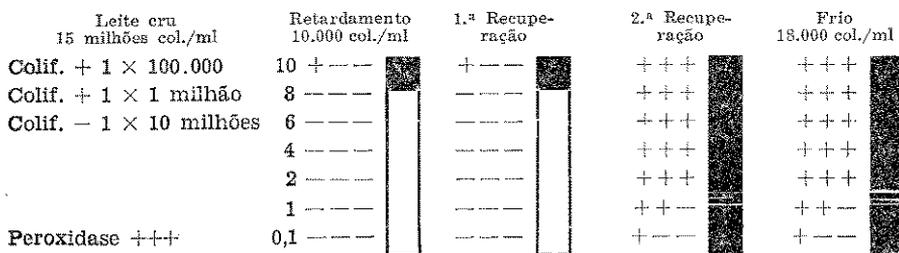
Como se pode verificar pelo esquema gráfico obtido, mantemos, graças a uma elevada margem de segurança, um teto de 8 ml, bem superior ao limite exigido pelos dispositivos legais (0,1 ml). Em caso de surgir uma intercorrência, como a do aparecimento de perfurações nas placas situadas, por exemplo, na segunda recuperação, a margem de segurança começa pouco a pouco a se retrair, aproximando-se da diluição 0,1 ml e uma linha gráfica traçada, tendo como base o valor do teto de segurança, sofreria acentuada queda, a partir deste setor afetado.



(M.P.N. = 3,6 col. em 100 ml)

(M.P.N. = 23 col. em 100 ml)

Em caso de agravamento da anormalidade verificada obteremos os seguintes resultados:



(M.P.N. = 3,6 col. em 100 ml)

(M.P.N. = 150 col. em 100 ml)

As perfurações surgidas nas placas podem ser únicas ou múltiplas, macroscópicas ou invisíveis a olho desarmado, e, neste caso,

o acerto das providências adotadas poderá ser controlado pela elevação gradual do teto de segurança, apreciado pelo processo das concentrações crescentes, já que pela avaliação do M.P.N., o índice permanece inexpressivamente o mesmo, desde que deixem de se positivar os valores 1 e 0,1 ml. É de se notar que, na maioria dos casos, a não ser quando as perfurações foram muito grandes, a prova da fosfatase permaneceu negativa, não acusando a presença anormal, indetectada, do leite cru.

* * *

Tendo observado nos exames rotineiros de laboratório, por inúmeras vezes, o aparecimento de perfurações nas placas dos nossos aparelhos A.P.V., causadas pelo desgaste originado na justaposição rigorosa das placas, pelas contínuas operações de higienização e ajustagem da maquinaria e corrosões por causas diversas, nessas circunstâncias pudemos levar a efeito um estudo comparativo entre o valor da prova colimétrica, fosfatasimétrica e a da contagem global. Segundo critério conhecido, sabe-se que o teste para a fosfatase é capaz de indicar a presença mínima de 1 ml de leite cru misturado em cada litro do produto beneficiado (HAMMER & col., 1957; BURGWALD, 1939; HAHN & col., 1939; LOPES, 1944).

No caso visto, do encontro de perfurações na segunda secção de recuperação com presença de coliformes em 0,1 ml e negatividade fosfatasimétrica, é evidente que o leite cru associado estaria agindo como "inoculum" bacteriano mas não como "inoculum" fosfatásico, pelo menos em quantidade detectável. Tal fato vem demonstrar, sem dúvida alguma, a maior acuidade da prova da pesquisa dos coliformes que apontou a origem da anomalia sendo o teste da fosfatase negativo, naturalmente por se encontrar o leite cru misturado no produto pasteurizado em parcelas menores do que 1 ml por mil, que seria o limite da detectibilidade fosfatasimétrica. Sabemos, desde Kay & Graham (CECILIA, 1956), e SCHARER (1938), que 96% da fosfatase são inativos a 75° C no período de 15 segundos, e, ainda, segundo critério mais recente, completamente inativados (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; ROGICK, 1959). Fazendo um raciocínio paralelo ao já visto, podemos, sem dificuldade, chegar à conclusão de que, nos desvios ligeiros da pasteurização, o leite imperfeitamente beneficiado poderá funcionar como se fôsse leite cru passado em parcelas mínimas, indetectável por meios fosfatasimétricos mas evidenciável pela prova mais sensível dos coliformes. Tal fato já foi por nós observado e costuma suceder principalmente

quando há variação na duração do tempo de retardamento, pois a temperatura da pasteurização é de fácil contróle através da leitura do traçado termográfico ou do termômetro aferido, situado na parte terminal do retardamento: Este é um aspecto da questão que deve ser bem examinado, pois, se aceito, virá modificar o critério clássico de que o teste da fosfatase é índice de boa pasteurização e a prova para coliformes, afirmativa de posteriores recontaminações. Pelo novo critério a se adotar, além da prova da fosfatase, e, melhor do que ela, o teste de coliformes indicaria a correção da pasteurização efetuada. Quando negativo no retardamento, sua posterior positividade seria então índice de recontaminação, quer por imperfeita higienização da maquinaria ou pela mal ajustagem ou existência de perfurações nas placas, nas secções de recuperação, o que indiretamente corresponderia, até certo ponto, a uma subpasteurização do produto. Voltando à questão da presença de perfurações, nas placas recuperadoras, para avaliarmos a quantidade do leite cru que vinha de mistura com o leite pasteurizado, retirando-o do padrão colimétrico, sabendo pela prova da fosfatase negativa, que era menor do que 1 ml por mil, idealizamos o seguinte recurso experimental: colhemos o leite em duas situações diversas, na secção quente (retardamento), e na 2.^a secção de recuperação, semeamos e obtivemos em função das soluções de continuidade existentes nas placas, para o mesmo produto beneficiado, dois resultados diferentes quanto à expressão coliforme, aproximados quanto à contagem global e idênticos pelo método da fosfatase.

Leite cru 15 milhões col./ml	Leite do retardamento 4.000 col./ml	Leite da 2. ^a secção de recuperação 10.000 col./ml
Colif. + 1 × 100.000	10 + — —	10 + + +
Colif. + 1 × 1 milhão	8 — — —	8 + + +
Colif. — 1 × 10 milhões	6 — — —	6 + + +
	4 — — —	4 + + +
	2 — — —	2 + + +
	1 — — —	1 + + —
Peroxidase + + +	0,1 — — —	0,1 + + —
	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Peroxidase } + + \\ \text{Fosfatase: ausência de} \\ \text{coloração} \\ \text{M.P.N.} = 3,6 \text{ colif. em} \\ \text{100 ml} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Peroxidase } + + \\ \text{Fosfatase: idem} \\ \text{M.P.N.} = 210 \text{ colif. em} \\ \text{200 ml} \end{array} \right.$

De posse desses dados, coletamos ainda no retardamento, oito litros de leite corretamente pasteurizado, semeando-os com quantidades crescentes de lei cru — 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,3 - 0,5 - 0,7 - 1, e

2 ml — isto é, parcelas infra e suprafosfatasimétricas, tentando reproduzir, no laboratório, a anomalia verificada no aparelho pasteurizador. Obtivemos, pela sementeira do material:

LEITE COLHIDO NO RETARDAMENTO + LEITE CRU

Leite cru 15 milhões col./ml	Retard. 4.000 col./ml	+0,01 5.000	+0,05 5.500	+0,1 11.000	+0,3 15.000	+0,5 20.000	+0,7 25.000	+1 50.000	+2 90.000
Colif. + 1 × 100.000	10 +---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. + 1 × 1 milhão	8 ----	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. - 1 × 10 milhões	6 ----	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0,1 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Peroxidase +++	$\left\{ \begin{array}{l} \text{M.P.N.} = 3,6 \text{ coli? por} \\ 100 \text{ ml} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{M.P.N.} \\ = 150 \\ \text{col. por} \\ 100 \text{ ml} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{M.P.N.} = + \text{ de } 1.100 \text{ coliformes por} \\ 100 \text{ ml} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{menos de} \\ 1 \text{ U.S.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{mais} \\ \text{de } 1 \\ \text{U.S.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{mais} \\ \text{de } 2 \\ \text{U.S.} \end{array} \right.$

Enquanto a contagem global pouco se modificava, mostrando, pela sua relativa inércia, uma pequena sensibilidade, o teste para coliformes acusou, seguramente, desde a parcela mínima de 0,01 ml do leite cru inoculado, pela positividade dos valores da escala das concentrações crescentes, a contaminação por nós provocada.

Com a sementeira de 0,1 ml do leite cru, conseguimos reproduzir, no laboratório, a mesma condição criada no aparelho A.P.V., na sua segunda secção de recuperação, pela presença anômala das perfurações nas placas de aço inoxidável. Então chegamos à conclusão de que, teoricamente, a passagem do leite cru contaminante estava se fazendo na ordem de 0,1 ml por mil de leite pasteurizado. Desde que a prova da fosfatase somente conseguiu detectar o leite cru quando da mistura de 0,5, 0,7 e 1 ml, e mesmo assim pela evidência discreta de uma delicada nuance azulada, menor de que 1 unidade Scherer, chegamos à conclusão de que o teste para coliformes é possivelmente cinco vezes mais sensível do que o da fosfatase, na evidência da presença do leite cru, e, porque não dizer, na evidência das subpasteurizações. Na prova por nós levada a efeito, havíamos procurado contaminar o leite pasteurizado por quantidades crescentes de leite cru da boa procedência e, portanto, de teor coliforme e bacteriano global, relativamente pequeno. No intuito de saber o que aconteceria no caso da passagem através das perfurações das placas recuperadoras, de leite cru altamente microbiano, contaminando decisivamente o produto beneficiado, resolvemos repetir o mesmo artifício de técnica, utilizando porém, como "inoculum", leite cru conhecidamente poluído.

Os resultados, coerentemente, foram os seguintes:

LEITE DO RETARDAMENTO + LEITE CRU

Leite cru 70 milhões col./ml	Retard. 5.000 col./ml	+0,01 11.000	+0,05 13.000	+0,1 18.000	+0,3 20.000	+0,5 25.000	+0,7 32.000	+1 70.000	+2 120.000
Colif. + 1 × 100.000	10 + --	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. + 1 × 1 milhão	8 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. - 1 × 10 milhões	6 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. - 1 × 100 milhões	4 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0,1 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

{ M.P.N. =
 3,6 coli%.
 por 100 ml } M.P.N. = mais de 1.100 coliformes por 100 ml

Peroxidase ++ { Fosfatase: ausência de coloração azul } { menos de 1 U.S. } { mais de 1 U.S. } { mais de 2 U.S. }

A contaminação foi dez ou mais vezes intensa, apontada pela presença de coliformes mesmo em 0,1 ml do leite inoculado, com a parcela mínima de 0,01 ml do produto em estado de cru. A contagem global, entretanto, pouco se modificou, ficando absolutamente dentro do padrão legal exigido, sendo o resultado fosfatasimétrico naturalmente o mesmo, afastando-se ainda mais, pelo critério da sensibilidade, o teste para coliforme daquelas duas provas. A melhor explicação que podemos oferecer para a disparidade de resultados entre os testes para coliformes e a prova da contagem global é a de que a verificação colimétrica é processo tão seletivo que permite a detecção destes microrganismos mesmo quando se constituem uma pequena percentagem da flora total. De fato, é comum na prática corrente, encontrarmos resultados semelhantes ao verificado, isto é, um produto beneficiado, apresentando coliformes presentes até em 0,1 ml mas com baixa contagem global e prova de fosfatase negativa. E aqui abrimos um parêntese para dizer o que entendemos por negatividade fosfatasimétrica.

Para o leite fervido (contrôle negativo), não se evidencia, na coluna líquida do álcool butílico utilizado como extrator do indofenol azul, coloração alguma (prova negativa). Para o leite cru, obteríamos uma intensa coloração azul (contrôle positivo). Para o leite ou creme corretamente pasteurizados, comercialmente ou para maior segurança da afirmativa, pasteurizados em laboratório, não se evidencia coloração alguma ou no máximo ligeira nuance, e as amostras serão classificadas como própria ou imprópriamente pasteurizadas se a coloração presente fôr menor, igual ou maior do que 1 unidade do teste padrão (1 U.S.) (Applied Res. Inst., 1958). Um resultado negativo, nessas condições, poderá, entretanto, também indicar que

a amostra tem menos atividade fosfatásica que a sensibilidade para a qual o teste foi idealizado. Entretanto, muitos estudiosos do assunto admitem um critério diferente, como índice de pasteurização correta a presença de coloração até um limite igual ou inferior a 2 unidades do padrão (BURGWALD, 1939; LOPES, 1944; CECILIA, 1956). Na figura n.º 4 estão representadas, numa série de tubos, as diversas gradações colorimétricas encontradas na pesquisa fosfatasimétrica pelo método rápido de SCHARER (1938). Da esquerda para a direita, os três primeiros tubos contendo respectivamente, leite fervido, pasteurizado comercialmente. (A.P.V.), e pasteurizado em laboratório, não evidenciaram coloração alguma. O tubo seguinte, contendo leite devidamente pasteurizado associado a 0,7 por mil de leite cru, já acusa uma muito sutil nuance azulada, menor do que 1 unidade do padrão. Os tubos subseqüentes, contendo, respectivamente, leite cru adicionado ao leite pasteurizado na proporção de 1 e 2 ml por mil, já evidenciam, respectivamente, coloração maior do que 1 e 2 unidades. A seguir o padrão colorido n.º 5: um dos índices de leite mal pasteurizado e o tubo de cor azul intensa, cor-

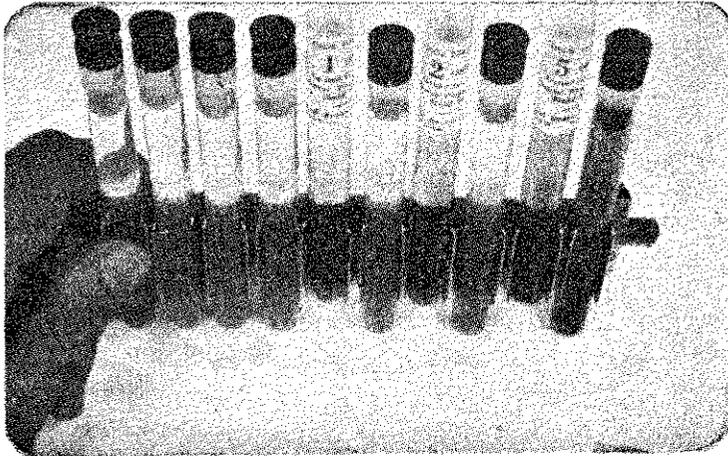


Fig. 4 — Bateria de tubos utilizados no processo da determinação colorimétrica da fosfatase, pelo método rápido de Scharer.

respondente ao leite cru. A orientação que adotamos é a mesma do “Applied Research Institute”, de Nova York, produtor dos reativos para a determinação rápida fosfatasimétrica. Quanto à precisão desse método, trabalhos diversos, e entre eles os de BURGWALD (1939) e o de LOPES (1944), indicam correr parrelhas com o processo lento ou com a prova de Kay e Graham.

Como recomendação fundamental para a boa realização da prova rápida de Scharer, devemos lembrar, entre outras medidas, o aquecimento prévio, em banho-maria (37-38° C), dos tubos contendo a mistura da solução PHOS-PHAX (5 ml) e do leite a ser testado (0,5 ml), posteriormente incubados a 37° C, numa estufa cultora, durante período de 20 a 30 minutos. Removidos da estufa, adicionamos, a cada unidade, 6 gotas da solução INDO-PHAX (C.Q.C.), homogeinizamos e aguardamos 5 a 10 minutos antes de realizar a leitura, diretamente ou pela extração do indofenol azul. Providência também fundamental é a repassagem em água destilada, dos tubos e das pipetas utilizadas no processo, evitando assim a interferência falseadora dos alcalinos utilizados na higienização do material.

As soluções reativas, INDO-PHAX e principalmente a PHOS-PHAS, devem ser de preparação recente e se estocadas, aconselha-se conservá-las no congelador. Pelo que ficou descrito, utilizando como padrão-teste o tubo de 1 U.S., quer nos parecer que, se pelo critério colorimétrico, quantidade igual a 1 ml $\frac{0}{100}$ de leite cru é capaz de produzir visível coloração azul, parcelas menores podem, entretanto, se evidenciar pela elaboração de delicada nuance azulada, mais atenuada do que aquêlê valor limite estabelecido.

OBSERVAÇÕES DE ORDEM GERAL

a) — Na utilização do processo das concentrações crescentes é oportuno lembrar que, em relação às sementeiras, seguimos a orientação dos "Standard Methods" (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water. . . , 1955), isto é, utilizamo-nos de 10 ml do meio bile-lactose-verde brilhante para as parcelas de 0,1 a 4 ml do leite e 20 ml daquele meio de cultura para volumes maiores de 6 a 10 ou mais ml.

b) — No caso visto, da presença de perfurações nas placas da segunda secção de recuperação, para normalização da situação, efetuamos a exclusão seletiva das placas danificadas pela utilização dos seguintes processos. Pela simples colocação, em câmara escura, da placa suspeita contra um foco luminoso. Pela pincelagem de uma das faces da placa, com líquido adesivo associado à fenolftaleína, e da outra face, com solução de hidróxido de sódio. O aparecimento de pontilhado róseo seria indicação colorimétrica da presença da solução de continuidade. Entretanto, essa prova não é de grande sensibilidade, uma vez que o leite, no interior do aparelho, circula entre

as placas, sob pressão, e não nos foi possível, evidentemente, reproduzir tal fato com a solução alcalina utilizada. Após a exclusão das placas perfuradas, continuamos, entretanto, a observar índices insatisfatórios para as amostras de leite colhidas naquela secção de recuperação, como possível evidência da presença de microperfurações em outras placas.

Como prova e contraprova da nossa hipótese, lançamos mão de um artifício de técnica, efetuamos monobloco, uma operação de dupla troca, entre as placas da segunda recuperação dos nossos dois aparelhos pasteurizadores, e, de fato, o mau resultado acompanhou o grupo de placas suspeitas, entrando o aparelho que, anteriormente, apresentava a incorreção, em absoluta regularidade funcional.

Na verdade, existem atualmente, rigorosos processos electrônicos capazes de acusar diferenças mínimas na espessura das placas ou presença de microcavidades e efrações na sua estrutura metálica.

c) — E como consideração final, seria interessante o emprêgo do método das concentrações crescentes para um estudo comparativo da eficiência dos diversos aparelhos pasteurizadores existentes nos principais estabelecimentos de laticínios do Estado de São Paulo.

RESUMO

Após ligeiras considerações iniciais, sôbre o emprêgo da pasteurização do leite, faz o autor um estudo comparativo entre os métodos colimétricos empregados na rotina dos laboratórios de controle sanitário do leite e o processo colimétrico da concentração crescente. Tendo em vista que a pesquisa da presença presuntiva dos coliformes apenas registra a situação atual da flora do leite, portanto quando o leite pasteurizado já se encontra contaminado, as providências decorrentes seriam sempre efetuadas visando o leite do dia seguinte. Procurou elaborar então um processo que permitisse a previsão dos resultados de maneira a entreter o produto dentro dos padrões legais ou mesmo com uma apreciável margem de segurança. Para tanto, sabendo que para o leite tipo C, o regulamento federal exige negatividade coliforme em 0,1 ml, semeou o produto em concentrações crescentes — 0,1 - 1, - 2, - 4, - 6, - 8, - 10 ml — numa série de 21 tubos de fermentação (bile-lactose-verde brilhante), com 3 tubos para cada parcela do leite. Obtida a positividade, por exemplo, no tubo de 10 ml, o teto de segurança estaria na altura do tubo de 8 ml, sendo as sementeiras 0,1 - 1, - 2, - 4, - 6, - 8, chamadas de margem de segurança. A proporção que o teto vai

baixando, diminuindo portanto a margem de segurança, serão intensificados os trabalhos de regulação e desinfecção da aparelhagem. Pelo método das concentrações crescentes, as surpresas desaparecem e o trabalho do beneficiamento do leite corre em segurança, na previsão estudada dos resultados futuros. Pela utilização do processo da verificação dos mais prováveis números (M.P.N.), utilizando 3 tubos e três volumes diferentes — 0,1 - 1, - 10 ml — contidos na série dos 21 tubos de fermentação da prova da concentração crescente, verificou-se que, quando havia positividade do volume 10 ml, só poderíamos ter nova indicação da evolução da anomalia quando a positividade alcançasse 1 ml, o que representa intervalo silencioso muito grande nessa prova. Tal fato vem mostrar a superioridade do processo da sementeira em concentrações crescentes na previsão das irregularidades na linha de beneficiamento do leite. Em relação ao aparecimento de perfurações nas placas, no setor de recuperação, de aparelhos A.P.V., verificou o autor que, enquanto o leite do retardamento acusava um elevado teto de segurança (8 ml), já no setor de recuperação os coliformes se faziam presentes em 0,1 ml. Baseado na negatividade da prova de fosfatase, sabendo que a mesma não detecta quantidades de leite cru menores do que 10^{-6} , supondo que a contaminação era menor do que 10^{-6} ou 0,1%, realizou o autor um ensaio experimental, capaz de determinar o volume do leite cru que se misturava ao leite pasteurizado. Para isso colheu oito litros do leite pasteurizado, no retardamento, e associou, ao mesmo, quantidades crescentes do leite cru — 0,01 - 0,03 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 0,7 - 1 e 2 ml — isto é, quantidades infra e suprafosfatométricas. E pelo emprêgo do processo das concentrações crescentes verificou que o leite pasteurizado do retardamento, com teto de segurança igual a 8 ml, passou a apresentar índices cada vez mais baixos até positividade em 0,1 ml quando a parcela do leite cru inoculada foi de 0,1 ml. Portanto, concluiu que a quantidade do leite cru que passou, no caso das perfurações das placas e retirou o leite beneficiado do padrão sanitário exigido, era da ordem de 0,1 ml por mil. Tendo o leite cru, no caso visto, funcionado como “inoculum” colifórmico mas não como “inoculum” fosfatásico detectável, chegou o autor à conclusão de que a prova para a verificação da presença presuntiva de coliformes é mais sensível do que a prova da fosfatase na verificação da recontaminação por leite cru. Desde que a fosfatase é completamente inativada pela pasteurização bem dirigida, fazendo um raciocínio paralelo, concluiu que, nos desvios ligeiros da pasteurização, o leite,

imperfeitamente beneficiado, poderia funcionar como leite cru passado em parcelas mínimas, não detectado pela fosfatasimetria mas evidenciado pelo teste para coliformes. Portanto, o teste para coliformes já que se mostra tão sensível, deverá, ao lado da prova para pesquisa de fosfatase, e talvez melhor do que ela, ser utilizado na verificação da eficiência da pasteurização, como, também, na determinação das recontaminações verificadas.

SUMMARY

After introductory remarks about the use of milk pasteurization, the author performs a comparative study among the coli counting methods employed as a routine in the laboratories of milk sanitary control and the coli counting process of the increasing concentration. Considering that the study of the presumptive presence of the coliform organisms registers only the bacterial densities of flora at the moment, when the pasteurized milk is already recontaminated, the author states that the sanitization procedures would always affect next day milk. Then the author experimented a process that allowed a forecast of the results in order that the product could be maintained within the standard level and offering even a certain safety margin. So, as the Federal Regulation demands absence of coliform organisms in 0.1 ml, for milk classified as C type, the author performed inoculations in increasing concentrations — 0.1, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ml or more. He built a series of 21 fermentation tubes, brilliant green-lactose-bile broth, with 3 tubes for each portion of milk. When a positive result is obtained, for instance in the three last tubes (10 ml), the upper level of safety would be at 8 ml. Inoculations of 0.1, 1, 2, 4, 6, 8 ml would be called safety margin. Whenever the upper level decreases, dragging with it the safety margin, the whole procedure of sanitization and regulation of the equipment must be intensified. By the usage of the increasing concentrations the factor surprise does not count, and the operation is safely executed, giving through the study of the present data the picture of the future results. Through the application of the method of the computation of the most probable numbers (M.P.N.), using 3 tubes and 3 different volumes — 0.1, 1, 10 ml — pertaining to the series of 21 fermentation tubes the author reached to some conclusions. He observed that when there is a positive result in 10 ml, a new indication could only be obtained

when the positive result reached 1 ml. This silent period in a test is too large. This disadvantage of the M.P.N. test shows the superiority of the process of inoculations in increasing concentrations in forecasting the defects in pasteurization. In relation to the presence of perforations in the plates, at the level of the Regenerative Section, in a A.P.V. equipment, the author observed that while the milk of the Tubular Holding System, showed a high upper level (8 ml), coliform organisms were present in 0.1 ml, even in the Regenerative Section. The author knowing that the phosphatase test does not indicate the presence of raw milk in quantities smaller than 1‰, he essayed an experimental work in order to detect the volume of raw milk that was being mixed with pasteurized milk in the regenerative section. In this complementary test the author is able to calculate the volume of raw milk mixed to the pasteurized one. For this purpose he selected 8 litres of pasteurized milk obtained from the tubular holding system, and added to them increasing quantities of raw milk — 0.01, 0.03, 0.05, 0.01, 0.5, 0.7, 1 and 2 ml — that is quantities that are below and above the detection power of the phosphatase test. Through the usage of the increasing concentrations process the author observed that the pasteurized milk of the tubular holding system, with an upper level of 8 ml, showed figures gradually lower until a positive result in 0.1 ml — pasteurized milk plus 0.1 ml of raw milk. This all happened when the inoculated volume of raw milk was 0.1 ml. Hence, he concluded that the volume of raw milk that passed through the perforations of the plates presented a percentage of 0.1 ml ‰. The author explains that in this case, the raw milk acted as a coliform “inoculum”, and not as a phosphatase inoculation that could be detected. After these comments he concludes that this test used for the detection of coliform organisms is more accurate than the phosphatase test in observing the recontamination with raw milk. Phosphatase is completely inactivated through a correct pasteurization. Hence the author reaches to the conclusion that when the pasteurization presents light defects, the imperfectly treated milk could act as raw milk passing in very small portions, undetected by phosphatase test but indicated by the test for coliform organisms. Consequently, this last test being so exact should be used as a routine procedure employed in checking the efficiency of pasteurization, as well as the rate of detected recontamination.

BIBLIOGRAFIA

BURGWALD, L. H. — The phosphatase test. A review of the literature on its application for detecting irregularities in the pasteurization of milk and dairy products. *J. dairy Scien.*, 22: 853-879, 1939.

CECILIA, C. A. — Enciclopedia de la leche. Edit. Espasa-Calpe, S. A., Madrid, 1956.

FOSTER, E. M., F. E. NELSON, M. L. SPECK, R. N. DOETSH & J. C. OLSON — Dairy Microbiology. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1957.

HAHN, A. J. & P. H. TRACY — Controlling milk pasteurization efficiency through the use of the phosphatase test. *J. dairy Scien.*, 22: 191-200, 1939.

HAMMER, B. W. & F. J. BABEL — Dairy Bacteriology. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. Publishers, New York — Chapman & Hall. Limited, London, 1957.

HOSKINS, J. K. — In Standard Methods, pág. 153. The most probable numbers of *B. coli* in water analysis. *J. Am. Water Works*, 25: 867-877, 1933.

HOSKINS, J. K. — In Standard Methods, pág. 153. Most probable numbers for evaluation of *Coli-aerogenes* tests by fermentation tube method. *Publ. Health Rep.*, 49: 393, 1934.

LOPES, C. F. — Contrôles da eficiência da pasteurização do leite pela prova da fosfatase. *Rev. Ind. Animal*, 7: 47-59, 1944.

LOPES, C. F. — Observações sobre os fatores de insucesso e de recontaminação do leite pasteurizado. *Bol. Ind. Animal*, 11: 145-163, 1950.

LOPES, C. F. & F. S. SILVA FILHO. Tipos de leite em São Paulo. *Bol. Ind. Animal*, 14: 153-163, 1954.

MC CRADY, H. M. — In Standard Methods, pág. 153. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J. infect. Dis.*, 17: 183-212, 1915.

MC CRADY, H. M. — In Standard Methods, pág. 153. Tables for rapid interpretation of fermentation-tube results. *Canad. publ. Health J.*, 9: 201, 1918.

MELLO, A. & N. MASTROFRANCISCO — Verificações sobre a presença do bacilo tuberculoso no leite da Capital. *Rev. Ind. Animal*, 1: 25-42, 1938.

MELLO, A. — O leite. Alguns aspectos relacionados aos fenômenos da nutrição, da industrialização e da produção. *Bol. Ind. Animal*, 6: 3-8, 1943.

MELLO FILHO, A. — Contribuição ao estudo da verificação presuntiva dos coliformes no leite pasteurizado. *Arq. med. munic.*, 3: 147-158, 1951.

MELLO FILHO, A. — Aspectos gerais da nutrição. Album comemorativo do jubileu de prata da Coop. Central de Laticínios de São Paulo, São Paulo, 1958.

PESTANA, B. R. — Da meningite tuberculosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1: 40-54, 1941.

Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Serv. Inf. Agr., Min. Agric., Rio de Janeiro, 1953.

ROGICK, F. A. — Estudo comparativo entre os tipos de leite A, B e C consumidos em São Paulo. *Bol. Ind. Animal*, 17: 83-87, 1959.

ROGICK, F. A. — Pesquisas sobre manteigas fabricadas em São Paulo e sua conservação em frigorífico. Fosfatasimetria. *Bol. Ind. Animal*, 17: 155-165, 1959.

SCHARER, H. — A rapid phosphomonosterase test for control of dairy pasteurization. *J. Dairy Scien.*, 21: 21-34, 1938.

Scharer modified phosphatase test. Instructions. Applied Research Institut, New York, 1953.

SILVA, F. S. — Provas de laboratório no controle de leite pasteurizado tipo "A", V Cong. bras. Med. vet. Anais, págs. 383-388, 1951.

Standard methods for the examination of dairy products. 10th ed. Amer. Pub. Health Ass. Inc., New York, 1953.

Standard Methods for the examination of water, sewage and industrial wastes. 5th ed. APHA — AWWA — FSIA — Amer. Pub., Health Ass. Inc., New York, 1955.

VILLARES, J. B. — Qualidade do leite tipo C em São Paulo. Fundamento de uma campanha de aumento do consumo do leite. *Bol. Ind. Animal*, 17: 55-81, 1959.

ERRATAS

PAG. 136

Onde se lê

“quantidades maiores de 0,1 e 10 ml.”

Leia-se

“quantidades maiores de 1 e 10 ml.”

PAG. 142

Onde se lê

Using 3 Tubes

With 10, and 0,1 ml volumes

Leia-se

Using 3 Tubes

With 10, 1,0 and 0,1 volumes

PAG. 152

Onde se lê

Leite cru

70 milhões col./ml

Colif. + 1 × 100.000

Colif. + 1 × 1 milhão

Colif. - 1 × 10 milhões

Colif. - 1 × 100 milhões

Leia-se

Leite cru

70 milhões col./ml

Colif. + 1 × 100.000

Colif. + 1 × 1 milhão

Colif. + 1 × 10 milhões

Colif. - 1 × 100 milhões

SÔBRE UM MEIO DE CULTURA PARA O *HAEMOPHILUS DUCREYI*

Alguns dados técnicos referentes ao isolamento dêsse bacilo

LUÍS DE SALLES GOMES (*)

Foi somente após a publicação da memorável "These" com que DUCREY (1889) concorreu à livre docência da "Clínica demo-sifilopática" da Real Universidade de Nápoles que ficou definitivamente estabelecida a etiologia bacilar da ulceração venérea conhecida desde há muito tempo com as denominações de cancro mole, *Ulcus molle*, cancróide, etc. Pouco lembrada em alguns dos seus detalhes — possivelmente pela raridade bibliográfica do original — merece essa notável monografia científica um especial destaque, sobretudo pela precisão com que, à falta de meios artificiais de cultura eficientes, soube o autor lançar mão de métodos experimentais para comprovar a especificidade bacilar de uma doença venérea contagiosa e de tão alta incidência em todo o mundo.

Com apoio em dados fundamentais estabelecidos por anteriores cientistas (perfeito conhecimento do cancro mole sob o ponto de vista clínico; possibilidade, segundo RICORD (1838), da sua auto-inoculabilidade cutânea; pesquisas bacterioscópicas realizadas nas secreções ulcerosas por MORISON (1883), e, principalmente, por FERRARI (1885) que nelas verificou "a presença constante de bacilos, muito menores que o da tuberculose e o da lepra, só visíveis com forte aumento — Oc. 4, obj. im. 1/12, Zeiss, os quais muito possivelmente deveriam estar relacionados com o processo ecológico"), orientou-se Ducrey no sentido da experimentação, procurando desde logo obter, em série, uma estirpe do bacilo que, passada de braço a braço de voluntários, sob as naturais precauções de assepsia e antissepsia, viria a chegar, pura e em pleno viço, à 15.^a geração.

Da 6.^a passagem em diante, o bacilo já se apresentava nos focos ulcerosos provocados nos braços, em condições de absoluta

(*) Diretor da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz. Recebido para publicação em 12 de dezembro de 1960.

pureza, isto é, livre de bactérias de associação, facultando destarte mais precisas observações sobre a sua morfologia, suas reações corantes, seu comportamento em face dos meios artificiais de cultura da época, e finalmente, sobre a relação de causa e efeito entre bacilo e ulceração.

Muito embora falhassem, nas mãos de Ducrey, os repiques do germe, então puro, sobre 14 diferentes meios artificiais de cultura, nem por isso deixamos de considerar o seu isolamento em condições de absoluta pureza e a sua manutenção em passagens sucessivas no próprio tecido vivo que lhe servia de habitat, como uma primeira e autêntica cultura.

UNNA (1892), examinando ao microscópio cortes de tecido colhido da ulceração venérea, chamou a atenção para a fase em cadeia que o bacilo descrito por Ducrey podia também apresentar, e por isso chamou-o de estreptobacilo do cancro mole.

Alguns anos após essas interessantes pesquisas, começaram a aparecer as primeiras referências a culturas do bacilo de Ducrey em meios sólidos e artificiais de cultura.

Em 1893, PETERSEN referiu ter obtido, de modo inconstante, cultura do bacilo de Ducrey em meio de ágar-sêro. Inoculada no homem, esta cultura produziu uma pequena pústula que, porém, cicatrizou espontaneamente no 5.º dia. Mais tarde, em 1898, ISTOMANOFF & AKSPIANZ, e depois LENGLET (1901), referiram-se à obtenção de culturas do bacilo em meio de ágar-pele humana. Dêses trabalhos, porém, não são conhecidas posteriores confirmações.

Entretanto, com a publicação, em 1901, do interessante e convincente trabalho de BEZANÇON, GRIFFON & LE SOURD, sobre a cultura do bacilo de Ducrey em meio de ágar-sangue de coelho, misturados na proporção de 2 partes de ágar e 1 parte de sangue de coelho, novos e largos campos de pesquisa foram abertos à curiosidade científica.

O trabalho de Bezançon e colaboradores mereceu, desde logo, confirmação de SIMON (1902), de TOMASCZEWSKI (1903), de DAVIS (1903), e, por fim, de inúmeros outros pesquisadores que, a pouco e pouco, foram se interessando pelo isolamento do bacilo e ao mesmo tempo contribuindo para o melhor conhecimento da sua biologia.

É evidente que não cabem nos estreitos limites dêste trabalho as citações bibliográficas das numerosas e interessantes monografias estrangeiras e nacionais até então publicadas, e referentes às

diversas modificações introduzidas na fórmula do meio de cultura fundamental apresentado em 1901 por Bezançon e colaboradores. Essas modificações ou variantes poderiam, de um modo geral, ser assim discriminadas: adição de substâncias de alto teor nutritivo; substituição do sangue integral por sangue desfibrinado de coelho; aproveitamento do sangue humano, de cavalo, de boi ou de carneiro; e, finalmente, utilização dos meios líquidos convenientemente enriquecidos, em proporções variáveis, seja com sôro ou plasma hemoglobinaados, seja com sangue desfibrinado dos supracitados animais. Como se sabe, êstes meios líquidos tiveram grande voga quando da produção industrial da vacina curativa do cancro mole, para uso intravenoso, preconizada, em 1924, por NICOLLE & DURAND.

No interêsse de obter, para nosso próprio uso, um meio de cultura que pudesse oferecer condições nutritivas máximas para o desenvolvimento do *H. ducreyi*, decidimos pela realização, em meio de ágar-nutritivo comum, das indispensáveis investigações preliminares relativas à determinação das percentagens de sangue de coelho e de ágar-ágar, respectivamente, mais indicadas para uma multiplicação satisfatória do germe. A seguir, experimentamos, separadamente, a adição, a essas bases culturais, dos carboidratos seguintes, comumente utilizados para aumentar o teor nutritivo dos meios de cultura em geral: dextrose, lactose, sacarose e amido.

Aliás, NICOLLE (1923) havia já experimentado o amido em meio semi-sólido (gelose mole + traços de sangue desfibrinado de coelho) para a conservação do bacilo; mas não demorou a substituir êste meio por outro melhor, sem o amido. Entre nós, ASSIS (1926), trabalhando com meio líquido, adicionou-lhe a dose de 0,5 a 1,0 por 1.000 de dextrose, com o que verificou que o aspecto da cultura não se alterava, enquanto que a sua vitalidade desaparecia tanto mais rapidamente quanto maior a percentagem do carboidrato, responsabilizando por tal ocorrência o excesso de acidez desenvolvido no meio; e CUNHA (1943), trabalhando com meio sólido, em que o sangue de cavalo entrava na percentagem de 50%, ajuntou-lhe também 1% de dextrose (glicose). Das nossas experiências sôbre a adição de carboidratos à base sólida que viria a receber, por último, o sangue desfibrinado de coelho, verificamos que o amido e a dextrose parecem ter melhor influenciado o desenvolvimento do bacilo que a lactose e a sacarose. Por último, ocorreu-nos também experimentar um alimento natural de notória atividade energética — a batata, usada aliás há muito tempo nos meios destinados a germes de difícil crescimento. A junção, em dose substancial, ao meio de cultura,

de uma infusão de batata glicerolada, adicionada de 2% de glicerol, foi sem dúvida decisiva na escolha definitiva da sua fórmula, visto que, a partir de então, começamos a ter culturas verdadeiramente luxuriantes do *H. ducreyi*.

FÓRMULA E PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

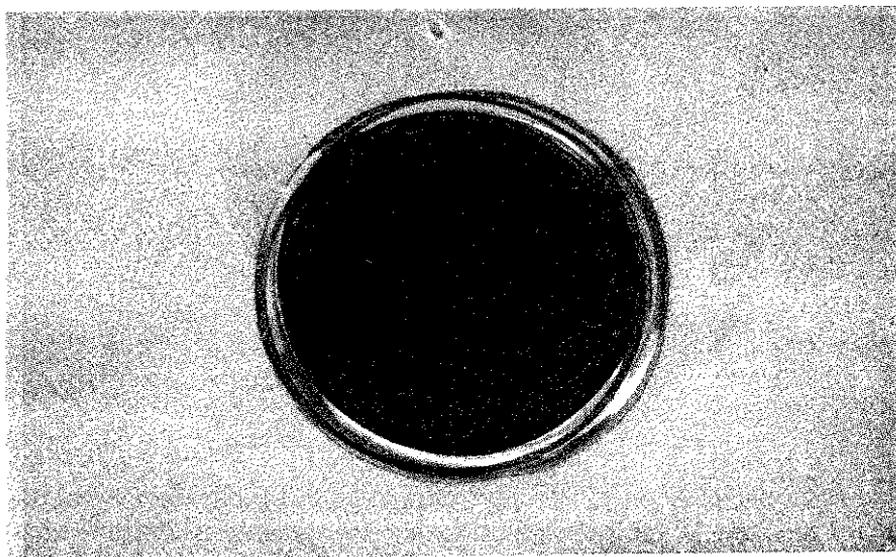
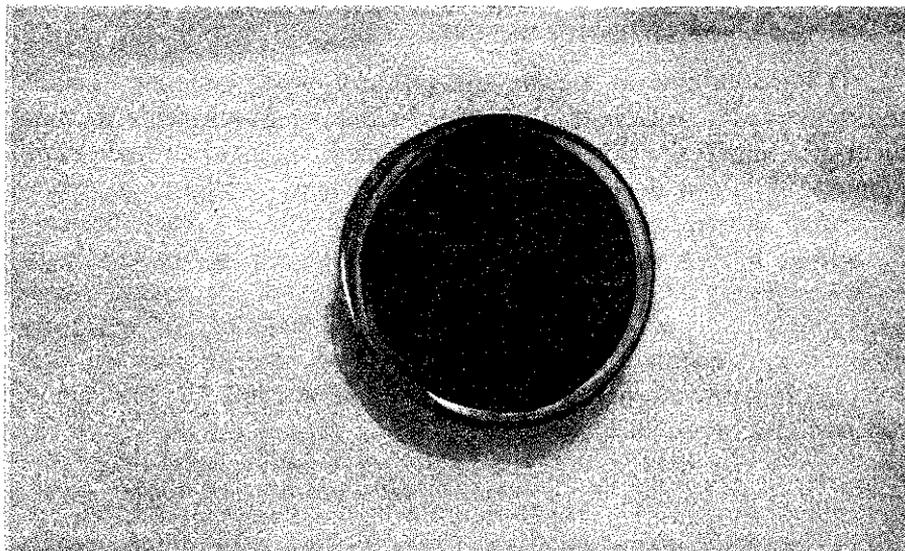
Infusão de batata glicerolada	600,0 ml
Água destilada	400,0 ml
Peptona	10,0 gr
Cloreto de sódio	5,0 gr
Extrato de carne	1,0 gr
Ágar (tipo japonês)	32,0 gr

Prepare a infusão de batata fervendo 1.000 gr de batatas descascadas e cortadas em fatias, em 2.000 ml de água destilada adicionada de 40 ml de glicerol neutro. Após cozedura, mexer e passar o todo em gase. Complete o volume primitivo com água destilada. A 600 ml dêste extrato de batata (os restantes 1.400 ml serão autoclavados e guardados para uso oportuno), adicione 400 ml de água destilada e os demais ingredientes constantes da fórmula acima. Autoclave 20 minutos a 121° para dissolução. Complete o volume com água destilada e ajuste ao pH 7,6. Filtre em algodão. Distribua 7 ml em tubos 18 x 180 mm ou 140 ml em balões de 200 ml. Autoclave 20 minutos a 120° C. Conserve êste ágar básico em geladeira até ser usado.

A fim de completar a preparação do meio, ponha o ágar básico (tubos ou balões) em banho fervente até completa fusão, deixando-o a seguir à temperatura de 48-50° C. Se estiver trabalhando com os tubos, ajunte, a cada um, 3 ml de sangue desfibrinado de coelho, e, após leves movimentos para mistura do meio, incline-os ou, se necessário, utilize-os para preparação de placas. Se, porém, estiver trabalhando com o balão, ajunte-lhe 60 ml do sangue, agite-o para mistura do meio e, por meio de pipetas, distribua-o em tubos ou placas. Após contróle de esterilidade durante 24-48 horas em estufa a 37° C, o meio poderá ser usado.

CONSERVAÇÃO. UTILIZAÇÃO DO MEIO PARA TRANSPLANTE E ISOLAMENTO DO GERME

O meio de cultura contido em tubos mantém-se em boas condições para transplantes ou repiques durante cêrca de 30 dias.



Figs. 1 e 2 — Aspectos do crescimento do *H. ducreyi* em placas contendo o meio de cultura descrito, após 72 hs de incubação.

bastando para isso que seja conservado à temperatura de 3° a 5° C, e que se lhe refaça, com solução salina, a quantidade de água de condensação eventualmente perdida.

O meio de cultura contido em placas é, habitualmente, o mais indicado para o isolamento do bacilo de Ducrey diretamente de uma ulceração venérea. Como, porém, êste meio se ressentia mais rapidamente da falta de umidade do que os meios contidos em tubos, é preciso usá-lo logo depois da sua preparação, e indiretamente hidratá-lo, após a sementeira, por meio de algumas gotas de solução salina esparsas na superfície interior da tampa da placa. Após esta precaução, a placa, com a tampa voltada para baixo, será posta numa estufa regulada a 32-34° C, em cujo interior, um ou dois recipientes contendo permanentemente água, garantirão, finalmente, um perfeito grau de umidade ambiente.

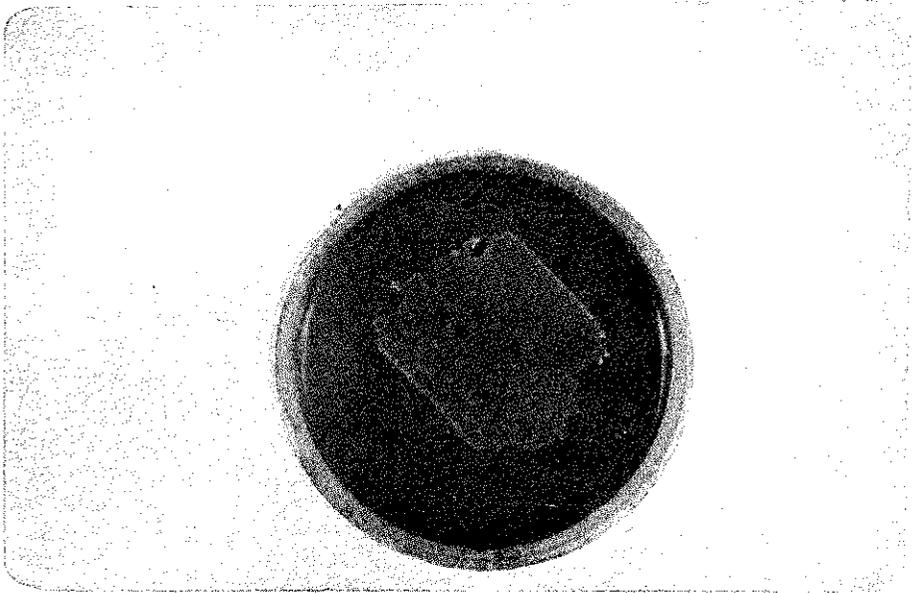
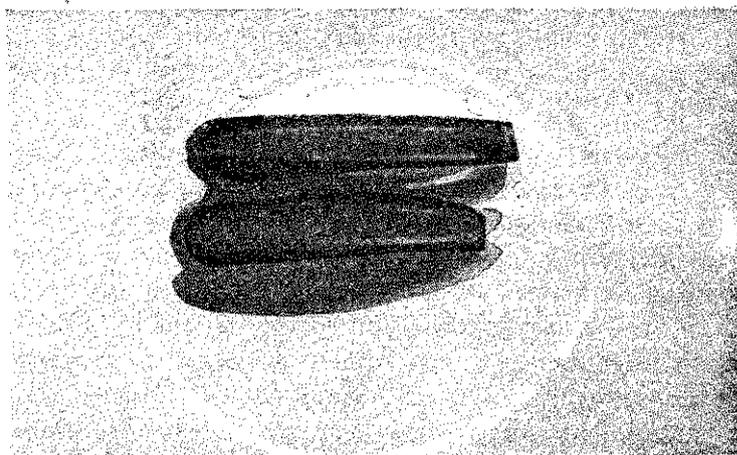
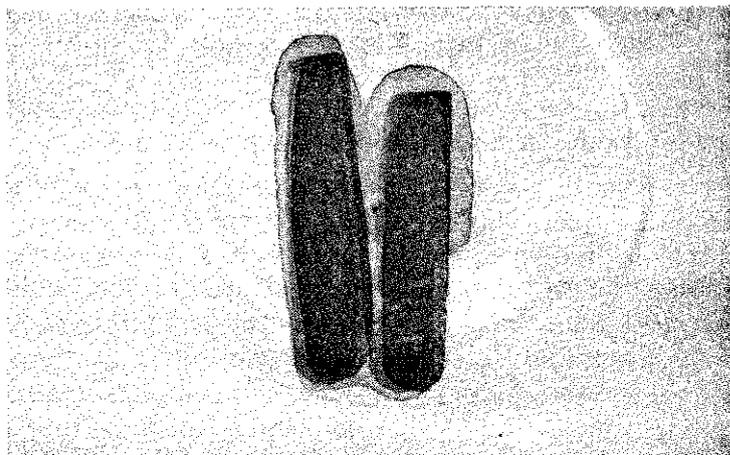


Fig. 3 — Outro aspecto da mesma cultura.

O transplante do *H. ducreyi* para êste meio, obedecidos os detalhes técnicos já indicados, resulta em crescimento realmente exuberante do germe. As fotos coloridas que ilustram êste trabalho darão, por certo, melhor que quaisquer palavras, uma idéia mais justa e expressiva sôbre o assunto. Elas representam transplantes do bacilo, tanto em tubos como em placas, depois de 48 horas de

permanência em estufa regulada a 32-34° C, sob as condições de umidade anteriormente descritas. Para melhor apreciação do desenvolvimento do germe em superfície inclinada, tratamos primeiramente de retirar, cuidadosamente e por inteiro, o meio de cultura contido no tubo, para em seguida fotografá-lo.

No que se refere à vitalidade do bacilo de Ducrey nos tubos contendo êste meio de cultura e mantidos em estufa, podemos escl-



Figs. 4-5 — Aspectos do crescimento do *H. ducreyi* em tubos.

recer que ela é perfeitamente viável durante cêrca de 12 dias, uma vez que, cada dois ou três dias, seja a superfície do meio convenientemente molhada pela água de condensação própria ou adicional.

Atualmente, porém, com o advento dos modernos métodos de liofilização, o velho problema da conservação das amostras bacterianas nos próprios meios de cultura já está completamente superado. Nossas amostras de *H. ducreyi*, liofilizadas, estão sujeitas apenas a um transplante anual, que jamais falhou, e poderão ser manipuladas durante vários anos, sem que venham a perder suas características iniciais.

ALGUNS DADOS TÉCNICOS REFERENTES AO ISOLAMENTO DO BACILO

Resta-nos, agora, examinar o procedimento a ser seguido para se obter o isolamento do bacilo dos focos de infecção.

Tratando-se de colheita de secreção de um cancro mole secundário, provocado pela auto-inoculação de material oriundo de um cancro mole primitivo genital, o problema do isolamento do germe não oferece maiores dificuldades, pois, com alguns cuidados de assepsia observados na técnica da auto-inoculação, completados por uma colheita precoce de material da lesão inicial, já teremos garantido, via de regra, para as sementeiras, um inóculo apresentando grau relativamente baixo de contaminação secundária. Esta foi, aliás, a técnica para o isolamento do germe preconizada por REENSTIERNA (1923) e, em seguida, adotada integralmente por NICOLLE (1924). Este último autor, tratando do assunto, refere que, entre inúmeras tentativas frustradas, conseguiu, por acaso, apenas uma vez, o isolamento do estreptobacilo de Ducrey diretamente das ulcerações genitais.

Na hipótese, porém, de defrontarmos com uma complicação linfática da ulceração venérea (bubão inguinal, bubônulo do corpo peniano), o isolamento do germe em cultura pura poderá ser tentado pela sementeira do pus obtido por simples punção dessas lesões supuradas e fechadas. É sem dúvida curioso o fato, por vezes observado, de o material purulento colhido de complicação linfática do cancro mole, nem sempre revelar a presença do germe, seja em exames culturais nos meios adequados, seja mesmo em simples exames diretos nas preparações coradas. A propósito desse assunto, não será demais lembrar aqui alguns dentre os investigadores que dele se preocuparam. RICORD (1838), baseando-se em centenas de auto-inoculações, positivas e negativas, de materiais oriundos de adenites supuradas conseqüentes a lesões venéreas ulcerosas, chegou à conclusão de que devia haver dois tipos diversos de bubões:

um, simples, de natureza apenas inflamatória ou simpática, e outro, originário do cancro mole ou sintomático, contendo um pus sempre inoculável, tal como se fôra o da própria lesão venérea. Entretanto DUCREY (1889), ao aplicar o mesmo método experimental em 60 pacientes, portadores também de adenites supuradas, não logrou nenhum sucesso. BENZANÇON e colaboradores (1901), já então apoiados em seu meio de cultura, obtiveram de pus de bubão inguinal de 2 doentes, 2 culturas positivas, muito embora não tivessem encontrado nenhum bacilo nos esfregaços de pus de um dos doentes. SIMON (1902) relatou também 2 culturas positivas de 2 casos examinados, e DAVIS (1903) 2 culturas positivas de 6 casos.

Das nossas observações sôbre cancro moie, constam 12 casos de bubão supurado e íntegro. O pus de cada um, obtido por punção, foi examinado do ponto de vista cultural, no nosso meio de cultivo, e também do ponto de vista bacterioscópico, em lâminas coradas pelo Gram. Cinco das nossas sementeiras resultaram positivas para o *H. ducreyi* (41,6%), e 7 foram negativas.

Com relação aos exames bacterioscópicos a que foram submetidos os esfregaços de pus, após coloração pelo Gram, devemos salientar que, dos 5 casos com cultura positiva, apenas 1 permitiu o achado relativamente fácil de alguns bacilos esparsos e com os caracteres morfológicos do *H. ducreyi*. Nos 4 esfregaços restantes, entretanto, os bacilos, além de muito raros, apresentavam também uma estranha morfologia, com seus corpos cêrca de 3 a 4 vêzes mais longos e mais largos que as formas habitualmente encontradas nas ulcerações ou nas culturas. Como elemento característico do bacilo, essas formas involutivas revelavam, tão sômente, uma discreta hipercoloração nas suas extremidades. Por outro lado, os exames bacterioscópicos do pus dos 7 casos, que, em cultura, nada haviam revelado, foram igualmente negativos.

O estágio de evolução (inicial ou final) dos bubões inguinais, na totalidade dos casos, jamais se mostrou relacionado com a positividade ou negatividade do germe no pus. É pois de se supor que, tanto a presença de bacilos vivos nos bubões, por vêzes raros e sob formas involutivas, como a sua ausência, por possível lise, devam estar relacionadas com a maior ou menor capacidade orgânica do paciente na produção de anticorpos.

Cabe-nos, finalmente, referir algo daquilo que durante muitos anos fomos observando e aos poucos modificando, sôbre o procedi-

mento técnico a se adotar sempre que se tenha em vista o isolamento do bacilo, partindo-se de inóculo originário de um cancro mole primário.

Os pesquisadores que se têm dedicado ao isolamento de *H. ducreyi* dessa fonte original, certamente não desconhecem as inúmeras dificuldades e frustrações a que ficam expostos para a consecução desse desiderato. Uma das principais causas dessas dificuldades, independe completamente da nossa vontade, e vem a ser o fato de o doente apresentar-se sempre tardiamente para as primeiras provas laboratoriais, do que naturalmente resulta a proliferação de uma ilimitada flora bacteriana secundária, em pleno foco ulceroso. Ao lado dessa causa, outras ainda poderão ser mencionadas, como a difícil manutenção, por 24 ou 48 horas, de pensos assépticos protetores, em lesões localizadas na maior parte das vezes nas mucosas, e também a excessiva sensibilidade da região onde, habitualmente, se assesta o processo infeccioso.

Os numerosos doentes portadores de cancro mole que, outrora, eram encaminhados ao Laboratório Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, para confirmação diagnóstica pelo exame bacterioscópico do pus ou pela reação intradérmica de Ito, despertaram, naturalmente, nosso interesse no tocante ao isolamento do germe, diretamente do foco ulceroso venéreo.

Valendo-nos, por um lado, do meio sólido de cultura então indicado por vários pesquisadores (ágar nutritivo a 3% adicionado de 30% de sangue desfibrinado de coelho) e, por outro lado, de materiais colhidos de lesões ulcerosas que, 48 horas antes, a fim de prevenir contaminações secundárias, haviam sido convenientemente limpas e desinfetadas com álcool iodado, e a seguir impermeabilizadas com colódio, e recobertas com esparadrapo, pudemos então obter duas primeiras amostras de bacilo de Ducrey, isoladas diretamente de cancros moles genitais. Devemos esclarecer, neste passo, que LIPINSKI (1925), sem que o soubéssemos, havia, vários anos antes, publicado um excelente trabalho em que mencionou o uso do colódio como um recurso adjuvante na técnica de isolamento do germe.

As duas amostras isoladas vieram juntar-se outras, inclusive algumas originárias de pus de adenite inguinal. Dentre as que contavam menor número de passagens, duas foram utilizadas como indicadoras de crescimento do germe no decurso das provas que, a

pouco e pouco, fomos realizando até chegar à fórmula do meio de cultura apresentada no início dêste trabalho.

A acentuada queda verificada no número de casos de cancro mole no decorrer dêste último decênio, queda essa verificada pelo uso terapêutico intensivo das sulfonamidas e dos antibióticos, veio, evidentemente, refletir-se, mais acentuadamente, sôbre as dificuldades antes já existentes em obter-se culturas novas, recém-isoladas, do *H. ducreyi*, que são de tanto interêsse para o perfeito conhecimento de alguns aspectos ainda pouco esclarecidos da biologia do germe, como por exemplo, os relacionados com as suas atividades bioquímicas.

Não foi outra a razão de, retornando ao assunto de isolamento do germe da lesão venérea, aproveitarmos os raros doentes de agora, para algumas experiências com uma substância capaz de agir eficazmente sôbre os germes habituais de contaminações que constituem, como se sabe, um sério entrave ao isolamento do bacilo de Ducrey, de um cancro mole primário. Essa substância vem a ser o ácido rosólico, conhecido corante e indicador cuja ação inibidora (bacteriostática) sôbre as bactérias Gram-positivas, tanto em meios líquidos como em sólidos, isentos de componentes de sangue foi já referida em publicações feitas respectivamente por BRONFENBRENNER e col. (1920) e por CALAZANS & PESTANA (1932), quando do estudo sôbre meios seletivos para o isolamento de enterobacteriáceas patogênicas.

Prepara-se a solução do corante inibidor, dissolvendo-se 1 g de ácido rosólico (Merck) em 50 ml de álcool absoluto, completando-se o volume de 100 ml com água destilada. Desta solução mãe retira-se 0,1 ml que será diluído em 9,9 ml de solução salina estéril, obtendo-se assim uma solução cuja concentração em ácido rosólico corresponde a 0,01 g %. Se a solução fôr ácida (côr amarela) ajunta-se-lhe carbonato de sódio diluído a 1%, gôta a gôta, até que eia se torne levemente alcalina (côr levemente rósea). Em cêrca de 1 ml desta solução, depositam-se então 3 ou 4 alças do material (livre de sangue) colhido daquela mesma lesão ulcerosa que, 48 horas antes, havia já sido convenientemente isolada pelo colódio. A suspensão de pus é agitada e posta em estufa a 32-34° C, retirando-se-lhe, 4, 8 e 24 horas depois, parcelas do seu sedimento para sementeira, em placas que, por sua vez, serão incubadas de acôrdo com as especificações já referidas.

É claro que o tratamento prévio do inóculo não poderá impedir totalmente o aparecimento, nas placas, de algumas colônias de

contaminação; porém estas, por serem raras e esparsas, não comprometerão o crescimento posterior das colônias características do *H. ducreyi*.

A frequência do cancro mole, como já referimos, caiu, ultimamente, para índices extremamente baixos, sendo difícil o encontro de casos até mesmo nos ambulatórios hospitalares. Isso não impediu, entretanto, que dos poucos casos à nossa disposição pudéssemos isolar algumas novas amostras do bacilo, utilizando-nos do meio de cultura e da técnica de colheita preconizados neste trabalho.

É óbvio que o meio de cultura de que tratamos revelou-se igualmente eficiente para a proliferação de outras espécies filiadas ao gênero *Haemophilus*, e também para *Bordetella pertussis*, que pôde, inclusive, ser facilmente isolada pela exposição das placas ao alcance das partículas mucosas expelidas pelo doente no momento da tosse.

Deixamos aqui consignado nosso cordial agradecimento a D. Filomena B. M. Jordão e a D. Maria Nydia de Castro, pelo auxílio técnico e bibliográfico que, respectivamente, prestaram no decurso deste trabalho.

RESUMO

São recordados, inicialmente, os métodos experimentais de auto e hetero-inoculações humanas através das quais pôde Ducrey cultivar, no próprio foco ulceroso, da 6.^a à 15.^a geração, e em condições de absoluta pureza, o bacilo que êle julgava ser o único germe responsável pelo cancro mole, e ao qual ficou seu nome definitivamente ligado. É ressaltada, depois, a importância do aparecimento do meio sólido fundamental proposto por Benzançon e colaboradores para a cultura do bacilo (ágar-sangue de coelho), e também mencionadas, de passagem, as principais modificações nêle introduzidas por alguns pesquisadores, visando a torná-lo mais favorável ao desenvolvimento do germe.

Nesse mesmo sentido resolveu o A. experimentar, também, uma série de alimentos de alto teor nutritivo, optando, afinal, por uma fórmula de meio de cultura em cuja composição figurasse, de modo substancial, uma infusão de batata adicionada de 2% de glicerol. Essa fórmula, detalhadamente descrita no texto, deu-lhe culturas realmente luxuriantes do *H. ducreyi* (transplantes em placas e tubos), como se pode observar nas fotos que ilustram o trabalho. Depois de fazer referências sobre o modo de utilização e

de conservação do meio, o *A.* passa finalmente à questão do isolamento do bacilo dos focos de infecção, que expõe da maneira como a seguir vai sintetizado:

Se a secreção purulenta destinada à obtenção do bacilo provier de um cancro mole secundário provocado por auto-inoculação, o isolamento do germe não oferecerá maiores dificuldades, contanto que o material seja colhido precocemente da lesão e semeado em placas sob boas condições de umidade. A umidade das placas será facilmente obtida pela deposição, na superfície interna das respectivas tampas, de algumas gotas esparsas de solução salina. As placas serão colocadas, invertidas, em estufa regulada a 32° - 34° C cuja umidade ambiente será mantida por 2 recipientes contendo água. Exame das placas 48 a 72 h depois.

Por outro lado, tratando-se de pus originário de complicação linfática (bubão inguinal), a semeadura dêsse material diretamente em tubos, poderá ou não, dar desenvolvimento ao bacilo. A êsse propósito, refere o *A.* a semeadura de pus de 12 bubões fechados, conseqüentes a cancro mole, obtendo 5 culturas positivas para o *H. ducreyi* (41,6%) contra 7 negativas. Examinando, porém, os esfregaços de pus dos 5 casos positivos nas culturas, só dificilmente encontrou bacilos, os quais, além de muito raros, apresentavam uma morfologia involutiva (comprimento e largura 3 a 4 vezes maiores que o normal), mantendo, porém, como única característica, uma discreta hipercoloração das extremidades.

A última hipótese a ser considerada — sem dúvida a mais complexa, pela concorrência dos germes de contaminação secundária — é o isolamento do bacilo do próprio foco ulceroso primário. Frente a essa oportunidade, o *A.* aconselha o uso da seguinte técnica que lhe tem facilitado a obtenção de algumas amostras do germe: o cancro mole deverá sofrer uma limpeza e desinfecção prévias com álcool iodado, seguidas de impermeabilização com colódio e esparadrapo; após 48 horas, 3 a 4 alças do pus (livre de sangue) da lesão, serão agitadas em tubo contendo 1 ml de uma solução de ácido rosólico com concentração igual a 0,01 g %. (Ácido rosólico Merck 1 g, álcool absoluto 50 ml, água destilada até completar 100 ml. Diluir 0,1 ml desta solução em 9,9 ml de solução salina e usá-la para o fim indicado.) A suspensão do pus na solução rosólica é agitada e posta na estufa a 32-34° C, retirando-se 4, 8 e 24 horas depois, parcelas do seu sedimento para semeaduras em placas que, por sua vez, serão incubadas, de acôrdo com as especificações atrás mencionadas.

Com a técnica descrita, o A. procurou adaptar a já conhecida ação inibidora (bacteriostática) do corante e indicador — ácido rosólico — para bactérias Gram-positivas em geral, quando em meios de cultura isentos de componentes do sangue, ao isolamento do *H. ducreyi* presente em secreções sempre contaminadas por diversos tipos daquelas bactérias.

É óbvio, finalmente, que o meio de cultura que o A. acaba de apresentar, revelou-se igualmente eficiente para outras espécies do gênero *Haemophilus*, sendo que *Bordetella pertussis* pôde ser também facilmente isolada pela exposição das placas ao alcance das partículas mucosas expelidas no momento da tosse.

SUMMARY

The author examines the technique used by Ducrey in obtaining pure cultures of *Haemophilus ducreyi* by the inoculation of infectious material in humans, and notes that the culture could be maintained pure from six to fifteen passages. He emphasizes the use of blood agar as proposed by Benzangon and associates, and describes some of the most important modification of this medium.

The author then presents a new medium for the isolation of *H. ducreyi*, essentially a 2% glicerol in potato infusion, arrived at after considerable testing of a variety of substances. He gives detailed instructions for the preparation, use, and storage of the new medium.

For the collection of clinical material, subsequent incubation, and isolation, he presents the following technique:

After thoroughly cleaning the lesion, disinfection is achieved by iodine diluted in alcohol. The lesion is then covered with a film of collodion or tape for 48 hours, after which, 3 to 4 loopfuls of pus (free of blood) are taken from the lesion and inoculated into tubes containing 1 ml. of a solution of 0.01 % rosolic acid. (Rosolic acid Merck 1 gm.; alcohol 50 ml.; distilled water to make 100 ml.; 0.1 ml. is diluted in 9.9 ml. of saline.) In this preliminary processing the rosolic acid acts bacteriostatically on Gram-positive bacteria.

After shaking, the tubes are incubated at 32° - 34° C, and at intervals of 4 - 8 and 24 hours, portions of the settled sediment are seeded in the new medium, the plates of which are kept humid

by the use of a few drops of saline on the inside cover of the Petri dish. The plates are then inverted and incubated for 48 - 72 hours at 32 - 34° C.

The author obtained a 41.6 % recovery of *H. ducreyi* on a series of 12 closed infected lymph-nodes. In all cases, he noted that on microscopic examination, the bacilli showed a distinct morphology, their size being three to four times larger and broader than the normal bacilli and that they characteristically stained heavier at their ends.

The new medium described provides a very luxuriant growth of *H. ducreyi*, as seen in figures 4 and 5 and has proven an excellent medium for other species of the genus *Haemophilus* even *Bordetella pertussis* was easily isolated in the medium by the cough plate method.

BIBLIOGRAFIA

- ASSIS, A. — Sur la biologie du bacille de Ducrey. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 95: 1003-1009, 1926.
- BENZANÇON, F., V. GRIFFON & L. LE SOURD — Recherches sur la culture du bacille de Ducrey. *Ann. Derm Syph.*, 2: 1-20, 1901.
- BRONFENBRENNER, J., M. J. SCHLESINGER & D. SOLETZKY — On methods of isolation and identification of the members of the colon-typhoid group of bacteria. *J. Bacteriology*, 5: 79-87, 1920.
- CALAZANS, S. C. & B. R. PESTANA — Emprêgo do ácido rosólico no isolamento e identificação dos bacilos do grupo coli-tífico-disentérico em meios sólidos. *Mem. Inst. Butantan*, 7: 285-302, 1932.
- CUNHA, R. — Estudos sobre o *Hemophilus Ducreyi*. *Bol. Inst. Vital Brasil*, 25: 13-28, 1943; *O Hospital*, Rio de Janeiro, 23: 393-407, 1943.
- DAVIS, L. — Observations on the distribution and culture of the chancroid bacillus. *J. Med. Research*, 9: 401-415, 1903.
- DUCREY, A. — Recherche sperimentali sulla natura intima del contagio dell'ulcera venerea e sulla patogenesi del bubbone venereo. *Giorn. ital. Malat. Ven.*, 24: 377-425, 1889.
- FERRARI, P. — Apud A. Ducrey, Op. cit. — Il Bacillo dell'ulcera molle. Comunicazione all'Accademia Gioenia, 26 luglio 1885.
- ISTOMANOFF, S. S. & G. AKSPIANZ — Apud L. Davis, Op. cit. — Zur Bakteriologie des weichen Schankers. *Jahresb. Path-Mikro-org.*, 14, 1898.
- LENGLET, M. — Note sur le bacille de Ducrey et sur les milieux "humanisés". *Ann. Derm. Syph.*, 2: 209-230, 1901.
- LIPINSKI, W. — Recherches biologiques et expérimentales sur le Streptobacille de Ducrey. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 93: 657-661, 1925.
- MORISON — Apud A. Ducrey, Op. cit. — Ueber das Vorkommen von Bakterien bei Syphilis. *Wiener med. Wochenschrift*, n. 3, 1883; referirt. i.d. *Vierteljahresschrift f. Dermat. und. S.*, 1883, p. 402.

NICOLLE, C. — Isolement, culture et conservation dans les laboratoires du Streptobacille du chancre mou. *Comp. rend. Soc. Biol.*, 88: 871-873, 1923.

NICOLLE C. & P. DURAND — Nouvelles recherches sur le chancre mou. Son traitement par les inoculations intraveineuses du vaccin antistreptobacillaire. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 13: 243-272, 1924.

PETERSEN, W. — Ueber Bacillen befunde beim Ulcus molles. *Zentralb. Bakter.*, 13: 743-748, 1893.

REENSTIERNA, J. — Recherches sur le bacille de Ducrey. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 12: 273-312, 1923.

RICORD, Ph. — Traité pratique des maladies vénériennes ou recherches critiques et expérimentales sur l'inoculation appliquée à l'étude de ces maladies. Librairie des Sciences Médicales, Paris, 1838.

SIMON, M. L. G. — Présence du bacille de Ducrey dans le pus de bubons chancrelleux. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 54: 547-548, 1902

TOMASCZEWSKI, E. — Bakteriologische Untersuchungen über den Erreger des Ulcus molle. *Zeitschr. Hyg.*, 42: 327-340, 1903.

UNNA, P. G. — Der Streptobacillus des weichen Schankers. *Monatsh. prakt. Derm.*, 14: 485-490, 1892.

UNNA, P. G. — Die verschiedenen Phasen des Streptobacillus ulceris mollis. *Monat. prakt. Derm.*, 21: 61-81, 1895.

MONONCHUS (COBBONCHUS) INCULTUS

J. C. CARVALHO (*)

Em sua revisão dos mononquídeos, ANDRÁSSY (1958) criou o novo gênero *Cobbonchus*, caracterizado por um dente dorsal no 1.º terço da cavidade bucal e dois dentes subventrais um pouco menores do que o dorsal. Nêle incluiu 3 espécies descritas por COBB (1935): *C. palustris*, *C. radiatus* e *C. teres*. Em solo de uma plantação de bananeira em Caraguatatuba, encontramos uma nova espécie, que incluímos nesse gênero, junto com as espécies de Cobb, apesar de exibir alguns caracteres diferentes dos dados por Andrássy. Descrevendo o gênero, deu-lhe o autor um ovário duplo e cauda com glândulas munidas de válvulas; a espécie que estamos descrevendo tem o ovário simples e a cauda poro não munido de aparelho valvular.

Mas apesar dêsses caracteres diferentes, parece-nos mais apropriado colocar essa espécie no gênero *Cobbonchus*.

DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

DIMENSÕES. Fêmea (10): Compr. 1,301 - 1,755 mm; compr. do esôfago 0,338 - 0,413 mm; larg. 0,032 - 0,064 mm; cauda 0,064 - 0,162 mm; a= 27,4 - 40,6; b= 3,8 - 4,2; c= 10,8 - 20,3.

CORPO. A forma do corpo assemelha-se a de todos os mononquídeos, que é mais ou menos um cilindróide, com afilamento na parte anterior e posterior. Nesta, o afilamento começa logo depois da vulva e vai até o término da cauda.

CABEÇA. Nota-se pequena expansão dos seis lábios fundidos e achatados; papilas diminutas. Dente dorsal de tamanho médio, reforçado e situado no 1.º terço da faringe; dois dentes subventrais existentes, parecem ser do mesmo tamanho do dente dorsal.

(*) Engenheiro-agrônomo do Instituto Biológico.

Recebido para publicação em 27 de dezembro de 1960.

ESÔFAGO. Tubo musculoso, mais ou menos cilíndrico desde o início até o cárdia.

INTESTINO. As células intestinais são ricas de grânulos de gordura. Reto e ânus proeminentes.

ÓRGÃOS REPRODUTORES: A vulva ocupa posição oblíqua em relação ao corpo. Ovário curto, recurvado e prodélfico.

CAUDA: Cauda de tamanho médio, com três glândulas ligadas ao poro excretor, sem válvula.

MEDIDAS DE 10 FÊMEAS

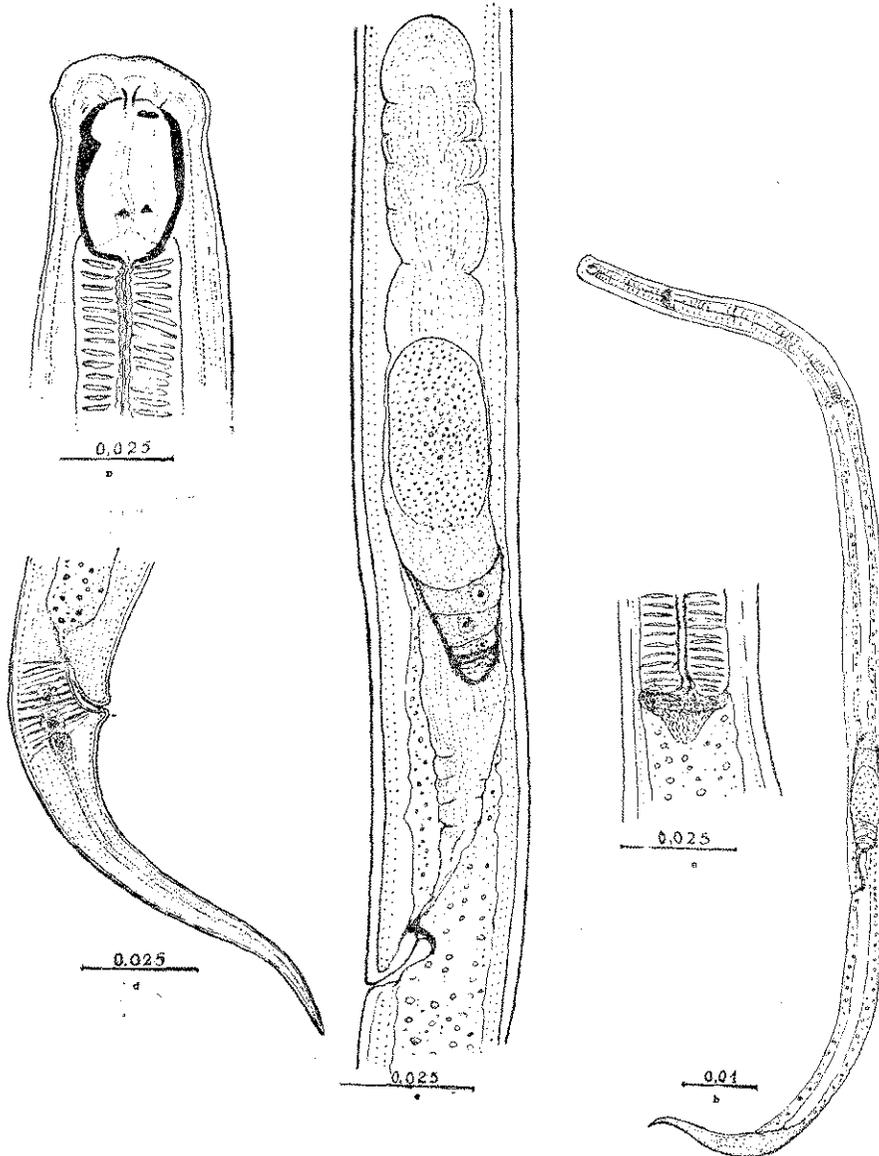
	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8
Comprimento ..	1,301	1,371	1,606	1,755	1,587	1,488	1,557	1,620	1,674	1,455
Largura	0,032	0,041	0,050	0,048	0,051	0,048	0,059	0,056	0,064	0,056
Esôfago	0,338	0,338	0,405	0,413	0,383	0,376	0,356	0,391	0,390	0,356
Dist. da vulva ..	0,897	0,931	1,053	1,140	1,042	0,969	1,015	1,093	1,080	0,969
%	69,8%	67,4%	65,0%	65,6%	66,3%	64,5%	63,4%	63,3%	65,2%	63,0%
Faringe	0,013 x 0,024	0,014 x 0,028	0,018 x 0,030	0,018 x 0,030	0,018 x 0,030	0,018 x 0,030	0,018 x 0,030	0,024 x 0,030	0,024 x 0,030	0,024 x 0,030
Cauda	0,122	0,122	0,140	0,162	0,162	0,148	0,153	0,162	0,148	0,153

A porcentagem se refere à posição da vulva em relação à cabeça.

MEDIDAS DE 4 LARVAS

	1	2	3	4
Comprimento	1,274	0,945	0,872	1,287
Largura	0,032	0,027	0,037	0,046
Esôfago	0,327	0,277	0,290	0,313
Faringe	0,014 x 0,025	0,012 x 0,025	0,014 x 0,022	0,014 x 0,025
Cauda	0,090	0,100	0,122	0,133

DIAGNOSE: *M. cobbonchus incultus* diferencia-se de *M. radia-tus*, *M. palustris* e *M. teres* por ser maior do que essas espécies: 1,301 - 1755 mm, enquanto que as outras têm respectivamente, 0,8, 1,4 e 0,6 mm; pela gônada simples, prodélfica; e pela ausência de aparelho valvular na cauda, existente nas outras espécies.



a) Parte dianteira; b) corpo da fêmea; c) aparelho sexual feminino; d) cauda do macho; e) função do esôfago e intestino.

SUMMARY

The paper describes *M. Cobbonchus incultus* a new species found about banana roots of a plantation in Caraguatatuba, State of São Paulo.

This new species differs from its nearest species *M. radiatus*, *M. palustris* and *M. teres* by its large size; gonad single, prodelphic and by the absence of a caudal valvular apparatus.

BIBLIOGRAFIA

ANDRÁSSY, I. — Über das System der Mononchiden (*Mononchidae* Chitwood, 1937: *Nematoda*). Annales Historico-Naturalis Musei Nationalis Ungarici, Tomo I. (Série nova) 1958.

COBB, N. A. — Em contributions to a Science of Nematology, pág. 129 - 187, Williams & Wilkins Co. 1914 - 1935.

MONONCHUS (IOTONCHUS) PIRACICABOIDES
N. SP.

J. C. CARVALHO (*)

Este novo *Mononchus*, encontrado ao redor de raízes de banana, na fazenda São Sebastião, em Caraguatatuba, neste Estado, foi, a princípio, tomado pela espécie *M. trichurus*, e, depois, por *M. piracicabae*, devido à sua semelhança com essas duas espécies. De ambas, porém, se distingue pelo seu maior porte e por ter duas projeções subventrais, como denticulos, localizadas quase no fundo da cavidade bucal.

Pelas medidas de 10 fêmeas e 6 larvas, verifica-se que esta espécie é maior em relação a *M. trichurus* e *M. piracicabae*.

DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

DIMENSÕES. Compr. da fêmea: 1,710 - 1,824 mm; a= 30,6 - 32,0; b= 4,7 - 5,0; c= 3,8 - 4,0.

CORPO: Corpo semelhante aos dos outros *Mononchus*, ou seja, na parte dianteira afilamento suave, e, na parte posterior, mais acentuado a partir da vulva.

CABEÇA: Seis lábios fundidos, com ligeiras expansões. Da cabeça para o pescoço não há sinal de separação. Faringe ampla com 31 μ de comprimento por 24 μ de largura e revestida de músculos relativamente fortes. Do lado dorsal, há um dente de pequeno porte, virado ligeiramente para cima, e, do lado ventral, são vistas, com certa dificuldade, duas projeções parecidas com denticulos, situadas na base da faringe.

ESÔFAGO: Um tubo mais ou menos cilíndrico e musculoso.

INTESTINO: Células intestinais ricas de material granulado.

(*) Engenheiro agrônomo do Instituto Biológico.

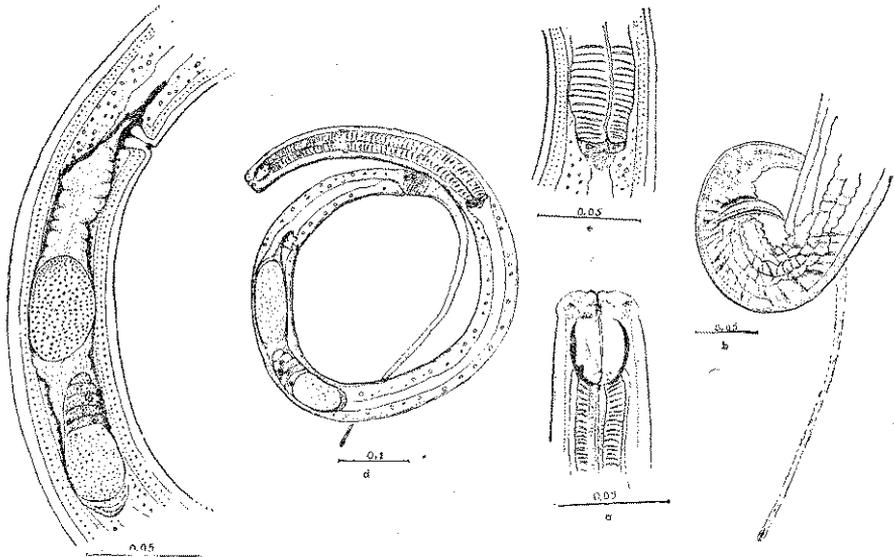
Recebido para publicação em 27 de dezembro de 1960.

APARELHO REPRODUTOR: A vulva localiza-se a 1,054 - 1,125 μ da cabeça. A vagina ocupa 1/3 da largura do corpo. O ovário é simples, curto e recurvado. Os ovos medem 116 por 52 μ .

MACHO: (1): Compr. 1,737 mm; a= 28,4; b= 4,4; c= 3,6. Espículos com 78 μ de comprimento. Testículo simples e estendido. Órgãos suplementares em número de 8 ou 10. Gubernáculo presente.

MEDIDAS DE 10 FÊMEAS

Comprimento ..	1,738	1,724	1,752	1,746	1,710	1,738	1,824	1,781	1,710	1,724
Largura	0,057	0,059	0,065	0,058	0,054	0,057	0,057	0,057	0,057	0,062
Esófago	0,390	0,342	0,399	0,384	0,370	0,427	0,384	0,384	0,376	0,356
Faringe	31x22									
Cauda	0,423	0,430	0,441	0,430	0,470	0,427	0,478	0,464	0,470	0,413
Pos. da Vulva .	1,083	1,083	1,083	1,054	1,068	1,040	1,125	1,040	1,040	1,024



a) Cabeça; b) corpo da fêmea; c) aparelho sexual feminino; d) cauda; e) função do esôfago e intestino.

DIAGNOSE

M. piracicaboides diferencia-se das espécies que lhe são mais próximas — *M. trichurus* e *M. piracicabae* — pelo seu maior tamanho: 1,710 - 1,804 mm; 1,200 e 1,332 - 1,527 mm respectivamente; e por possuir duas projeções, como dentículos na base da

faringe; *M. trichurus* tem mais denticulos, segundo COBB e *M. piracicabae* não tem denticulos, conforme LORDELLO. Desta última, também se distingue por possuir poro excretor munido de válvula.

SUMMARY

The paper deals with the description of a new species — *Mononchus piracicaboides* — found about roots of banana plants growing in the moist ground near Caraguatatuba, State of São Paulo.

M. piracicaboides differs from its nearest related species, *M. piracicabae* e *M. trichurus* by its large size and by two denticles at the base of pharynx; *M. trichurus* has more denticles, after COBB, and *M. piracicabae* has no denticle, after LORDELLO. From the last, it differs also by the presence of a caudal valvular apparatus.

BIBLIOGRAFIA

COBB, N. A. — Em contributions to a Science of Nematology, págs. 129 - 187, Williams & Wilkins Co., 1914 - 1935.

LORDELLO, L. E. G. — Contribuição ao conhecimento dos nematódeos do solo de algumas regiões do Estado de São Paulo. Tese 1953.

