

VOLUME 31

NÚMERO ÚNICO

1971

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
S. PAULO - BRASIL

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY

Diretor do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSE PAULO GONZAGA DE LACERDA

JOSE ROBERTO CARNEIRO NOVAES

LUIS FLORENCIO DE SALLES-GOMES

MÁRIO SCARPELLI

WALDOMIRO PREGNOLATTO

SECRETARIA-REDATORA

DEBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
S. PAULO - BRASIL

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO
BIBLIOTECA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

CAIXA POSTAL, 7027
SÃO PAULO, S.P. — BRASIL

ENDEREÇO TELEGRAFICO: IALUTZ

REVISTA ANUAL

TIRAGEM: 1.000 EXEMPLARES

REV. INST. ADOLFO LUTZ

ERRATA

Pág. 8, 9 e 11: sempre que aparecer a palavra coriolantóide, **leia-se** coriolantóide.

Pág. 9, 1.^a col., 6.^a linha: onde se lê... yates, **leia-se** Yates.

Pág. 11, 2.^a col., 26.^a linha: onde se lê... *herpesvirus*, **leia-se** *Herpesvirus*.

Pág. 12, 2.^a col., referência 7., **leia-se**: DOWNIE, A. W. & McCARTHY, K. — The antibody response in man following infection with viruses of the poxgroup. III. Antibody response in smallpox. *J. Hyg., Camb.*, 56:479-87, 1958.

Pág. 22, 2.^a col., 8.^a linha: onde se lê... garantia, **leia-se** garganta.

Pág. 24: **leia-se** como título da figura: Comparação dos casos positivos e negativos em percentagens

Pág. 30, 1.^a col., 21.^a linha: onde se lê... rigidez, **leia-se** hígidez.

Pág. 40, 2.^a col., 16.^a linha: onde se lê... (quadro II), **leia-se** (quadro da pág. seguinte).

Pág. 42, 1.^a col., 1.^a linha: onde se lê L-triptofato, **leia-se** L-triptofano.

Pág. 43, 3.^a linha do «Summary»: onde se lê... casy, **leia-se** easy.

Pág. 43, 2.^a col., 7.^a linha: onde se lê... Transferiu, **leia-se** Transferir.

Pág. 66 e 67: nas legendas das fig. 2 e 3, onde se lê Cromatografia, **leia-se** Cromatograma.

Pág. 83, 5.^a linha do «Summary»: onde se lê... Nessler reaction or reaction..., **leia-se** Nessler reaction or the reaction...

Pág. 94, na citação n.º 163: onde se lê... NAZARI, **leia-se** MAZZARI.

Pág. 103, 1.^a col., 2.º §, 3.^a linha; e 2.^a col., 15.^a linha: onde se lê... bricromato, **leia-se** bicromato.

Pág. 106, 1.^a col., 2.º §, 3.^a linha: onde se lê... gracial, **leia-se** glacial.

Pág. 114, 2.^a col., 3.º §, 2.^a linha: onde se lê... que foram encontrados, constatamos... **leia-se**... que foram encontrados (quadro IV), constatamos...

REVISTA

DO

INSTITUTO

ADOLFO LUTZ

| | | | |
|------------------------|-----------|-----------|------|
| Rev. Inst. Adolfo Lutz | São Paulo | Volume 31 | 1971 |
|------------------------|-----------|-----------|------|

CONTEÚDO

Artigos originais

- Caldo-selenito-novobiocina. Um meio de maior seletividade para o isolamento de *Salmonella* de fezes
Novobiocin-selenite broth. A medium of improved selectivity for the isolation of Salmonella from faeces
 GIL VITAL ÁLVARES PESSÓA & ETHEL SANDOVAL PEIXOTO 1
- Variola. Diagnóstico etiológico de 1967 a 1970, no Instituto Adolfo Lutz
Smallpox. Etiological diagnosis 1967-1970 at Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.
 LUIS FLORENCIO DE SALLES-GOMES; BEATRIZ CARDOSO CONCEIÇÃO; YARA DUARTE GALLUZI; YVETTE MONTEFORTE DA FONSECA; DALTON RAMALHO WEIGL & MARIA ELISA FERNANDES DE FIGUEIREDO 5
- Resíduos de pesticidas clorados em leite consumido em São Paulo
Chlorinated pesticide residues in fluid milk consumed in São Paulo, Brazil
 MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA & HELOISA HELENA CORBE BARRETO 13
- Isolamento e identificação de poliovírus em São Paulo, de 1967 a 1970
Isolation and identification of poliovirus in São Paulo, Brazil, from 1967 to 1970
 JOSÉ PAULO GONZAGA DE LACERDA; ELZA FRANCO DE LIMA VIEIRA; BIENVENIDO SAEZ MARTIN & LÚCIA SOUTO GIUSTI 21
- Incidência de reagentes à prova de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose entre doadores de sangue em São Paulo
The incidence of reagents to indirect immunofluorescence test for diagnosis of toxoplasmosis among blood donors in São Paulo, Brazil
 SABURO HYAKUTAKE & MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA ... 27
- Infestação de produtos alimentícios nas fontes de produção e durante o armazenamento. Um método para a pesquisa microscópica de sujidades e impurezas
Contamination of foodstuffs at the source of production and during stockage. A method for microscopic research of filth and impurities
 MARIA VIRGINIA DECANIO 31

| | |
|--|----|
| Ação da associação L-triptofano e citrato de ferro amoniacal sobre a formação de bafo de <i>Proteus</i> <i>L-tryptofhan and ferric ammonium citrate as an inhibitory association on Proteus swarming</i> | |
| GIL VITAL ÁLVARES PESSÔA; DILMA SCALA GELLI; MARIA ELISA FERNANDES DE FIGUEIREDO & JOSÉ FERREIRA BRANDÃO | 39 |
| Nova técnica de montagem de colônias permanentes de fungos em placas de Petri <i>A new mounting technic of permanent giant colonies of fungi in Petri dishes</i> | |
| HASSIB ASHCAR | 43 |
| A ocorrência de "pontos de quebra preferenciais" em vírus alongados <i>The occurrence of "preferential breaking points" in elongated virus particles</i> | |
| KARL MARTIN SILBERSCHMIDT; DALTON RAMALHO WEIGL & THEREZINHA APPARECIDA SALOMÃO | 47 |
| Ação do ferro sobre o grupo dos Poxvírus in vitro <i>Action of iron on the pox virus group in vitro</i> | |
| MARTA IRENA MALACHOWSKA & ADELA ROTH | 57 |
| Resíduos de pesticidas clorados em conservas de carne bovina <i>Chlorinated pesticide residues in preserved meat</i> | |
| WALKYRIA H. LARA; HELOISA H. C. BARRETTO & MICKIKO Y. TAKAHASHI | 63 |
| Eletroforese sobre acetato de celulose (CAF). Reprodutibilidade e valores normais <i>Cellulose-acetate electrophoresis (CAF). Reproducibility and range of normality</i> | |
| CELIDEIA A. COPPI VAZ; RUBENS GUIMARÃES FERRI; NIKOLAUS GEISDHOVEL & ALCIRA NANCY DE PAULA CAMPOS | 71 |
| Pesquisa rápida, prática e específica da presença do peróxido de hidrogênio no leite "in natura", pela utilização de tiras e fitas reagentes <i>Quick, practical and specific test to detect hydrogen peroxide in milk "in natura" with the use of reagent strips and test-tape</i> | |
| ALEXANDRE MELLO FILHO & LUÍS CELSO DE CASTRO | 77 |
| Pesquisa rápida, prática e específica da eventual presença de urina no leite "in natura", pela utilização de tiras reagentes <i>Quick, practical and specific test to detect urine in milk "in natura" using reagent strips</i> | |
| ALEXANDRE MELLO FILHO & LUÍS CELSO DE CASTRO | 83 |
| Leptospiroses no Brasil. Levantamento bibliográfico de 1917 a 1970 <i>Leptospirosis in Brazil. Bibliographical survey, 1917-1970</i> | |
| MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA & ALDERICA BARBOSA MEARIN | 87 |

| | |
|--|-----|
| Estudo histoquímico da fixação do glicogênio hepático no coelho <i>Histochemical study of the glycogen fixation in rabbit liver</i> | 103 |
| LEONEL COSTACURTA | |
| Separação e identificação da Betaína e Colina em mistura, por cromatografia em papel <i>Separation and identification of Betaine and Choline in mixture by paper chromatography</i> | 109 |
| WALDOMIRO PREGNOLATTO; MYRNA SABINO & CECY CHAHIN | |
| Infecções por enterobactérias no município de São Paulo . Provável disseminação por via aérea. <i>Enterobacteriaceae infections in São Paulo, Brazil. Probable dissemination by respiratory route</i> | 113 |
| AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY; JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAES & GIL VITAL ALVARES PESSÓA | |
| Alcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia em fase gasosa <i>Higher alcohols in sugar cane potable spirits by direct gas chromatography</i> | 117 |
| MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA & HELOISA HELENA CORBE BARRETTO | |
| Divulgação de Métodos | |
| Determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos | 125 |
| INSTITUTO ADOLFO LUTZ | |

A O S C O L A B O R A D O R E S

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos especialmente relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Os artigos destinados à Revista deverão ser redigidos na ortografia oficial (1943), apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com espaço duplo em folhas de papel formato officio, numeradas no ângulo superior direito, com margens de 3 cm de ambos os lados. As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas, diagramas), legendas e rodapés deverão ser apresentados à parte, devidamente identificados, assinalando-se, no texto, onde serão inseridos.

No preparo do texto, os autores obedecerão, sempre que possível, à seguinte ordem:

 Título em português
 Título em inglês
 Nome do autor ou autores (dados pessoais em rodapé)
 Resumo em inglês
 Introdução
 Material e métodos
 Resultados
 Discussão
 Conclusões
 Resumo em português
 Agradecimentos
 Referências bibliográficas

TÍTULO — Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

RESUMOS — Não deverão exceder 200 palavras. Serão concisos e claros, pondo em relevo de forma precisa os fatos essenciais necessários à conclusão.

ABREVIATURAS — Serão evitadas, ou usadas apenas as que obedecem às normas nacionais ou, na falta destas, às internacionais. Os pesos e medidas (inclusive suas abreviaturas) deverão ser expressos no Sistema Métrico Decimal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — Deverão ser apresentadas somente as de trabalhos consultados ligados ao assunto e citados no texto. Havendo um único autor, será indicado o último sobrenome, seguido do(s) prenome(s) (ou das iniciais dos prenomes): BARBOSA, A. J. Quando a obra tem dois autores, mencionam-se ambos, na ordem em que aparecem na publicação, sempre o sobrenome antecedendo o prenome, ligados por "&": GOMES, J. A. & TOURAINE, M. M. A. Para mais de dois autores, quando a identificação da obra o exigir, mencionam-se todos, separados por ";": ROSENBERG, M.; YAKOVLEV, P. I.; van der HOEVE, J.; AMATO Neto, V.; VOGT, H. Quando a identificação da obra o não exigir, menciona-se o primeiro autor, seguido da expressão et alii: RACHOU, R. G. et alii.

No texto — As referências serão numeradas, em ordem crescente, escritas em versal, com número alto ao lado do sobrenome do autor: ... segundo GOMES⁵.

Na lista de referências — Serão ordenadas numericamente, em ordem alfabética, como segue:

Para artigos

Sobrenome do autor (ou autores) seguido do(s) prenome(s) (ou das iniciais), título do trabalho, título do periódico (abreviaturas no "World List of Scientific Periodicals"), volume, número, página inicial e final e ano de publicação. Ex.:

MALLORY, F. B. — Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 22:69-75, 1911.

Para livros

Sobrenome do autor (ou autores ou editor responsável) seguido dos prenomes, título, edição, tradução (se fôr o caso), local de publicação, editor comercial, ano de publicação, número do volume, página(s) citada(s). Ex.:

AMATO Neto, V.; CAMPOS, R.; FERREIRA, C. C. — *Diagnóstico das parasitoses intestinais pelo exame de fezes*. 2.^aed. São Paulo, Atheneu, 1963. p. 125.

ILUSTRAÇÕES — Serão citadas no texto como "Fig.", numeradas e virão acompanhadas de legendas explicativas. Os desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal e confeccionados de modo a poderem ser reduzidos na clichéria a 1/2 ou 1/3 do tamanho original, sem perda de nitidez ou legibilidade. As fotografias serão apresentadas em envelope à parte; deverão ser nítidas e de bom contraste, e trazer no verso o nome do autor, título do artigo e número com que irão figurar no texto.

QUADROS E TABELAS — Não deverão exceder as dimensões do texto da Revista. Os respectivos títulos deverão indicar claramente o conteúdo; se possível, seguir as "Normas de apresentação tabular" estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística (publicadas na Rev. Bras. Est., 24:42-60, 1963). Nenhuma casa, em quadros ou tabelas, deverá ficar vazia; a ausência de dados será representada por:

- quando o fenômeno não existe
- 0; 0,0; 0,00 quando o fenômeno existe, não atingindo o seu valor, porém, a unidade adotada no quadro.
- ... quando o dado é desconhecido, não implicando, porém, afirmar ou não a existência do fenômeno.

Quando o fenômeno fôr mensurável, deverá ser expresso de maneira a que somente figurem os algarismos significativos.

DA PUBLICAÇÃO

1. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação.
2. Na publicação do artigo, constará obrigatoriamente, em rodapé, a data de recebimento.
3. Os originais de trabalhos aceites para publicação não serão devolvidos aos autores.
4. Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com a secretária da Revista.
5. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
6. Solicita-se aos autores indicarem o endereço para correspondência.
7. É proibida a reprodução no todo ou em parte de trabalhos publicados na Revista, sem prévia autorização do autor responsável e da Comissão de Redação da Revista. É permitida, entretanto, a reprodução de resumos, com a devida citação da fonte.

CALDO-SELENITO-NOVOBIOCINA. UM MEIO DE MAIOR SELETIVIDADE PARA O ISOLAMENTO DE *SALMONELLA* DE FEZES

NOVOBIOCIN-SELENITE BROTH. A MEDIUM OF IMPROVED SELECTIVITY FOR THE ISOLATION OF *SALMONELLA* FROM FAECES

GIL VITAL ÁLVARES PESSÓA (1)
ETHEL SANDOVAL PEIXOTO (2)

SUMMARY

The addition of novobiocin to selenite broth (40 µg/ml) improved its activity as an selective medium for the isolation of *Salmonella* from faeces. Significantly better results were obtained with the modified medium due to the reduction of *Proteus* overgrowth by the antibiotic.

INTRODUÇÃO

Das enterobactérias não fermentadoras da lactose, os *Proteus* estão entre os mais sensíveis à ação da novobiocina e as salmonelas entre as mais resistentes à ação desse antibiótico (JEFFRIES²). Baseado nesse fato, êsse autor aumentou a seletividade do caldo tetracionato no isolamento de salmonelas, acrescentando a êsse meio de enriquecimento novobiocina na quantidade de 40 µg/ml.

Os trabalhos de LECLERC *et alii*^{3,4} e SPINA⁵, sôbre o isolamento de salmonelas de águas poluídas, demonstraram a importância da temperatura de incubação. LECLERC *et alii*⁴ concluem que a temperatura é o fator primordial para favorecer o crescimento de salmonelas em meios seletivos, sendo a melhor temperatura a de 43°C.

Repetindo as experiências desse autor, com fezes em caldo-selenito, em banho-maria a 43°C, constatamos o crescimento exagerado de *Proteus*, muito mais intenso que em caldo-selenito a 37°C, o qual mascarava mesmo o crescimento de outras bactérias.

Partindo dessas observações, foi feito estudo comparativo entre caldo-selenito com novobiocina, a 37°C e 43°C, e caldo-selenito a 37°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os meios de cultura:

a) Caldo-selenito (Bacto Selenite Broth Difco B275), preparado de acôrdo com as especificações do fabricante, ao qual foi adicionado novobiocina² (sal cálcico contendo 970 mg/g), na concentração de 40 µg/ml. O antibiótico foi adicionado ao caldo resfriado. O meio foi distribuído em tubos de 20x200 mm, 20 ml por tubo, e conservado em refrigerador.

b) Caldo-selenito (Bacto Selenite Broth Difco B275).

c) Meio de Kristensen (Brilliant Green Agar Modified, Oxoid CM 329), preparado de acôrdo com as especificações do fabricante.

d) Meio de Holth-Harris & Teague (HHT), modificado:

| | |
|----------------------------|----------|
| Extrato de carne | 5 g |
| Peptona | 10 g |
| Cloreto de sódio | 5 g |
| Lactose | 5 g |
| Sacarose | 5 g |
| Eosina amarela | 3,99 g |
| Azul de metileno | 0,05 g |
| Agar | 20 g |
| Água | 1 000 ml |

pH = 7,6

(1) Do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Fornecida pelo Laboratório Upjohn Produtos Farmacêuticos Ltda.

Foram semeadas aproximadamente 0,5-1,0 g de fezes para 10-20 ml de meio, em um tubo de caldo selenito e em dois tubos de caldo-selenito-novobiocina. Um dos tubos com caldo-selenito-novobiocina foi incubado a 43°C, durante 18-24 horas, e os dois outros foram incubados a 37°C durante 18 a 24 horas.

Com bastão em L, foi semeada uma amostra de cada tubo, primeiramente em placa de Kristensen e, a seguir, com o mesmo bastão, em placa de HHT. Após incubação a 37°C, foram isoladas no máximo 10 colônias suspeitas de cada placa.

RESULTADOS

Os resultados estão relacionados no quadro I:

QUADRO I

Frequência de colônias de enterobactérias isoladas a partir de caldo selenito simples e caldo-selenito-novobiocina, em relação à temperatura de incubação.

| Meio | Identificação | | | |
|---------------------------|-------------------|----------------|---------------|-------|
| | <i>Salmonella</i> | <i>Proteus</i> | Outras | Total |
| Selenito 37°C | 131 (252,7) * | 156 (62,4) | 102 (73,9) | 389 |
| Selenito-novobiocina 37°C | 364 (272,9) | 19 (67,9) | 37 (79,8) | 420 |
| Selenito-novobiocina 43°C | 273 (242,4) | 15 (60,3) | 86 (71,3) | 374 |
| Total | 768 | 190 | 225 | 1.183 |

* Os números entre parênteses referem-se à frequência esperada.

Com referência ao isolamento de salmonelas, verificou-se um aumento significativo do número de colônias suspeitas isoladas; assim, a partir do caldo-selenito-novobiocina, a proporção foi de 364 para 420 colônias suspeitas a 37°C e de 273 para 374 a 43°C,

enquanto que a partir do caldo-selenito a 37°C foi de 131 para 389. O isolamento de *Proteus* foi significativamente reduzido, pois para o caldo-selenito-novobiocina a proporção foi de 19 para 420 a 37°C e 15 para 374 a 43°C, enquanto que a partir do caldo selenito foram obtidas 156 colônias para 389 suspeitas. Com referência ao isolamento de outras colônias suspeitas isoladas (não fermentadoras da lactose), verificou-se significativa redução; a partir do caldo-selenito-novobiocina a proporção foi de 37 para 420 a 37°C, de 86 para 374 a 43°C, enquanto que a partir do caldo-selenito a 37°C foi de 102 para 389.

Mediante procedimento estatístico adequado, podemos concluir que a variação observada no isolamento de salmonelas é significativa e que, portanto, existe estreita relação entre o meio testado e o isolamento de colônias suspeitas ($X^2 = 338,63$).

A influência das temperaturas de incubação (37°C e 43°C), no isolamento de salmonelas é mostrada no quadro II.

QUADRO II

Frequência de colônias de Salmonelas e de outras colônias suspeitas, isoladas, a partir de caldo-selenito-novobiocina, em relação às temperaturas de incubação.

| Temperatura | Colônias suspeitas | | |
|-------------|--------------------|---------------|-------|
| | <i>Salmonella</i> | Outras | Total |
| 37°C | 364 (337,0) * | 56 (83,0) | 420 |
| 43°C | 273 (300,0) | 101 (74,0) | 374 |
| Total | 637 | 157 | 794 |

* Os números entre parênteses referem-se à frequência esperada.

Houve variação significativa ($X^2 = 23,22$), que demonstrou que a temperatura de 43°C é prejudicial ao isolamento de salmonelas de fezes, com os meios utilizados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A inspeção dos dados obtidos (quadro I) demonstra evidente ação inibidora da no-

vobiocina no crescimento de *Proteus*. O concomitante aumento do isolamento de salmonelas corroborou a hipótese de BUTTIAUX *et alli*¹ de que “o desenvolvimento de *Proteus* num meio de enriquecimento inibe e até mesmo suprime o de salmonela”.

Com referência à influência da temperatura, os resultados obtidos diferem dos de LECLERC⁴, no isolamento de salmonelas de águas poluídas. Poder-se-ia explicar tal comportamento, além da diversidade do material em estudo, pela ação favorecedora da temperatura no crescimento competitivo de outras enterobactérias.

Obviamente, tendo em vista os resultados obtidos, deve ser indicado o emprêgo do caldo-selenito-novobiocina para isolamento de salmonelas em coproculturas.

RESUMO

A adição de novobiocina ao caldo-selenito (40 µg/ml) determinou o aumento de sua atividade seletiva no isolamento de Salmonelas a partir de fezes. Obtivemos resultados significativamente melhores devido à redução do crescimento de *Proteus* pelo anti-biótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUTTIAUX, R. & CATSARAS, M. — Le milieu au tetrathionate additionné de novobiocine pour l'enrichissement des *salmonella* des matieres fécales. *Ann. Inst. Pasteur Lille* 12:13-8, 1961.
2. JEFFRIES, L. — Novobiocin-tetrathionate broth: A medium of improved selectivity for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *J. Clin. Path.* 12:568-71, 1959.
3. LECLERC, H.; CATSARAS, M. & MIZON, F. — Sur l'isolement des *Salmonella* dans le milieu fortement pollues. 1. Etudes préliminaires sur des eaux contaminées expérimentalement. *Ann. Inst. Pasteur Lille* 21:263-76, 1970.
4. LECLERC, H.; CATSARAS, M.; SAVAGE, C. & EYMARD, C. — Sur l'isolement des *Salmonella* dans les milieux fortement pollues. 2. Essais sur des eaux résiduaires. *Ann. Inst. Pasteur Lille* 21:277-94, 1970.
5. SPINO, D. F. — Elevated temperature technique for the isolation of *Salmonella* from streams. *Appl. Microbiol.* 14:591-6, 1966.

Recebido para publicação em 15 de abril de 1971

VARIOLA. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE 1967 A 1970, NO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

SMALLPOX. ETIOLOGICAL DIAGNOSIS 1967-1970 AT INSTITUTO ADOLFO
LUTZ, SÃO PAULO, BRAZIL

LUÍS FLORÊNCIO DE SALLES-GOMES (1)
BEATRIZ CARDOSO CONCEIÇÃO (2)
YARA DUARTE GALLUZI (2)
YVETTE MONTEFORTE DA FONSECA (2)
DALTON RAMALHO WEIGL (2)
MARIA ELISA FERNANDES DE FIGUEIREDO (2)

SUMMARY

In 332 specimens of materials from suspected smallpox cases collected by the Smallpox Eradication Campaign between June 1967 and August 1970, virus cultures, electron microscopy, detection of viral antigen and serologic tests were done for etiological diagnoses purposes.

One hundred and seventy seven samples or 53.6% were positive for smallpox in chorioallantoic membrane and/or tissue cultures methods.

Ten smallpox strains were identified as variola minor or alastrim.

One hundred and ninety two samples were studied simultaneously by virus culture methods and electron microscopy with 89% of identical results.

Three hundred and seven samples inoculated in the chorioallantoic membrane of hen egg's and human kidney tissue cultures line showed 92% identical results.

The statistical analysis showed no significant difference between the two methods of virus culture and also between these two methods and electron microscopy.

Only 4 out of 56 samples of blood showed titres suggesting recent poxvirus infection through hemagglutination inhibition and complement fixation tests.

The clinical and epidemiological diagnoses of smallpox was correlated with etiological laboratory results.

INTRODUÇÃO

A varíola, infecção conhecida há séculos, ainda hoje apresenta, em cerca de 10-20% dos casos, dificuldades de diagnóstico clínico-epidemiológico. Nos países onde a varíola raramente ocorre, é óbvio que a grande maioria dos clínicos e epidemiologistas não está atenta para o diagnóstico desta infecção; por outro lado, nos lugares em que ela é endêmica não é raro ocorrerem surtos paralelos de varicela, confundindo o quadro clínico-epidemiológico. É simples fazer o diagnóstico da varíola quando o quadro clínico se apresenta igual ou semelhante àquele que se convencionou classificar como "clássico" ou típico da varíola; entretanto, existe difi-

culdade de diagnóstico quando nos defrontamos com casos não usuais ou ainda modificados principalmente pela vacinação anti-variolica prévia com pega. Segundo Dixon, a varíola, seja ela *major* ou *minor*, pode apresentar uma série de nove quadros clínicos diferentes, variando desde a varíola purpúrica, até a "sine eruptione", sem que, entretanto, a maioria dos tipos se afaste daquele que se convencionou classificar como clássico. Em nosso país é comum observar, durante um surto epidêmico, vários tipos clínicos da varíola com predominância do tipo VI de DIXON¹⁵. É óbvio que, seja qual for o tipo clínico que se manifeste, o isolamento e as medidas epidemiológicas devem ser impostas.

(1) Diretor do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

Nos países onde a varíola não é endêmica, e naqueles em que se propõe sua erradicação, como é o nosso caso, a confirmação etiológica através dos exames virológicos especializados é de suma importância sob os mais variados aspectos da saúde pública. Neste particular, nosso laboratório vem há alguns anos colaborando com a Organização Pan-Americana de Saúde e o Governo Federal, realizando diagnósticos etiológicos das infecções por vírus que causam exantemas.

Apresentamos neste trabalho os dados obtidos com os exames dos materiais procedentes de várias regiões do país, através da Campanha de Erradicação da Varíola, e evidências laboratoriais do tipo de vírus da Varíola que grassou em nosso meio, bem como comentários de interesse sobre o trabalho desenvolvido.

MATERIAL E METODOS

O material que chega regularmente ao Serviço de Virologia é constituído, na maioria das vezes, por 2 a 4 lâminas bacteriológicas com esfregaço de vésico-pústulas e por crostas de lesões em latas de metal tipo "vaselina" ou em tubos de vidro fechados com rolhas de cortiça. Raramente recebemos capilares ou vidros tipo "penicilina" com conteúdo de vésico-pústulas. Todos os materiais sem exceção chegaram através do correio aéreo ou não, sem qualquer refrigeração, acondicionados em invólucros apropriados cedidos pela Campanha de Erradicação da Varíola, ou ainda em caixas improvisadas de madeira ou de papelão. Geralmente o material vem acompanhado de ficha com dados clínico-epidemiológicos, pessoais, do local de origem e suspeita diagnóstica.

Imediatamente após sua chegada ao laboratório, abertos os invólucros e verificadas suas condições, os materiais eram registrados em série numérica e de acordo com a quantidade de material recebido de cada caso, separava-se parte destinada ao laboratório de microscopia eletrônica e o restante, de acordo com sua natureza, era suspenso e/ou macerado em 0,5-1,0 ml de solução fisiológica tamponada (PBS, pH = 7,2) acrescido de antibióticos (2.000 U Pen. + 350 γ de Estreptomicina), controlados em meios bacteriológicos e conservados em temperatura de -27°C até o momento da feitura dos exames.

Técnicas Viroológicas: Cultivo e Identificação

As inoculações para a tentativa do isolamento do vírus foram feitas em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha de 11-12 dias de incubação e/ou em cultura celular contínua de rim humano (RH), original de Ness Ziona, Israel, de acordo com a disponibilidade dos meios de cultivo. A técnica de inoculação em ovos embrionados foi a usual (WHO), e a quantidade inoculada nos meios foi sempre de 0,1 ml. O número de ovos inoculados foi de 4-6, e de 3-4 o de tubos de culturas celulares, para cada material. Os meios inoculados foram incubados a 36°C; os ovos foram abertos após 72 horas de incubação, a membrana corioalantóide excisada e colocada em placa de Petri contendo solução fisiológica tamponada e examinada com luz incidente contra fundo escuro. Observaram-se as culturas celulares diariamente para a verificação ou não da presença do efeito citopático até 7-8 dias após a inoculação.

A identificação do vírus em membrana corioalantóide foi feita pelo aspecto macroscópico e características morfológicas das lesões⁶ verificando-se crescimento confluyente, realizávamos passagens seriadas com diluições do vírus até obtermos lesões isoladas de aspecto típico. Se os caracteres morfológicos não exibissem tipicidade, procedíamos à identificação de grupo através da reação de hemaglutinação com hemácias de galinha previamente selecionadas. A identificação do vírus nos sistemas celulares também foi feita pelo caráter de efeito citopático quando as lesões ou focos eram isolados; porém, quando o crescimento era total, procedíamos às passagens seriadas com diluições de vírus isolado. Se ainda persistisse qualquer dúvida com relação ao agente isolado, realizávamos a reação de hemadsorção com hemácias de galinha também previamente selecionadas, para identificá-lo (grupo).

Microscopia Eletrônica

Os exames feitos pela microscopia eletrônica consistiram em colorações do material pelo método do contraste negativo pelo ácido fosfotúngstico (PTA) e pesquisa microscópica exaustiva para visualização do corpúsculo elementar do vírus⁴. No mínimo 2-3 grades de cada material eram examinadas.

Difusão em Agar

Na dependência da quantidade de material da amostra recebida, realizávamos também a prova da dupla difusão em ágar para demonstrar o antígeno viral¹⁰. A leitura final da reação foi feita em 18-24 horas e o sôro hiperimune antivacínico foi por nós preparado segundo a técnica usual. Foram sempre incluídos no teste contrôles positivos já conhecidos e sôro de coelho normal. O resultado só era considerado positivo de grupo quando uma linha de precipitação do desconhecido unia-se ou fundia-se com uma linha do controle positivo e os contrôles negativos não exibiam qualquer linha de precipitação.

Em certo número de soros recebidos em condições de serem manipulados, realizaram-se reações de fixação de complemento e inibição da hemaglutinação para dosagens de anticorpos específicos de grupo pela micro-técnica de rotina usada em nosso laboratório¹².

Identificação do Tipo de Vírus

Todos os vírus isolados foram sistematicamente guardados em refrigerador a -70°C algumas amostras foram selecionadas para a prova de identificação do tipo de vírus da varíola; a técnica usada foi a descrita por NIZAMUDIN & DUMBELL¹³, que consiste em comparar o crescimento ou a inibição do vírus à temperatura de 35°C e 38,5°C.

RESULTADOS

No período de Junho de 1967 a Agosto de 1970 recebemos amostras de materiais suspeitos de varíola que puderam ser examinados por alguns métodos laboratoriais para a confirmação etiológica do diagnóstico clínico-epidemiológico da varíola. Do total de 332 materiais provenientes de várias Unidades da Federação, 177 resultaram positivas para varíola, correspondendo a 53,6% de positividade no material estudado (Quadro I).

Das cinco Unidades da Federação tivemos materiais representativos de quatro, nas quais despistamos casos positivos de varíola com comprovação etiológica no laboratório. Com base nestes resultados podemos afirmar que

Materiais que puderam ser trabalhados e diagnosticados por meio de isolamento e identificação do vírus, recebidos através da Campanha da Erradicação da Variola, de junho de 1967 até agosto de 1970

| Unidades da Federação | Estados | Nº de amostras | Positivos para varíola |
|-----------------------|---------------------|----------------|------------------------|
| Nordeste | Maranhão | 1 | 0 |
| | Ceará | 5 | 4 |
| | Rio Grande do Norte | 2 | 0 |
| | Paraíba | 4 | 3 |
| | Pernambuco | 4 | 0 |
| Sudeste | Alagoas | 3 | 2 |
| | Minas Gerais | 50 | 31 |
| | Rio de Janeiro | 3 | 0 |
| Sul | São Paulo | 98 | 43 |
| | Paraná | 17 | 13 |
| Centro-Oeste | Rio Grande do Sul | 70 | 42 |
| | Distrito Federal | 29 | 11 |
| Sem procedência | Goiás | 29 | 20 |
| | | 17 | 8 |
| | | 332 | 177 53,6% |

a infecção variólica grassou durante o período acima citado, praticamente em todo o país.

Foram realizadas em dez cepas de vírus isolados de diferentes regiões do Brasil as provas do crescimento ou inibição do crescimento do vírus da varíola em temperaturas de 35°C e 38,5°C. Dos resultados do quadro II, verificamos que houve nítida inibição do crescimento dos vírus usados no experimento, na realidade 100% de inibição, quando foram incubados a temperatura de 38,5°C. A cepa padrão do vírus da varíola maior, cepa Harvey, demonstrou, a 38,5°C, relativa inibição do crescimento evidenciada pela diminuição do número de lesões e ainda apresentou discreta diferença morfológica em relação ao seu crescimento típico à temperatura de 35°C. Todos os vírus autóctones usados neste experimento tiveram comportamento segundo o teste da temperatura como cepas de varíola minor ou alastrim. Comportamento semelhante aos vírus usados foi também verificado com a cepa Butler, padrão representativo da varíola minor. Obviamente, de acordo com os resultados, podemos afirmar, generalizando, que durante o período estudado os casos clínicos de varíola corresponderam etiológicamente aos de varíola minor ou alastrim.

QUADRO II

Resultados de 10 cepas submetidas a prova de temperatura para distinção entre variola major e minor.

| Amostra N.º | Procedência | N.º de lesões na MCA' após 72 horas | | |
|-------------|------------------|-------------------------------------|----------|-----------|
| | | 35°C | a 38,5°C | |
| 1561 | Paraíba | 137 - 105 | | 0 - 0 |
| | | > 200 > 200 | | 0 - 0 |
| 1571 | Alagoas | > 200 > 200 | | 0 - 0 |
| | | 185 > 200 | | 0 - M |
| 1600 | Ceará | > 200 > 200 | | 0 - 0 |
| | | 150 180 | | 0 - M |
| 1627 | Goiás | > 200 > 200 | | 0 - 0 |
| | | 200 M | | 0 - M |
| 1642 | Distrito Federal | 80 - 68 | | 0 - 0 |
| | | > 200 - 25sc | | 0 - 0 |
| 1725 | Brasília | 100 - 75 | | 0 - 0 |
| | | 85 - 200 | | 0 - M |
| Harvey | Inglaterra | 150 > 200 | | 42 - 57 |
| | | > 200 170 | | 10sc 18sc |
| Butler | Inglaterra | > 200 120 | | 0 - 0 |
| | | > 200 150 | | 0 - 0 |
| 2581 | Paraná | 125 > 200 | | 0 - 0 |
| | | 160 > 200 | | 0 - 0 |
| 3159 | M. Gerais | 130 90 | | 0 - 0 |
| | | 70 150 | | 0 - 0 |
| 3166 | R. Grande do Sul | 60 - 110 | | 0 - 0 |
| | | 150 > 200 | | 0 - 0 |
| 3199 | S. Paulo | 50 - 35 | | 0 - 0 |
| | | 42 29 | | 0 - 0 |
| Harvey | Inglaterra | 50sc 35sc | | 30 - 7sc |
| | | 100 > 200 | | 13sc M |
| Butler | | > 200 120 | | 0 - 0 |
| | | 85 M | | 0 - 0 |

> 200 = confluyente
sc = semiconfluyente
O = ausência de lesões
M = morte.

192 materiais suspeitos de varíola foram estudados simultaneamente pela microscopia eletrônica e por cultivo do vírus em membrana corioalantóide e/ou cultura contínua de células de rim humano. 97 materiais resultaram positivos para varíola nos meios de cultivo para o vírus, correspondendo prática-

mente a 50% de positividade nos materiais estudados. Em microscopia eletrônica tivemos 88 materiais positivos ou seja praticamente 46% de material estudado. A concordância nos dois métodos foi de 89% porque, seis materiais foram positivos em microscopia eletrônica e negativos em membrana corioalantóide e/ou sistema celular, por outro lado 15 materiais foram positivos em cultivo porém foram negativos em microscopia eletrônica. Os resultados deste experimento estão demonstrados no Quadro III; o tratamento estatístico demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos em relação ao diagnóstico etiológico da varíola. O teste usado foi "x²", com correção de Yates, obteve-se um valor de x² = 0,66 com um grau de liberdade que seria estatisticamente significativo somente a um nível de P = 50%.

QUADRO III

Resultados obtidos pela microscopia eletrônica e cultivo em membrana corioalantóide e/ou cultura celular (RH).

| Resultado Prova | Resultado | | Total |
|--------------------|--------------|---------------|-------|
| | + | - | |
| ME | 88 (92,5) | 104 (99,5) | 192 |
| MCA e/ou CT | 97 (92,5) | 95 (99,5) | 192 |
| Total | 185 | 199 | 384 |

x² = 0,66
df = 1
(N.^{os}) = freqüências teóricas.
ME = microscopia eletrônica.
MCA = membrana corioalantóide
CT = cultura de tecidos.

307 materiais suspeitos de varíola foram inoculados em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha e em cultura contínua de células de rim humano para testar a sensibilidade dos dois meios de cultivo para o vírus da varíola. Os resultados estão ilustrados na quadro IV. 170 materiais foram positivos em membrana corioalantóide correspondendo a 55,3% de positividade no material estudado. 156 materiais foram po-

sitivos em cultura celular correspondendo a 50,8% de positividade. As diferenças de dados obtidos nos dois métodos quando analisados sob o ponto de vista estatístico, não demonstraram ser significativas. O teste usado foi o "x²" com correção de Yates. Obteve-se um valor de "x²" = 1,10 com um grau de liberdade, neste caso só haveria significância estatística a um nível de P = 30%.

QUADRO IV

Resultados obtidos pelos métodos de cultivo em membrana coriolantóide e linhagem contínua de células de rim humano (RH)

| Resultado Método | Resultado | | Total |
|---------------------|--------------|--------------|-------|
| | + | - | |
| CT | 156 (163) | 151 (144) | 307 |
| MCA | 170 (163) | 137 (144) | 307 |
| Total | 326 | 288 | 614 |

x² = 1,10

df = 1

(N_{te}) = freqüências teóricas

MCA = membrana coriolantóide

CT = cultura de tecidos.

Em relação às provas de dupla difusão em ágar para demonstração da presença do antígeno viral, realizamos somente 18 provas em virtude da exigüidade do material recebido. A experiência que tivemos em 1967 (Luís Florêncio de Salles Gomes e John Noble Jr.), de que há necessidade de no mínimo 10-12 crostas maceradas de variola minor para obtermos resultados positivos nesta prova, impediu a realização de maior número de testes. Do total de 18 provas, 16 exibiram resultados concordantes quando relacionados com o cultivo do vírus; dos 8 materiais que foram positivos para difusão em ágar, 6 eram constituídos por crostas e 2 por esfregaços de conteúdo de lesões em lâminas; dos 10 negativos, 9 eram crostas e 1 esfregaço de conteúdo de lesões em lâminas.

QUADRO V

| Diagnóstico clínico-epidemiológico | Variola no laboratório | |
|------------------------------------|------------------------|--------------|
| | Casos | Positividade |
| a) Variola | 122 | 88* |
| b) Não é variola | 25 | 1 |
| c) Duvidoso | 28 | 12 |

* 3 casos de Vacínia generalizada.

Apenas 56 amostras de sangue chegaram ao nosso laboratório em condições de serem trabalhadas e, destas, somente 8 vieram acompanhadas de fichas completas, contendo dados informativos de valor. Das 56 amostras, somente 4 tiveram títulos iguais ou acima de 1:10 em fixação de complemento, e somente uma teve título de 1:160 em inibição da hemaglutinação. Em todas as amostras positivas para inibição da hemaglutinação, o título foi de 1:10 ou 1:20. De nenhum caso recebemos a 2.^a amostra para verificação do aumento ou não significativo do título. De acordo com o critério dos autores ingleses⁷, generalizando, podemos afirmar que somente quatro amostras examinadas correspondiam a uma infecção atual ou recente pelo poxvírus, isto porque em um caso o título de inibição da hemaglutinação de 1:160 correspondeu a um título de fixação de complemento de 1:40.

QUADRO VI

Dados comparativos entre os resultados obtidos pelo diagnóstico clínico e do laboratório

| DC \ DL | DL | | Total |
|---------|----|----|-------|
| | + | - | |
| + | 88 | 34 | 122 |
| - | 1 | 24 | 25 |
| Total | 89 | 58 | 147 |

x² = 29,25

df = 1

P < 0,001

DL = diagnóstico laboratorial

DC = diagnóstico clínico

Em 175 casos clínicos, relacionando os resultados etiológicos com as três alternativas diagnósticas contidas nas fichas clínico-epidemiológicas a saber: varíola, não é varíola e "duvidoso", quadros V e VI, eliminando os 28 casos classificados como "duvidosos" para o estudo estatístico, podemos concluir que os diagnósticos clínico e etiológico diferem significativamente quanto à proporção de casos positivos em laboratório. O teste usado foi o das mudanças de McNemar, obteve-se um valor de $\chi^2 = 29,25$ com um grau de liberdade, portanto uma probabilidade de $P < 0,001$, o que quer dizer que o valor encontrado é altamente significativo.

COMENTÁRIOS

Com exceção da Região Norte do país, foram examinados materiais procedentes de todas as Unidades da Federação; 53% resultaram positivos para varíola. Com base nos estudos etiológicos, verificamos que a infecção grassou praticamente em todos os recantos do país.

Sob o ponto de vista clínico-epidemiológico este fato é sobejamente conhecido; entretanto, reafirmamos a verificação, com a comprovação etiológica pelo fato de ainda existir em nosso meio certa "crença" de que determinadas zonas são isentas da varíola, ocorrendo somente casos de "varicela". Ora, este erro é muitas vezes determinado pelo desconhecimento do polimorfismo do quadro clínico da varíola e motivado ainda mais pela ocorrência entre nós de grande número de casos benignos, classificados como tipos 6, 7 e 8 de Dixon¹⁵.

É comum ouvirmos, em assuntos referentes à varíola, a afirmação de que em nosso país não existe varíola e sim alastrim. Ora, a verdade é que o alastrim é nome regional da varíola minor. Epidemiologicamente, é considerado uma variante estável do vírus da varíola major, causando uma entidade nosológica, muito afim, somente distinguível através dos dados epidemiológicos e de testes laboratoriais⁵.

Na literatura nacional, existe uma referência de CLAUSELL², no Rio Grande do Sul, que publicou um estudo com bases epidemiológicas e laboratoriais afirmando que

seis cepas de vírus por ele isolados foram diagnosticadas como varíola *major*. Por outro lado, DOWNIE⁸ e NOBLE JR. e col.¹⁴ 1968 estudando materiais colhidos em São Paulo no Hospital Emílio Ribas, e BRICEÑO-ROSSI¹, na Venezuela, trabalhando com materiais de indígenas da fronteira com o Brasil, concluíram que todas as cepas por eles isoladas eram de varíola minor ou alastrim.

Ainda, sob o ponto de vista clínico-epidemiológico, há em nosso país a descrição da epidemia ocorrida em 1926 no Rio de Janeiro, com um índice de letalidade de 45,12% (COUTINHO³); portanto sob esse aspecto não há dúvidas de que o agente etiológico em questão foi a varíola major. CLAUSELL² sugere que, devido aos índices de letalidade de 8,5 e 5,6%, houve possibilidade de, no Rio Grande do Sul, em 1960 e 1961, ter havido etiologia mista, isto é, varíola minor e major. Parece-nos, entretanto, que a ocorrência mais freqüente é a de surtos paralelos de vírus diferentes como a varíola e a varicela, ou ainda, quando um vírus é introduzido artificialmente, como é o caso da vacinação antivariólica.

Das cepas por nós estudadas em temperatura de 35°C e 38,5°C, nenhuma pôde ser classificada como varíola major, isto é, todos os vírus comportaram-se no teste da temperatura como varíola minor ou alastrim. Usando um termômetro que demonstrava variações de décimos de grau, embora não possuíssemos um registrador que demonstrasse essas variações, a validade de nossos experimentos não pode ser contestada porque introduzimos no teste as duas amostras padrão dos vírus da varíola. O controle interno do experimento afasta qualquer dúvida da veracidade dos resultados.

Estes resultados ainda são consubstanciados pelos índices de letalidade apresentados nos relatórios da Campanha de Erradicação da Variola, índices que são compatíveis com os da varíola minor ou alastrim.

Seria interessante ainda ressaltar que o teste de diferenciação pela temperatura, entre varíola major e minor, segundo os autores ingleses, é válido para as amostras de varíola procedentes da Holanda, Inglaterra e América do Sul e pode dar resultados equivocados com as amostras do Leste da África¹¹.

É óbvio que existe um interesse imediato em verificar durante o início de um surto de varíola qual o vírus responsável, devido à alta mortalidade pela varíola major em contraste com a baixa mortalidade pela varíola minor.

Em relação aos dados da microscopia eletrônica, merece algum comentário o fato de seis materiais serem positivos para poxvírus em microscopia eletrônica e negativos em membrana corioalantóide e/ou cultura celular. Poderíamos imediatamente interpretar este achado como normal, isto é, partículas de vírus encontradas na microscopia porém não viáveis, daí a falha no cultivo do material. Porém, deve ser lembrado que é possível isolar poxvírus a partir de crostas em temperatura ambiente por mais de doze meses⁹.

Um erro na caracterização do vírus na microscopia também não parece aceitável, devido à experiência dos microscopistas e ao achado constante de mais de uma partícula no mesmo material para a conclusão diagnóstica. Outra explicação seria provavelmente determinada pela escassez do material inoculado nos meios de cultivo, tendo em vista que a relação partícula/infectividade em membrana é de 6:1-10:1¹².

A concordância obtida com os dois métodos de 89% pode ser considerada como boa se levarmos em consideração o fato de que os materiais examinados não foram colhidos por especialistas. Ainda, os materiais não eram uniformes, eram constituídos na maioria por crostas e esfregaços de vésico-pústulas em lâminas e chegavam ao laboratório com alguns dias em temperatura ambiente sem qualquer tipo de refrigeração. Apesar destes problemas, o estudo estatístico dos resultados não revelou diferença significativa entre os métodos.

Temos tido, nos últimos cinco anos, vasta experiência demonstrando que, quando o material é colhido em condições técnicas ideais, seja nas fases vesicular, pustular ou de crostas, os resultados têm sido praticamente de 100% de concordância. Índices de alta concordância por estes métodos são citados por CRUICKSHANK, BEDSON & WATSON⁴ e por NOBLE JR. *et alii*¹³. A microscopia eletrônica é extremamente útil para o diagnóstico de grupo no caso dos poxvírus, podendo for-

necer o resultado em menos de uma hora e, por outro lado, pode ainda detectar infecções pelos herpesvírus, dando informações também imediatas para a orientação das medidas preventivas cabíveis.

Os resultados obtidos com as inoculações em membrana corioalantóide e cultura celular contínua de rim humano indica ser indiferente o uso de um ou outro meio para as tentativas de diagnóstico e isolamento do vírus da varíola, qualquer que seja o material recebido. Evidentemente, a cultura celular substituirá o ôvo embrionado de galinha quando não dispuzermos de fornecimento constante de ovos ou não tivermos ovos com tempo de incubação apropriado para as inoculações. Deve ser também levado em consideração que o *Herpesvirus hominis*, de origem genital, pode causar lesões semelhantes às de varíola na membrana corioalantóide, dificultando a identificação macroscópica do vírus porém, nestas membranas sempre encontramos lesões características dos herpesvírus. No sistema celular usado — linhagem contínua de células de rim humano — jamais tivemos com o *herpesvirus hominis* um efeito citopático semelhante ao produzido pelo vírus da varíola.

Em relação ao diagnóstico clínico-epidemiológico contido nas fichas, é provável que, com a evolução clínica da infecção, parte destes casos estudados tiveram seu diagnóstico clínico reavaliado. Obviamente, em vista dos resultados devemos insistir na necessidade de comprovação laboratorial dos casos clinicamente evidentes ou suspeitos de varíola. Atualmente, num país onde se caminha para a erradicação da varíola, não se pode admitir qualquer relaxamento ou descaso nas medidas de controle e de diagnóstico clínico e etiológico dos casos suspeitos ou duvidosos desta infecção.

RESUMO

Com 332 materiais suspeitos de varíola, encaminhados ao Inst. Adolfo Lutz através da Campanha de Erradicação da Varíola no período de junho de 1967 a agosto de 1970, foram realizadas provas de cultivo do vírus, pesquisa direta em microscopia eletrônica, pesquisa do antígeno solúvel viral e reações sorológicas para detectar anticorpo específico de grupo, no sentido de estabelecer o diagnóstico etiológico da infecção.

177 materiais ou 53,6% resultaram positivos para varíola nos meios de cultivo.

Dez cepas do vírus da varíola foram identificadas no teste da temperatura como cepas de varíola minor ou alastrim.

192 materiais foram estudados simultaneamente em meios de cultivo e em microscopia eletrônica. 89% dos resultados foram concordantes.

307 materiais foram inoculados em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha e em cultura contínua de células de rim humano. Houve concordância de 92% nos resultados.

O estudo estatístico revelou não haver diferença significativa entre os dois métodos de cultivo do vírus e entre o cultivo do vírus e a microscopia eletrônica.

Foram realizadas ainda, as reações de inibição da hemaglutinação e fixação do complemento em 56 amostras de sangue, somente quatro demonstraram títulos que sugeriam uma infecção recente pelos poxvirus.

De 18 materiais foram feitas a reação de dupla difusão em ágar para detectar antígeno solúvel viral, 16 reações exibiram resultados concordantes quando relacionados com o cultivo do vírus.

Foi relacionado o diagnóstico clínico-epidemiológico da varíola com os resultados obtidos em laboratório.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRIGENO ROSSI, A. L. — Las diferencias del virus de Alastrim. *Bolm. Of. Sanit. Pan-am.*, 54(5):419-23, 1923.
2. CLAUSELL, D. T. — Variola e Alastrim. *Hospital, Rio de J.*, 68(1):177-80, 1965.
3. COUTINHO, E. — *Tratado de clínica das doenças infectuosas e parasitárias*. 4ed. Rio de Janeiro, 1947. p. 11.
4. CRUICKSHANK, J. G.; BEDSON, H. S. & WATSON, B. H. — Electron microscopy in the rapid diagnosis of smallpox. *Lancet*, 2(1):527-30, 1966.
5. DIXON, C. W. — *Smallpox*. London, Churchill, 1962. p. 57.
6. DOWNIE, A. W. & DUMBELL, K. R. — The isolation and cultivation of variola virus on the choric-allantois of chick embryos. *J. Path. Bact.*, 59:189-98, 1947.
7. DOWNIE, A. W. & McCARTHY, K. — The fection with viruses of the pox group. antibody response in man following in-III. Antibody response in smallpox. *J. Hyg., Camb.*, 56:479-87, 1958.
8. DOWNIE, A. W.; DUMBELL, K. R.; GALVAO, A. P. A. & ZATS, I. Alastrim in Brazil. *Trop. Geogr. Med.*, 15:25, 1963.
9. DOWNIE, A. W.: In HORSFALL, F. L. & TAMM, J. — *Viral and rickettsial infections of man*. 4th ed. Philadelphia, Lippincot, 1965. p. 934.
10. DUMBELL, K. R. & NIZAMUDDIN — An agar-gel precipitation test for the laboratory diagnosis of smallpox. *Lancet*, 1(2):916-7, 1959.
11. DUMBELL, R. K. — Laboratory aids to the control of smallpox in countries where the disease is not endemic. *Prog. Med. Virol.*, 10:388-97, 1968.
12. McCARTHY, K. & DOWNIE, A. W. — The serum antibody response in Alastrim. *Lancet*, 1(1):257-60, 1953.
13. NIZAMUDDIN & DUMBELL, K. R. — A simple laboratory test to distinguish the virus of smallpox from that of Alastrim. *Lancet*, 1(1):68-9, 1961.
14. NOBLE Jr., J.; LONG, G. W.; KIRCHNER, E. & SESSO, J. — A clinical and laboratory study of smallpox in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19(6):1020-8, 1970.
15. SILVA, R. G.; ANGULO, J. J. & RABELLO, S. I. — Clinical types of smallpox as seen in an epidemic. *Postgrad. Med. J.*, 18:140-4, 1962.

Recebido para publicação em 4 de agosto de 1971.

RESÍDUOS DE PESTICIDAS CLORADOS EM LEITE CONSUMIDO EM SÃO PAULO ⁽¹⁾

CHLORINATED PESTICIDE RESIDUES IN FLUID MILK CONSUMED IN SÃO PAULO, BRAZIL

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA ⁽²⁾
HELOISA HELENA CORBE BARRETTO ⁽³⁾

SUMMARY

Gas liquid chromatography with electron capture detector was applied for the qualitative and quantitative analysis of fluid milk consumed in the city of São Paulo, Brazil.

The pesticides were extracted according to the Mili's procedure. Peak identifications were accomplished by comparison with the retention time of the standards and by the addition of the supposed pesticide to the samples.

BHC isomers were identified in all samples. The total BHC content in the samples varied from 0.007 to 0.055 ppm and the different isomers: alpha-BHC from 0.001 to 0.046 ppm; beta plus gama-BHC from 0.001 to 0.028 ppm; delta-BHC from 0.000 to 0.005 ppm.

Four samples of cheese type "Parmegiani" were also analysed with the following results: alpha-BHC from 0.115 to 1.300 ppm; beta plus gama-BHC from 0.145 to 1.350 ppm; delta-BHC from traces to 0.650 ppm, in the fat.

INTRODUÇÃO

O emprêgo cada vez mais difundido de pesticidas na agricultura para combater pragas e doenças de vegetais e para a proteção de grãos armazenados, como também na pecuária para controlar os ectoparasitas do gado, trouxe para a Saúde Pública mais um problema toxicológico resultante da contaminação de alimentos com resíduos destes defensivos agropecuários.

Até cerca de 1940, os agricultores contavam com poucas substâncias químicas para combater algumas das pragas existentes. Entretanto, atualmente, mais de cem mil toneladas de formulações de inseticidas são utilizadas por ano, no Brasil, além de outros pesticidas como acaricidas, fungicidas, ervicidas e moluscocidas.

Após sua aplicação, resíduos destas substâncias tóxicas permanecem nas folhas, frutos e grãos. A absorção freqüente de resíduos de pesticidas pode conduzir ao estabele-

cimento de intoxicações crônicas, se estes estiverem presentes nos alimentos, acima dos limites de tolerância.

O limite máximo de tolerância de pesticidas em produtos alimentícios está regulamentado por lei, no Brasil, e a matéria é revista, periódicamente, pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, com a finalidade de manter atualizados esses limites de tolerância.

Entretanto, resíduos de pesticidas presentes nas pastagens, forragens e rações de gado são transferidos para a carne e para o leite destes animais; são estes os chamados resíduos não intencionais. Por outro lado, a aplicação eventual de medicamentos tópicos e de banhos carrapaticidas contendo pesticidas, que são absorvidos por via cutânea, também contribuem para o aparecimento destes pesticidas tanto no leite como na carne.

(1) Trabalho apresentado ao 18.º Congresso Brasileiro de Higiene, realizado em S. Paulo de 26 a 31 de outubro de 1970.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Do Fundo de Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

Ainda, a persistência de inseticidas clorados em solos cujas culturas anteriores foram tratadas com êsses pesticidas também contribue para a contaminação de pastagens e forragens. Resíduos de lindana, DDT, aldrin, dieldrin, clordana e heptacloro já foram encontrados em solos vários anos após sua aplicação (EDWARDS⁵).

A determinação do teor de pesticidas em alimentos tem sido solicitada pela FAO (Food Agricultural Organization) a todos os países membros das Nações Unidas, com a finalidade de permitir uma avaliação real da quantidade de resíduos de diferentes pesticidas ingeridos por populações locais. Êstes estudos permitiriam verificar se está ou não sendo excedida a dose diária aceitável para o homem.

Com a finalidade de avaliar o grau de contaminação do leite, foram analisadas diferentes amostras de leite consumido na cidade de São Paulo.

MATERIAL E METODOS

Analisamos 17 amostras de leite de quatro marcas normalmente existentes no comércio de S. Paulo, sendo 14 amostras do tipo B e 3 do tipo C. As diferentes amostras foram adquiridas no comércio durante os meses de julho, agosto e setembro de 1970. Foram também analisadas 4 amostras de queijo tipo "parmeção", proveniente de 4 partidas diferentes de um mesmo fabricante.

O método seguido foi o indicado em "Guide to the Analysis of Pesticide Residues"² baseado em trabalhos de MILLS⁷ e ONLEY⁸. O processo compreende as seguintes fases:

a) *Extração da gordura e dos pesticidas dissolvidos na gordura*

Transfira 100 g de leite para um frasco de centrífuga de 500 ml. Adicione 1 g de oxalato de potássio p.a., 100 ml de metanol p.a. e agite com cuidado. Adicione 50 ml de éter etílico e agite o frasco vigorosamente. Adicione 50 ml de éter de petróleo p.a. (p.e. 30 a 60°C) e agite o frasco de novo, vigorosamente. Centrifugue a 1500 rpm durante 10 minutos. Com o auxílio de uma pipeta de 50 ml munida de pera de borracha, transfira a camada superior (contendo dissolvidos gordura e pesticidas) para um funil de separação de 1 litro contendo 500 a 600

ml de água. Adicione ao resíduo remanescente no frasco da centrífuga, 50 ml de uma mistura de éter de petróleo e éter etílico (1+1), agite, centrifugue e transfira a camada superior para o mesmo funil de separação. Repita mais uma vez esta última extração. Agite cuidadosamente para misturar as 2 fases, evitando a formação de emulsão permanente; deixe em repouso até a separação das camadas e despreze a camada inferior aquosa. Lave o extrato etéreo com 2 porções de 100 ml de água. Passe o extrato etéreo através de 1 coluna de sulfato de sódio anidro, granulado (aproximadamente 5 cm de altura por 2 cm de diâmetro) para retirar a umidade e receba em um bequer de 400 ml. Lave a coluna várias vezes, com pequenas porções de éter de petróleo. Evapore o extrato etéreo da seguinte maneira: Coloque o béquer em um banho de água a 50°C (não ultrapasse essa temperatura) e evapore o éter sob uma corrente de nitrogênio ou ar seco. (Tanto o ar como o nitrogênio devem passar, previamente, por uma pequena coluna de sulfato de sódio anidro ou sílica gel. Toda a evaporação deve ser efetuada em capela com boa tiragem). Neste ponto, a análise pode ser interrompida por toda a noite; guarde o bequer coberto com uma folha de alumínio.

b) *Separação dos pesticidas da gordura por partição em acetonitrila-éter de petróleo*

Dissolva a gordura acima obtida com pequenas porções de éter de petróleo (redesilado, com p.e. 30-60°C) e transfira para um funil de separação de 125 ml com rôlha de teflon. Lave o bequer com éter de petróleo (o volume total da solução etérea deverá ser aproximadamente de 25 ml). Coloque no funil 25 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo. Agite bem o funil; deixe as fases separarem e transfira a camada inferior de acetonitrila para um funil de separação de um litro contendo 500 a 600 ml de água. Repita a extração mais 3 vezes, usando de cada vez 25 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo. Adicione, então, 100 ml de éter de petróleo aos extratos reunidos no funil de 1 000 ml e agite, cuidadosamente, a fim de evitar formação de emulsão. Depois da separação das 2 fases, a camada inferior aquosa é retirada. Lave a camada etérea com mais 2 porções de 100 ml de água. Passe a camada de éter de petróleo por uma coluna de sulfato de sódio anidro, como no processo.

anterior de extração, lave a coluna com 3 porções de 10 ml de éter de petróleo e recolha em um bequer de 400 ml. Evapore o éter, observando os mesmos cuidados do processo anterior, até reduzir o volume a 5 ml.

c) *Purificação (Clean-up) em coluna de Florisil*

Preparo do Florisil e dos solventes

Florisil — Ativação: Florisil, adquirido já ativado a 650°C, deve ser distribuído em frascos menores com tampa de rêsca e conservado ao abrigo da luz. Antes de usar, deve ser novamente ativado aquecendo a 130°C, durante 5 horas, no mínimo. Deve ser conservado a 130°C em frascos de vidro, fechados, ou então pode ser conservado em dessecador, no escuro, à temperatura ambiente, mas é necessário reaquecê-lo a 130°C, cada 2 dias.

Caso o florisil não tenha sido tratado previamente, coloque-o em uma cápsula de porcelana e aqueça em mufla a 650°C durante 2 horas. (A mufla deve ser ligada, no mínimo 2 horas antes, para que a temperatura seja adequadamente elevada). Coloque a cápsula de porcelana no fundo da mufla. Depois de 2 horas de ativação, transfira a cápsula para uma estufa a 130°C, até que a cápsula alcance a temperatura da estufa (cerca de 30 minutos). O florisil é então transferido para frascos de vidros e conservado como descrito acima.

Éter etílico — Transfira um volume adequado de éter etílico, isento de peróxidos, para um funil de separação e lave 2 vezes com uma quantidade de água igual à metade do volume do éter. Adicione ao éter lavado 100 ml de uma solução saturada de cloreto de sódio; agite e retire a camada aquosa de solução de NaCl. Transfira o éter para um frasco com rêsca esmerilhada, contendo um grande excesso de sulfato de sódio anidro. Agite vigorosamente o frasco durante 15 a 30 minutos para remover toda a água.

Separe para cada análise aproximadamente 50 ml do éter etílico acima preparado e adicione álcool etílico a 95% em quantidade necessária para obter uma solução álcool-éter contendo 2% de álcool v/v.

Éter a 6%

Dilua 12 ml da solução éter-álcool a 2% com éter de petróleo redestilado até o volume de 200 ml; adicione de 2 a 5 g de Na₂SO₄ anidro e agite bem.

Éter a 15%

Dilua 30 ml da solução éter-álcool a 2% com éter de petróleo redestilado até o volume de 200 ml; adicione de 2 a 5 g de Na₂SO₄ anidro e agite bem.

Prepare uma coluna com florisil usando uma coluna cromatográfica de vidro de 25 mm de diâmetro interno e 30 cm de altura, com rêsca de teflon e placa filtrante, de porosidade média. Adicione o florisil aos poucos, batendo de leve na coluna para haver sedimentação uniforme, até a coluna alcançar 10 cm de altura. Sobre o florisil, adicione sulfato de sódio anidro, granulado (não use em pó) até uma altura de 2,5 cm. Passe pela coluna 40 ml de éter de petróleo e coloque sob a coluna um frasco Erlenmeyer de 500 ml. Assim que o menisco superior alcançar a superfície do sulfato de sódio, transfira para a coluna os 5 ml de éter de petróleo contendo os pesticidas obtidos no processo anterior. A solução deve percolar através da coluna na velocidade de 5 ml por minuto. Lave o bequer com 2 porções de 5 ml de éter de petróleo. Lave, também, as paredes da coluna com pequenas porções de éter de petróleo. Quando o menisco superior alcançar a superfície do sulfato de sódio, comece a passar pela coluna 200 ml do éter a 6% na mesma velocidade de 5 ml/min. Quando as últimas porções do solvente alcançarem a superfície do sulfato de sódio, troque o frasco Erlenmeyer por outro e comece a passar pela coluna 200 ml do éter a 15%. Na fração A (éter a 6%) são eluídos os seguintes pesticidas clorados: aldrin, BHC, clorbenside, clordana, DDE, DDT, heptaclor, heptaclor epóxido, keltana, lindana, metoxiclor, pertana, strobana, TDE e toxafeno. Na fração B (éter a 15%) são eluídos: dieldrin, endrin e endosulfan I.

d) *Preparo da solução para ser injetada no cromatógrafo*

Transfira os 200 ml de éter a 6%, eluídos através da coluna, para um frasco de

evaporação Kuderna-Danish. Lave o frasco Erlenmeyer com 5 ml de éter a 6%. Adapte a coluna e coloque o conjunto em um banho de vapor, de maneira que, no mínimo, o terço inferior do frasco de ebulição fique mergulhado no vapor. (A evaporação deve ser feita em capela). Deixe evaporar até reduzir o volume a alguns ml. (Não evapore até a secagem). Retire o tubo receptor do aparelho Kuderna-Danish e complete a evaporação até a secagem sob uma leve corrente de nitrogênio ou ar sêco. Pare a evaporação assim que desaparecer a última gota do solvente (caso contrário haverá perda de pesticidas) e dissolva o resíduo, imediatamente, em 5 ml de benzeno p. a., redestilado.

Evapore a fração de éter a 15%, de maneira idêntica.

e) Cromatografia

Estas soluções foram injetadas em um cromatógrafo a gás da marca Varian, modelo

2.100, com detector de captura de elétrons. Foi utilizada uma coluna de vidro de 6 pés de comprimento e 1/4 de polegada de diâmetro interno com fase estacionária constituída por uma mistura de 2,5% de QF.1 e 2,5% de DC-200 em Aeropak. As condições de operação foram as seguintes: temperatura da coluna, 170°C; temperatura do injetador, 200°C; temperatura do detector, 200°C; gás de arraste, nitrogênio tipo U; fluxo, 30 ml/seg; sensibilidade, 4×10^{-9} .

Os pesticidas foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de padrões injetados e, ainda, pela adição do pesticida esperado às amostras. Os pesticidas foram dosados com o auxílio de uma curva preparada com pesticidas padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão reunidos nos quadros I e II e nas figuras 1 e 2.

QUADRO I

Teor de inseticidas clorados em leite consumido na cidade de São Paulo, 1970

| Amostra n.º | α BHC (ppm) | $\beta + \gamma$ BHC (ppm) | δ BHC (ppm) | BHC total (ppm) | Composto não identificado |
|-------------|--------------------|----------------------------|--------------------|-----------------|---------------------------|
| 1 | 0,044 | 0,007 | tr * | 0,051 | --- |
| 2 | 0,035 | 0,006 | tr | 0,041 | --- |
| 3 | 0,007 | 0,028 | 0,004 | 0,039 | a ** |
| 4 | 0,039 | 0,005 | tr | 0,044 | --- |
| 5 | 0,046 | 0,006 | tr | 0,052 | --- |
| 6 | 0,039 | 0,008 | tr | 0,047 | --- |
| 7 | 0,007 | 0,013 | 0,001 | 0,021 | --- |
| 8 | 0,003 | 0,019 | 0,005 | 0,027 | --- |
| 9 | 0,002 | 0,021 | 0,004 | 0,027 | --- |
| 10 | 0,001 | 0,021 | 0,004 | 0,026 | --- |
| 11 | 0,047 | 0,008 | --- | 0,055 | --- |
| 12 | 0,004 | 0,018 | 0,001 | 0,023 | --- |
| 13 | 0,002 | 0,011 | 0,004 | 0,017 | --- |
| 14 | 0,028 | 0,006 | 0,001 | 0,035 | --- |
| 15 | 0,006 | 0,006 | 0,001 | 0,013 | a |
| 16 | 0,006 | 0,001 | --- | 0,007 | --- |
| 17 | 0,025 | 0,004 | --- | 0,029 | --- |

* tr — Traços

** a — Composto com tempo de retenção de 31 min., na fração A.

QUADRO II

Teor* de inseticidas clorados em queijo tipo "parmeção", produzido no Estado de Minas Gerais, 1970.

| Amostra n.º | α BHC (ppm) | $\beta + \gamma$ BHC (ppm) | δ BHC (ppm) | BHC total (ppm) |
|-------------|--------------------|----------------------------|--------------------|-----------------|
| 1 | 0,430 | 1,350 | 0,200 | 1,980 |
| 2 | 0,115 | 0,145 | tr** | 0,260 |
| 3 | 0,960 | 0,295 | 0,500 | 1,755 |
| 4 | 1,300 | 0,395 | 0,650 | 2,345 |

* calculado na gordura do queijo.

** tr = traços.

Em tôdas as amostras analisadas foram encontrados os isômeros de BHC.

O BHC empregado como inseticida é constituído por uma mistura de isômeros em proporção variável, porém todos os produtos são padronizados de modo a conter 12 a 30% do gama isômero (lindana) que é o único isômero ativo com propriedades inseticidas. A partir dêste BHC técnico é que são preparadas as formulações e diluições.

A coluna utilizada no cromatógrafo a gás não permitiu a separação dos isômeros beta e gama, porque êstes isômeros apresentam os mesmos tempos de retenção.

Comparando os teores encontrados para os diferentes isômeros do BHC, observamos que o delta-BHC sempre apareceu em pequenas quantidades, variando de traços ou não aparecimento a 0,005 ppm.

Ao contrário, o isômero alfa-BHC foi encontrado em níveis bem maiores, variando de 0,001 a 0,046 ppm, sendo que em 8 amostras o teor encontrado foi acima de 0,025 ppm.

Lindana, ou melhor, a soma dos isômeros beta e gama variou de 0,001 a 0,028 ppm.

Quanto ao BHC total, isto é, a soma das quantidades encontradas para cada isômero, o teor variou de 0,007 a 0,055 ppm, sendo que as amostras de leite de marca x, correspondente às 6 primeiras amostras do quadro I, apresentaram um teor mais elevado de BHC em relação às outras 3 marcas de leite analisadas.

Nas amostras n.ºs 3 e 15 apareceu na fração A (éter a 6%) um pico com o tempo de retenção de 31 minutos, que não foi pos-

sível identificar por não corresponder a nenhum dos seguintes padrões disponíveis: α -clordana, γ -clordana, heptaclor, heptaclor epóxido, aldrin, DDT.

Na fração B (éter a 15%) de 2 amostras foi encontrado um pico amplo, com um tempo de retenção de 30 minutos. Devido à magnitude do pico, essas frações foram evaporadas e os resíduos foram identificados por espectrofotometria no infra-vermelho, como sendo lipídios. Tal ocorrência pode acontecer quando há transferência de alguma porção de gordura por ocasião da extração dos pesticidas.

As 4 amostras de queijo tipo "parmeção" revelaram a presença dos isômeros alfa, beta + gama e delta-BHC; não foram encontrados outros pesticidas. Essas amostras de queijo foram analisadas em março de 1970 e correspondem, portanto, a queijos preparados com leite produzido alguns meses antes; é de interesse, por isso, salientar que a presença de BHC em leite está sendo constante e vem de longa data.

RUZICKA *et alii*¹⁰, na Grã-Bretanha, desquisaram resíduos de pesticidas organoclorados em diversos alimentos e, em 18 amostras de leite, acharam os seguintes teores de BHC: alfa-BHC, de 0,0009 a 0,0068 ppm; beta-BHC, de 0,0005 a 0,0035 ppm e gama-BHC, de 0,0007 a 0,0024 ppm, valores êstes bem menores do que os teores por nós encontrados.

DUGGAN⁴ realizou, nos Estados Unidos, um levantamento de resíduos de pesticidas clorados em leite, nos anos de 1964, 1965 e 1966 e encontrou uma média de 0,007 ppm para BHC total e de 0,004 ppm para lindana.

Estes teores encontrados são significativamente menores que os valores por nós referidos.

KAWAR *et alii*⁶, no Líbano, aplicaram BHC em vacas leiteiras para controle de ectoparasitas e, 3 semanas após a pulverização, encontraram de 0,006 a 0,016 ppm de BHC

total no leite desses animais. Os valores mínimos por nós obtidos são comparáveis ao mínimo citado; entretanto, os valores máximos por nós encontrados são cerca de 3,5 vezes maiores do que os referidos por Kawar *et alii*.

DICKES & NICHOLAS⁸, em 1968 pesquisaram, na Inglaterra, diferentes pesticidas em vários alimentos e, em 17 amostras de leite, não encontraram resíduos de gama-BHC (lindana); não fazem menção aos outros isômeros do BHC.

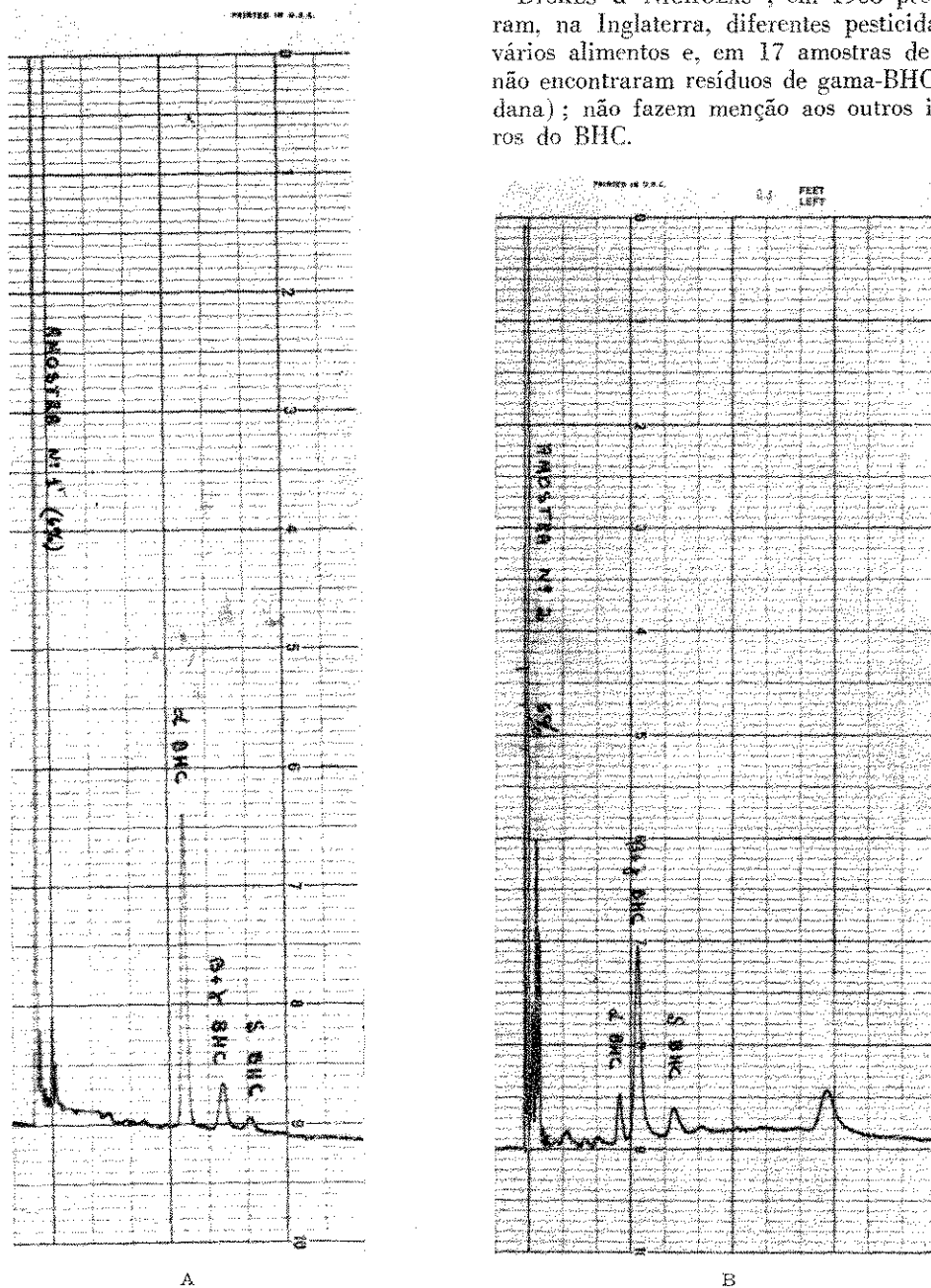


Fig. 1 — Cromatogramas de pesticidas clorados presentes em leite (São Paulo — 1970).
A — Amostra com alto teor de alfa-BHC.
B — Amostra com alto teor de beta+gama-BHC, apresentando também um pico não identificado.

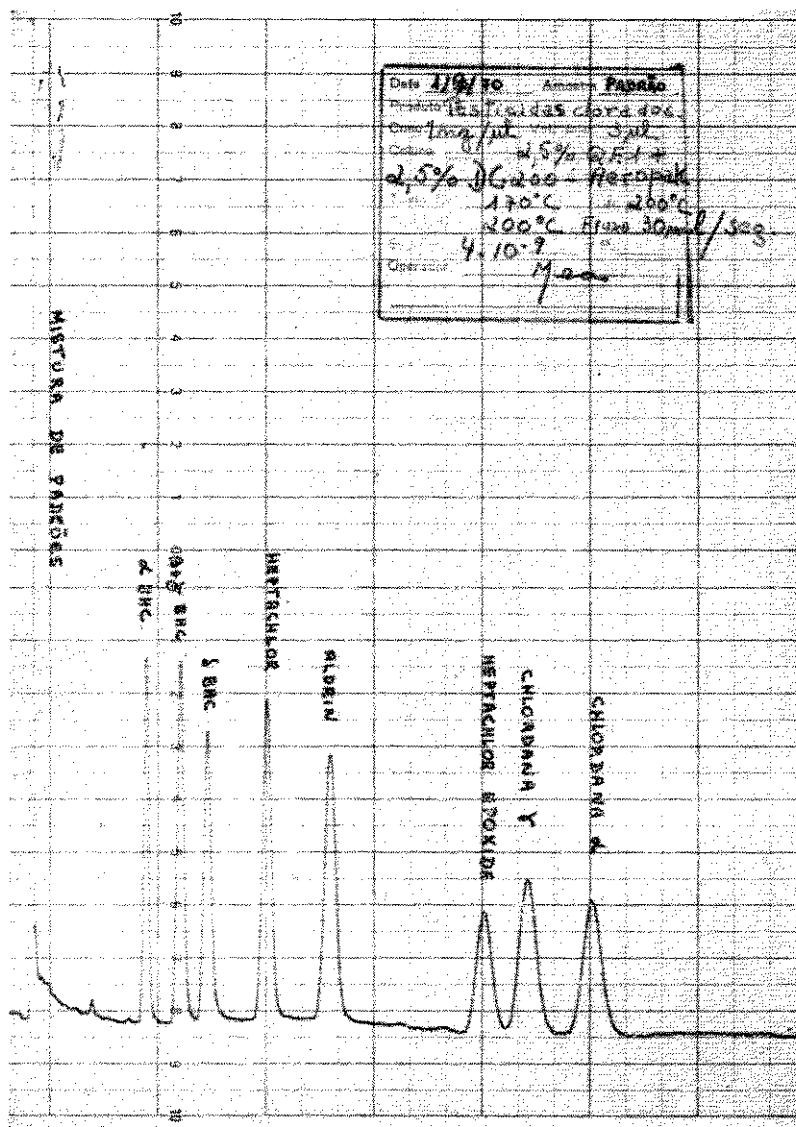


Fig. 2 — Cromatograma de mistura de alguns pesticidas padrões.

CONCLUSÃO

Os teores máximos de BHC por nós obtidos são bem mais elevados do que os referidos na literatura ao nosso alcance; isto indica um grau de contaminação do produto bem maior do que nas regiões citadas.

A legislação brasileira específica para tolerância de resíduos de pesticidas em alimentos ¹ não permite resíduos de BHC em leite e seus derivados.

Entretanto, queremos lembrar que a Comissão de Resíduos de Pesticidas da FAO/

OMS ² aprovou, em 1968, tolerâncias de 0,004 ppm de lindana para o leite e 0,1 ppm para derivados do leite, calculado, neste último caso, no conteúdo de gordura. A referida Comissão não propôs nenhuma tolerância para os demais isômeros do BHC, em virtude da grande variabilidade dos estereoisômeros na composição do produto técnico, não sendo portanto possível a determinação de uma dose diária aceitável para homem.

Face aos resultados encontrados, todo o leite consumido em São Paulo, quanto a resíduos de BHC, está contaminado e em de-

sacôrdo com a legislação vigente¹. O problema, agora, embora pertença à Saúde Pública não é de resolução fácil nem imediata, pois seria impraticável e impossível uma condenação em massa do leite exposto à venda. Necessariamente, questão de tal gravidade e importância tem que ser enfrentada e resolvida com o entrosamento entre organismos da Saúde e da Agricultura, no sentido de uma fiscalização enérgica para a aplicação correta dos pesticidas na lavoura, a fim de ser evitada a contaminação de pastagens, forragens e grãos destinados à alimentação do gado, como também de um controle severo quanto à pulverização e aplicações tópicas com BHC em vacas leiteiras.

RESUMO

Com a finalidade de avaliar o grau de contaminação do leite consumido na cidade de São Paulo, quanto a resíduos de pesticidas organoclorados, foram analisadas amostras de leite de diversas marcas.

Os pesticidas foram extraídos da gordura do leite de acôrdo com a técnica de Mills e depois identificados e dosados por cromatografia em fase gasosa, em aparelho com detector de captura de eletrons.

Em tôdas as amostras analisadas foram encontrados lindana e demais isômeros do BHC. O teor total de BHC variou de 0,007 a 0,055 ppm e os diferentes isômeros: alfa-BHC, de 0,001 a 0,047 ppm; beta mais gama-BHC, de 0,001 a 0,028 ppm; delta-BHC, de 0,000 a 0,005 ppm.

Foram também analisadas 4 amostras de queijo com os resultados: alfa-BHC, de 0,115 a 1,300 ppm; beta + gama-BHC, de 0,145 a 1,350 ppm; delta-BHC, de traços a 0,650 ppm, teores calculados na gordura.

Em decorrência dos resultados obtidos, destaca-se a urgência de um entrosamento entre os serviços de Saúde Pública e da Agricultura, no sentido de uma aplicação adequada e correta de pesticidas a fim de se evitar contaminação não intencional de alimentos tais como carne, leite e derivados do leite.

Agradecimentos — Agradecemos à Sra. Mickiko Y. Takahashi a valiosa colaboração na parte de extração dos pesticidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRASIL. Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos. Resolução n.º 23/66. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, ano 105(36): 2193, 22 fev. 1967.
2. BURCHFIELD, H. P.; DONALD, J. E. & STORRS, E. S. — Guide to the analysis of pesticide residues. 2. ed. Washington, D.C., U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1965. v. 1, p. IIA.4.b.(1); IIB.1.a.(1); IIC.2.b.(1); IVA.2.a.(1).
3. DICKES, G. J. & NICHOLAS, P. V. — A survey of selected foodstuffs for certain pesticide residues. *J. Ass. Publ. Analysts* 7:14-21, 1969.
4. DUGGAN, R. E. — Chlorinated pesticide residues in fluid milk and other dairy products in the United States. *Pestic. Monit. J.* 1:2-8, 1967.
5. EDWARDS, C. A. — Inseticide residues in soils. *Residue Rev.*, 13:83-132, 1966.
6. KAWAR, N. S.; BOSTANIAN, N. J. & BADAWEI, S. M. — Inseticide residues in milk of dairy cows treated for control of ectoparasites. *J. Dairy Sci.* 51: 1023-5, 1968.
7. MILLS, P. A. — Collaborative study of certain chlorinated organic pesticides in dairy products. *J. Ass. Off. Agric. Chem.* 44:171-7, 1961.
8. ONLEY, H. J. — Rapid method for chlorinated pesticide residues in fluid milk. *J. Ass. Off. Agric. Chem.* 47:317-21, 1964.
9. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE — Résidus de pesticides dans les produits alimentaires. Rapport de la réunion conjointe FAO/OMS tenue en 1968. Genève, O.M.S., 1969. Sér. Rapp. Tech. no. 417.
10. RUZICKA, J. H. A.; SIMMONS, J. H. & TATTON, J. O'G. — Pesticide residues in foodstuffs in Great Britain. IV. Organochlorine pesticide residues in welfare foods. *J. Sci. Fd. Agric.* 18:579-82, 1967.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIOVÍRUS EM SÃO PAULO DE 1967 A 1970 ⁽¹⁾

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF POLIOVIRUS IN SAO PAULO, BRAZIL
FROM 1967 TO 1970

JOSÉ PAULO GONZAGA DE LACERDA ⁽²⁾
ELZA FRANCO DE LIMA VIEIRA ⁽²⁾
BIENVENIDO SÁEZ MARTÍN ⁽²⁾
LÚCIA SOUTO GIUSTI ⁽²⁾

S U M M A R Y

Results of isolation and identification of poliovirus from stools, oral swab and spinal fluid in 800 cases are related.

We worked with HeLa and AV₃ cells using the Lepine's concentration technique.

Four hundred ninety cases resulted positive: 379 for Poliovirus I, 35 for poliovirus II, and 76 for Poliovirus III.

I N T R O D U Ç Ã O

Em nossos trabalhos durante os anos de 1967 a 1970 tivemos a oportunidade de isolar e identificar poliovírus de pacientes com suspeita clínica de poliomielite de diferentes unidades assistenciais da Cidade de S. Paulo e de alguns materiais enviados de outras cidades do interior. Também, em material de crianças com menos de 1 mês de idade, apresentando distúrbios intestinais mas sem paralisia, foram pesquisados poliovírus nas fezes e em material de garganta.

Não podendo contar com culturas celulares primárias de rim de macaco rhesus conforme descrevem WALLIS, LEWIS & MELNICK ⁷ e culturas primárias de âmniom humanos segundo ZITCER ⁹, utilizamos somente células de linhagem contínua para isolamento e identificação dos vírus.

Usamos HeLa e AV₃ com pequenas modificações nas inoculações e passagens do material para fazer frente a menor sensibilidade das células. Com estas modificações passamos a isolar vírus de 85 a 90% dos casos.

Durante essas pesquisas pudemos constatar que na maioria dos casos os vírus foram mais facilmente isolados em HeLa do que em AV₃, quando procedíamos à inoculação simultânea nas duas linhagens de células.

M A T E R I A L E M E T O D O S

Utilizamos para o isolamento de vírus fezes colhidas em latas para exame parasitológico ou de "swab" retal. Na maior parte dos casos foram colhidas duas amostras de material com 24 ou 48 horas de intervalo. O material de garganta foi colhido em "swabs" por ser mais fácil. O líquido céfalo-raquidiano, colhido em tubo estéril, sendo levado ao laboratório em seguida.

O material proveniente da Capital foi coletado em "swab" e levado ao laboratório a temperatura ambiente pois o tempo de transporte foi curto. Já o material proveniente de outras localidades com transporte demorado veio acondicionado em latas seladas com esparadrapo e transportado sob refrigeração com gelo comum.

(1) Trabalho realizado na Seção de Vírus Respiratórios e Entéricos do Instituto Adolfo Lutz. Patrocinado pelo Fundo de Pesquisas do I.A.L.

(2) Da Seção de Vírus Respiratórios e Entéricos do I.A.L.

1. Preparo de inóculo de "swab"

O material recebido ficou congelado a -70°C até o momento da manipulação. Uma vez descongelado, o algodão foi espremido contra a parede do tubo para extração do material e então, adicionados 8 ml de meio de Hanks, pH 7,4, para lavar o algodão.

2. Preparo de inóculo de fezes

Preparamos uma emulsão a 20% p/v* do material em meio de Hanks. Aproximadamente 4 g de fezes foram colocadas em gral estéril e trituradas, adicionando-se pequenas quantidades de meio para facilitar a emulsão e depois o resto do meio completando o volume para 20 ml.

3. Centrifugação dos inóculos

Centrifugamos em centrífuga refrigerada a 4°C por 1 hora e a 12 000 g (10 000 r.p.m.). Assim eliminamos as bactérias e substâncias tóxicas para as células. O sobrenadante foi cuidadosamente separado para não resuspendar o sedimento e transferido para frascos apropriados para estocagem e tratado com antibióticos na quantidade de 2 000 unidades de penicilina, 1 000 mg de estreptomomicina e 2,5 mg de Fungison por ml de líquido.

4. Inoculação em células

Passamos a utilizar inoculação de volumes maiores por tubo conforme descreve LEPINE⁴ para concentração de vírus, com a finalidade de suprir a menor sensibilidade das células por nós utilizadas em relação às culturas primárias.

Nas inoculações iniciais e mesmo nas primeiras passagens inoculamos de 0,3 até 0,7 ml de material por tubo de célula em vez de 0,2 ml recomendado na maioria das técnicas virológicas.

Cada material foi inoculado em dois tubos de células HeLa e dois de AV₃ previamente lavados com salina para retirar o meio de crescimento e adicionado de 1 ml de meio de Hanks com hidrolizado de lactoalbumina, extrato de levedura e triptose fosfato.

Preferimos para o isolamento utilizar meio sem soro, pois conforme descrevem vários autores — BARTELL & KLEIN², ALLEN, FIN-

KELSTEIN & SULKIN¹ e SMULL & LUDWIG⁶, o soro de bovinos e de outros animais podem conter inibidores para vírus que impedem o isolamento.

O líquido céfalo-raquidiano foi inoculado em células nas mesmas quantidades empregadas para os inóculos de fezes, de "swab" ou de material de garantia, isto é, 0,3 a 0,7 ml por tubo. Para este tipo de material fizemos passagens adicionais, chegando a 4 ou 5 passagens cegas para conseguir isolamento de vírus.

Os vírus isolados foram titulados e tipados nas mesmas linhagens de células nas quais o isolamento foi conseguido. Fizemos a soro-neutralização com soros imunes para pólio tipos I, II e III contendo 20 unidades neutralizantes para 100 DCT₅₀/0,1 ml. Incluímos nas identificações uma mistura dos três tipos de soro para determinar possíveis misturas de tipos diferentes de vírus.

5. Sorologia

Realizamos na maioria dos casos, em duas amostras de soro, uma primeira colhida o mais cedo possível em relação ao início da doença, e uma segunda, de 10 a 15 dias após a primeira amostra.

O soro foi diluído em solução de Hanks de 1:3 a 1:1024 e, a um volume de soro nestas diluições, distribuído em 3 séries de tubos, colocamos volume idêntico de vírus dos tipos I, II e III com 100 DCT₅₀/0,1 ml em cada uma das séries respectivamente. Esta mistura permaneceu em estufa a 37°C , 4 horas, e depois uma noite em geladeira antes de ser inoculada em tubos de células.

RESULTADOS

Observando os dados obtidos constatamos que a partir de outubro de 1967 passamos a isolar poliovírus tipo I todos os meses. No final do ano seguinte tivemos uma ascensão no número de identificações de pólio I que atingiu o maior valor em janeiro e abril de 1969. De 1968 para cá, o isolamento de poliovírus tipo II diminuiu sensivelmente e o de poliovírus tipo III teve ligeiro aumento no ano de 1969, declinando em seguida.

Entre nós, o número de isolamento de poliovírus do tipo I sempre foi bem maior que o dos outros dois tipos; isto pode ser comparado, em porcentagem, no quadro I:

* p/v = peso em volume.

QUADRO I

Porcentagem dos três tipos de poliovírus isolados

| Pólio tipo | 1967 % | 1968 % | 1969 % | 1970 % |
|------------|--------|--------|--------|--------|
| I | 37,5 | 70,6 | 78,2 | 88,2 |
| II | 37,5 | 15,2 | 3,3 | 1,4 |
| III | 25,0 | 14,2 | 18,5 | 10,4 |

No início de 1969 tivemos o maior índice de isolamento em relação ao total de casos pesquisados, atingindo nos quatro primeiros meses 84%, 86%, 83% e 88% de casos positivos.

O número total de casos pesquisados e o número de casos positivos, nos diferentes meses do ano, estão relacionados no quadro II.

QUADRO II

Número de poliovírus isolados nos diferentes meses

| | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 |
|--------|--------|---------|---------|---------|
| Jan | 0/2 | 0/11 | 26/31 | 2/4 |
| Fev | 1/4 | 5/21 | 26/30 | 7/13 |
| Mar | 1/3 | 3/14 | 24/29 | 5/7 |
| Abr | 2/4 | 14/23 | 30/34 | 4/10 |
| Mai | 1/2 | 4/11 | 20/25 | 10/21 |
| Jun | 0/6 | 9/12 | 21/35 | 11/17 |
| Jul | 5/16 | 6/8 | 14/15 | 6/8 |
| Ago | 3/21 | 6/11 | 14/20 | 6/13 |
| Set | 3/15 | 10/17 | 10/16 | 11/18 |
| Out | 2/9 | 21/30 | 13/23 | 10/12 |
| Nov | 4/18 | 15/20 | 7/14 | 30/38 |
| Dez | 2/4 | 19/26 | 5/12 | 31/37 |
| Totais | 24/104 | 112/204 | 210/284 | 144/208 |

O numerador representa os casos positivos e o denominador, o total de casos pesquisados.

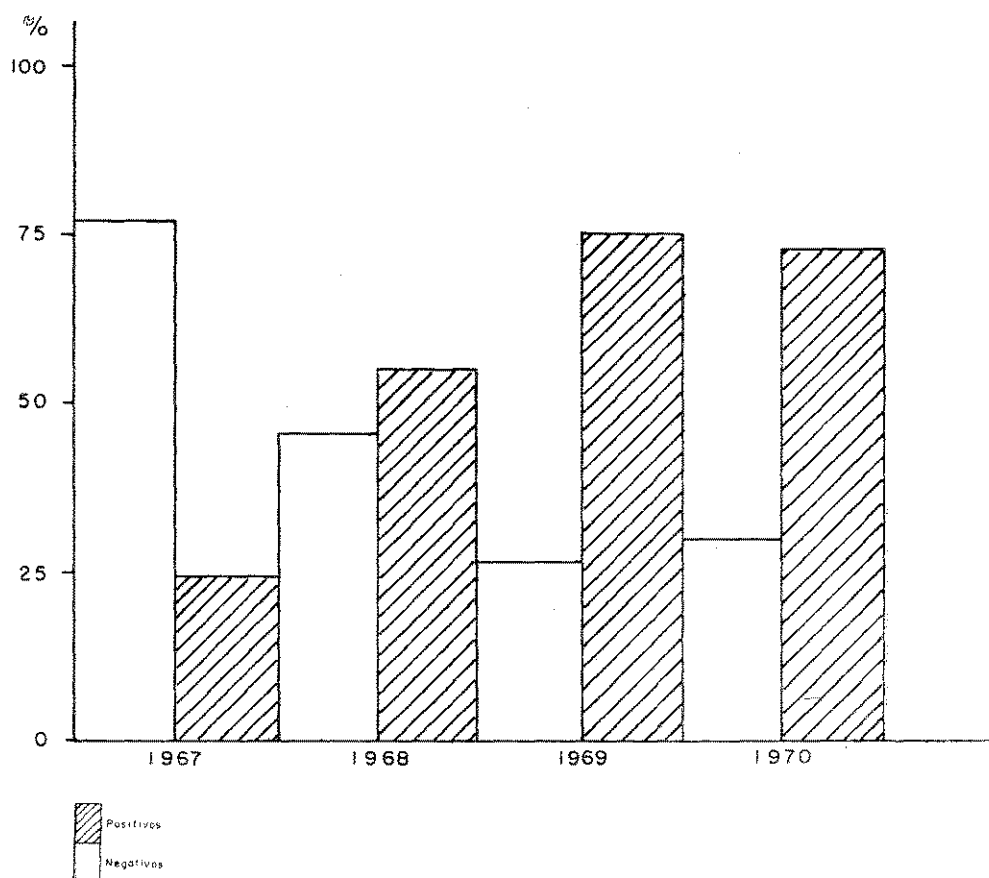
QUADRO III

Número de amostras de poliovírus I, II e III isoladas

| Ano | 1967 | | | 1968 | | | 1969 | | | 1970 | | | |
|--------|------|---|----|------|----|----|------|-----|----|------|-----|----|-----|
| | Tipo | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| Meses | | | | | | | | | | | | | |
| Jan | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| Fev | | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 | 20 | 0 | 6 | 2 | 0 | 5 |
| Mar | | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 16 | 0 | 8 | 5 | 0 | 0 |
| Abr | | 0 | 2 | 0 | 3 | 8 | 3 | 26 | 2 | 2 | 3 | 0 | 1 |
| Mai | | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 16 | 0 | 4 | 10 | 0 | 0 |
| Jun | | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 | 2 | 17 | 1 | 3 | 10 | 0 | 1 |
| Jul | | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 10 | 1 | 3 | 5 | 1 | 0 |
| Ago | | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | 9 | 1 | 1 | 6 | 0 | 0 |
| Set | | 0 | 0 | 3 | 9 | 0 | 1 | 5 | 2 | 3 | 9 | 0 | 2 |
| Out | | 1 | 1 | 0 | 17 | 1 | 3 | 8 | 0 | 5 | 9 | 0 | 1 |
| Nov | | 2 | 1 | 1 | 13 | 1 | 1 | 6 | 0 | 1 | 27 | 0 | 3 |
| Dez | | 1 | 1 | 0 | 17 | 0 | 2 | 5 | 0 | 0 | 29 | 1 | 1 |
| Totais | | 9 | 9 | 6 | 79 | 17 | 16 | 164 | 7 | 39 | 127 | 2 | 15 |

No Quadro III apresentamos o número de amostras isoladas de cada tipo de vírus, onde notamos logo a maior quantidade de identificações de poliovírus tipo I a que já nos referimos.

Dos 800 casos examinados foram colhidas 126 amostras de material de garganta, com o isolamento de 10 amostras de poliovírus tipo I, uma do tipo II e 8 do tipo III. Em 3 casos isolamos o mesmo tipo de vírus de



fezes e de material de garganta. Em 8 casos em que isolamos vírus só de orofaringe, as crianças tinham menos de um mês e nos outros 8 casos positivos pesquisamos o vírus apenas em orofaringe.

Examinamos 47 amostras de líquido céfalo-raquidiano e isolamos 7 amostras de vírus; de poliovírus tipo I, encontramos 6 amostras e, do tipo III, uma amostra.

Fizemos a sêro-neutralização em aproximadamente 85% dos casos e, na maioria, o título já era alto na primeira amostra e não houve alteração na 2.^a amostra. Em 20% dos casos encontramos aumento de título para o tipo de vírus isolado e em raros casos constatamos o aumento de título sem conseguir isolamento das fezes.

DISCUSSÃO

No início de nossos trabalhos em enterovírus, verificamos que o índice de isolamento

de poliovírus de casos com paralisia era inferior ao descrito na literatura WENNER⁸ e CHADWICK⁹.

Tentando reparar esta falha empregamos técnica de concentração do material LEPINE⁴ e MELNICK⁵, para obter maior número de partículas virais por volume de inóculo.

Inoculando de 0,3 a 0,7 ml por tubo, o efeito tóxico foi mínimo não sendo preciso troca de meio de manutenção, facilitando o trabalho. Com o uso desta técnica obtivemos isolamento de 88% dos casos pesquisados, mesmo utilizando células de linhagem contínua para o isolamento de vírus. Outras técnicas de concentração foram por nós experimentadas porém logo abandonadas devido ao maior número de manobras e dificuldades de operação.

Durante estas pesquisas, os vírus foram isolados de material fecal e somente de raros casos de material de garganta. De algumas crianças com poucos dias de idade

(de 10 a 35 dias) foram isolados poliovírus da garganta, mas sem a confirmação sorológica; de adultos, obtivemos isolamento de vírus e a confirmação sorológica correspondente.

Chamamos a atenção para o fato de, nos casos positivos para poliovírus encontramos predominância acentuada para o tipo I (Quadro I). Na sorologia também este fato é notado pois, em muitos casos, encontramos título igual a 1024 para pólio tipo I e títulos de 8 ou 16 para os outros dois tipos, em crianças não vacinadas. Com títulos mais elevados, variando até 128 em crianças de maior idade e com uma ou duas doses de vacina. Títulos de anticorpos maiores são encontrados nos adultos e em algumas crianças.

Nos casos estudados, não caberia fazer um estudo dos níveis de anticorpos encontrados e dos grupos etários, pelo fato de serem as amostras colhidas na fase aguda e em períodos diversos do início da doença, podendo acarretar uma idéia errônea do estado imunitário.

RESUMO

Foram apresentados resultados obtidos no isolamento de poliovírus em fezes, líquido céfalo-raquidiano e material de garganta de pacientes suspeitos de poliomielite. Foram examinados materiais de 800 pessoas, com a idade variando de 10 dias até 70 anos, provenientes, na maioria dos casos, de pacientes hospitalizados.

De 490 pacientes foram isoladas amostras de poliovírus assim distribuídas: 379 de poliovírus tipo I, 35 de poliovírus tipo II e 76 de poliovírus tipo III.

A sorologia por neutralização em culturas celulares foi realizada para confirmação pelo aumento do título de anticorpos, e tipo de vírus isolado.

Agradecimentos — Agradecemos a cooperação da Dra. Clélia Helena O. Martinez e auxiliares da Seção de Culturas celulares do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, pelos tubos de células fornecidos o que permitiu a realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, R.; FINKELTEIN, R. A. & SULKIN, S. E. — Viral inhibitors in normal animal sera. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 16:472-8, 1958.
2. BARTELL, D. & KLEIN, M. — Neutralizing antibody to viruses of poliomyelitis in sera of domestic animal. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90:597-601, 1955.
3. CHADWICK, D. L.; WELSH, H. H. & LENNETTE, E. H. — Comparison of the sensitivity of mammalian cell types for the isolation of poliomyelitis viruses from man. *J. Lab. Clin. Med.*, 54:409-16, 1959.
4. LÉPINE, P. & MAURIN, J. — *Techniques de laboratoire en virologie humaine: isolements, identification, serologie, diagnostique*. Paris, Masson, 1964. p. 499.
5. MELNICK, J. L.; WENNER, H. A. & ROSEN, L. — *The enteroviruses*. In: LENNETTE, E. H., *Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases*. 3ed. New York, N.Y., A.P.H.A., 1964. p. 217.
6. SMULL, C. E. & LUDVIG, E. H. — Delay of poliovirus plaque formation with use of fresh bovine serum in the growth medium of host cells. *App. Microbiol.*, 17:449-53, 1969.
7. WALLIS, C.; LEWIS, R. T. & MELNICK, J. L. — Preparation of kidney cell cultures. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 19:194-7, 1961.
8. WENNER, H. A. & MILLER, C. A. — Comparison of methods for recovering poliomyelitis virus from human sources. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86:11-5, 1954.
9. ZITCER, E. M.; FOGH, J. & DUNNEBACKE, T. H. — Human amnion cells for large-scale production of polio virus. *Science*, N.Y., 122:30, 1955.

Recebido para publicação em 30 de junho de 1971.

INCIDÊNCIA DE REAGENTES À PROVA DA IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE ENTRE DOADORES DE SANGUE EM SÃO PAULO ⁽¹⁾

THE INCIDENCE OF REAGENTS TO INDIRECT IMMUNOFLOURESCENCE TEST
FOR DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS AMONG BLOOD DONORS
IN SÃO PAULO, BRAZIL

SABURO HYAKUTAKE ⁽²⁾
MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA ⁽²⁾

SUMMARY

The authors checked through the indirect immunofluorescence test for diagnosis of toxoplasmosis, samples of 270 blood donors from different blood banks in São Paulo, to obtain source of "accessory factor". They verified high incidence of reagents, mainly when compared with previous findings obtained by Nussenzweig in 1957 in our environment, who found 28,74% of incidence of non reagents in blood donors, while in this paper is reported only 4,08% of non reagents, so as the incidence of high titers was greater.

Critical and comparative studies with similar investigations done in Roma, São Paulo and Belo Horizonte, were made.

INTRODUÇÃO

Ao coletarmos amostras de sangue de 270 doadores assim considerados por diferentes "Bancos de sangue", não era nossa intenção fazer o levantamento do número de reagentes para detecção de anticorpos anti-toxoplasma mas sim a de selecionar um grupo de doadores considerados como não reagentes para dentre eles conseguir fontes de "fator acessório". Este intento não foi logrado pois dentre os não reagentes nem um só apresentou o referido fator.

Impressionados pela alta incidência de reagentes, máxime em se comparando com os resultados previamente obtidos, em nosso meio, em doadores de sangue do Hospital da Clínicas, por NUSSENZWEIG ⁶, pareceu-nos de bom alvitre publicar os dados que obtivemos atribuindo-lhes sobretudo o caráter ilustrativo das incidências de anticorpos anti-toxoplasma entre doadores de sangue em nosso meio. A propósito deve ser referido o achado de AMATO NETO et. al. ¹ que isolaram *Toxo-*

plasma gondii do sangue de doador do Hospital das Clínicas de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de sangue foi retirada por punção venosa; separado o soro, era o mesmo submetido à prova da imunofluorescência indireta para o diagnóstico de toxoplasmose de acôrco com a técnica descrita por CAMARGO ⁸ ligeiramente modificada por Hyakutake. Segundo a experiência deste autor, os resultados obtidos na prova de imunofluorescência indireta são superponíveis, até cerca de 98%, àqueles da prova de Sabin-Feldman. As modificações introduzidas por Hyakutake na técnica da reação são as seguintes:

1) Com referência ao tempo da reação antígeno-anticorpo, preferimos incubar as lâminas da reação durante meia hora à temperatura de 37°C dentro da câmara úmida, em vez de uma hora a 37°C.

(1) Trabalho apresentado ao 18.º Congresso Brasileiro de Higiene, São Paulo, S.P., de 26 a 31 de outubro de 1970.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

2) A observação da lâmina no microscópio de fluorescência é feita através de tubo monocular, pois o binocular acarretaria 40% de redução da luminosidade da imagem.

3) Na preparação de antígeno, em vez de usar a centrifugação diferenciada, isto é, o uso de baixa rotação para sedimentar os leucócitos (GOLDMAN⁴), antes de formulação do antígeno, rompemos os leucócitos utilizando uma seringa munida de agulha BD n.º 3 ou n.º 4 (US n.º 27 ou 30), com a qual praticamos a expulsão e aspiração do exsudato, repetindo de 10 a 15 vezes a manobra.

4) Para a titulação do conjugado escolhemos um soro reagente padrão, ou melhor, um soro reagente de título estável conhecido

obtido através da reação de Sabin-Feldman, como por exemplo um soro de título 1:1024. Com este soro fazemos as diluições sucessivas a partir de 1:16, obtendo assim as diluições de 1:512, 1:1024 e 1:2048 distribuídas cada uma delas em uma lâmina quadriculada e incubamos meia hora a 37°C. Em seguida, preparamos as diluições sucessivas do conjugado a testar, isto é, as diluições de 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024 e distribuímos sobre as três lâminas das diluições mencionadas do soro padrão. Feita a leitura elegemos como título do conjugado aquela diluição que apresenta fluorescência de média intensidade (+ +).

O quadro abaixo ilustra uma titulação em que o título do conjugado foi de 1:128.

| Conj. \ Soro | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 |
|--------------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|
| 1:512 | ++++ | ++++ | +++ | ++ | + | neg. | neg. |
| 1:1024 | ++++ | ++++ | +++ | ++ | + | + | neg. |
| 1:2048 | + | + | neg. | neg. | neg. | neg. | neg. |

RESULTADOS, DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

No quadro I estão discriminados os dados obtidos entre duzentos e setenta doadores de dois Bancos de Sangue particulares, de acordo com a idade e de acordo com o título alcançado.

A comparação do quadro I do nosso trabalho, com o quadro de NUSSENZWEIG⁶, mostra de início uma incidência de reagentes a títulos considerados elevados muito maior em nosso inquérito. Com efeito, ao título de 1:1024 obtivemos 34% de reagente enquanto que Nussenzweig obteve apenas 3,29%; este autor obteve apenas 0,29% de incidência para título maior de 1:4096 (um caso a 1:16.384), enquanto obtivemos 21,8% ao título de 1:8000 e 0,7% a 1:16.384.

No quadro I figuram na segunda coluna os títulos menores de 1:256 que discrimina-

mos com maior detalhe no quadro II a fim de tornar possível a comparação com os dados de Nussenzweig.

Enquanto Nussenzweig obteve em nosso meio em 1957 a incidência de 28,74% de não reagentes na mesma categoria de pacientes examinados ou seja, doadores de sangue, encontramos apenas 4,08% em nosso material examinado em 1969. Como aquele autor não utilizou a diluição 1:32 passando de 1:16 para 1:64, onde encontrou a incidência de 30,13%, computamos neste título aqueles casos que se mostraram reagentes a 1:32, resultando pois sob aquela cifra o número de 33 casos correspondendo a 12,2%. Finalmente, ao título de 1:256 Nussenzweig obteve 13,47% de reagentes enquanto nossos resultados alcançaram 11,8%, para o mesmo título.

É discutível o critério de positividade ou melhor, de reagência para esta ou aquela

QUADRO I

| Grupo etário | Número examinado | Títulos da imunofluorescência indireta | | | | | | |
|--------------|------------------|--|---------|-------|---------|---------|---------|----------|
| | | Não re-agente | < 1:256 | 1:256 | 1:1 024 | 1:4 000 | 1:8 000 | 1:16 000 |
| 18 a 30 | 175 | 9 | 27 | 21 | 55 | 43 | 18 | 2 |
| 31 a 40 | 68 | 2 | 16 | 6 | 27 | 11 | 6 | 0 |
| 41 a 50 | 16 | 0 | 5 | 2 | 5 | 3 | 1 | 0 |
| > de 51 | 11 | 0 | 0 | 3 | 5 | 2 | 1 | 0 |
| Total | 270 | 11 | 48 | 32 | 92 | 59 | 26 | 2 |
| Porcentagem | 100 | 4 | 17,7 | 11,8 | 34 | 21,8 | 9,6 | 0,7 |

QUADRO II

Discriminação dos casos de título menor que 1:256.

| Grupo etário | Número examinado | Títulos obtidos em 59 casos | | | |
|--------------|------------------|-----------------------------|------|------|------|
| | | Negativos | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| 18 a 30 | 36 | 9 | 11 | 10 | 6 |
| 31 a 40 | 18 | 2 | 3 | 6 | 7 |
| 41 a 50 | 5 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 51 a 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 59 | 11 | 15 | 17 | 16 |

diluição; em outras palavras, é muito variável para os diferentes autores de diferentes países o critério de positividade ou de delimitação destas categorias de dados:

- 1 — aqueles considerados não reagentes ou absolutamente negativos;
- 2 — aqueles considerados reagentes cuja significação seria a de uma cicatriz imunológica;
- 3 — aqueles reagentes cujos títulos traduziriam doenças em atividade, particu-

larmente quando disponíveis duas ou mais amostras colhidas em períodos de tempo variáveis.

Quaisquer que sejam os critérios adotados para individualizar títulos significativos críticos, fica evidente que houve radical mudança em nosso meio na categoria de doadores de sangue. Com efeito houve aumento indiscutível no número de reagentes dentro das diferentes parcelas definidas pelos títulos utilizados no levantamento por nós efetuado em 1969, quando comparados com os resultados de Nussenzweig efetuados em 1957

dentro da mesma categoria por assim dizer profissional.

Para fins comparativos, podemos utilizar os dados da Tabela 2 de JAMRA⁵, que efetuou um inquérito sobre toxoplasmose entre moradores de uma área da cidade de São Paulo (1961-62) considerando-se apenas os dados correspondentes aos grupos etários de mais de 20 anos: dentre 209 soros de pessoas examinadas foram encontrados 173 com título de Sabin-Feldman igual ou maior que 1:16, ou seja aproximadamente uma incidência percentual de 82,7 na amostra considerada.

Em Roma, ZARDI et al.⁷ encontraram 33,15% (250 casos) de reagentes dentre 754 doadores de sangue e 56,2 de reagentes dentre não doadores, o que parece demonstrar que em Roma, em face dos exames médicos de critérios rígidos para os doadores de sangue, ocorre seleção de rigidez física. Em nosso meio, dentro do critério comparativo, ocorre cerca de 96% de positividade explicável quer pelo baixo nível econômico-social dos doadores examinados quer pela inoperante ou inexistente seleção médica prévia, que deveria ser aplicada como mínimo de garantia exigível.

Quando já estava redigido este artigo, tomamos conhecimento do trabalho de ARAUJO² no qual expõe os resultados das reações de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta em 729 amostras de soro provenientes de doadores de sangue em Belo Horizonte. Em todos os testes, considerando a diluição do soro de 1:16 ou mais como título indicativo de infecção pelo *Toxoplasma gondii*, foram detectados 371 reagentes alcançando o percentual de 50,3%.

RESUMO

Os autores examinaram, através da prova de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de toxoplasmose, amostras de sangue de 270 doadores de diferentes bancos de sangue em São Paulo, a fim de conseguir fontes de "fator acessório", verificando alta inci-

dência de reagentes, máxime em se comparando com os resultados previamente obtidos em nosso meio por Nussenzweig. Este autor em 1957 encontrou a incidência de 28,74% de não reagentes, em doadores de sangue, enquanto que os autores encontraram apenas 4,08% de não reagentes, assim como incidência quantitativamente maior de títulos diagnósticos elevados. Foi efetuado estudo crítico comparativo com inquéritos semelhantes realizados em Roma, São Paulo e Belo Horizonte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; COTRIM, J. X.; LAUS, W. C. & GOMES, M. C. O. — Nota sobre o encontro de *Toxoplasma gondii* em sangue destinado a transfusão. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5:69-9, 1963.
2. ARAUJO, F. G. — Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12:105-11, 1970.
3. CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1000 soros humanos. Comportamento anômalo em alguns soros. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 24:1-26, 1964.
4. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. 1. The reaction in smears of peritoneal exudate. *J. Exp. Med.*, 105:549-556, 1957.
5. JAMRA, L. N. F. — Contribuição para a epidemiologia da toxoplasmose. Inquérito em 100 famílias de uma área da cidade de São Paulo. Tese. Fac. Med. U.S.P., 1964.
6. NUSSENZWEIG, R. S. — Toxoplasmose: inquérito sorológico feito pela prova do corante em doadores de sangue. *Hospital, Rio de Janeiro*, 51:723-8, 1957.
7. ZARDI, O.; D'ARCA, S. U.; DRISALDI, D.; GRAZIANO, F. & VENDITTI, G. — Diffusione dell'infezione de *Toxoplasma gondii* in donatori e non donatori di sangue residenti in Roma e nell'agro romano. *Nuovi Annali Ig. Microbiol.*, 17 (6bis): 634-42, 1966.

Recebido para publicação em 2 de julho de 1971.

INFESTAÇÃO DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS NAS FONTES DE PRODUÇÃO E DURANTE O ARMAZENAMENTO. UM MÉTODO PARA A PESQUISA MICROSCÓPICA DE SUJIDADES E IMPUREZAS ⁽¹⁾

CONTAMINATION OF FOODSTUFFS AT THE SOURCE OF PRODUCTION AND DURING STOCKAGE. A METHOD FOR MICROSCOPIC RESEARCH OF FILTH AND IMPURITIES

MARIA VIRGINIA DECANIO ⁽²⁾

SUMMARY

Microscopical examination performed on 2,667 samples of foodstuffs showed that about 25 per cent of the samples were contaminated by insects, larvae, mold, and parasites. These contaminations occurred during stockage of raw material and by manipulation, packing or stocking of the finished products.

A procedure of analysis was introduced to retain in one step these contaminants.

INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios podem ser contaminados e infestados por microrganismos, parasitas, insetos, larvas e ovos, excrementos de insetos e de animais, matéria terrosa, pó atmosférico, detritos de vegetais e de animais. Estas contaminações e infestações podem ocorrer: durante o armazenamento da matéria-prima, durante a fabricação e embalagem dos

produtos alimentícios, ou após a fabricação dos mesmos e durante a sua estocagem.

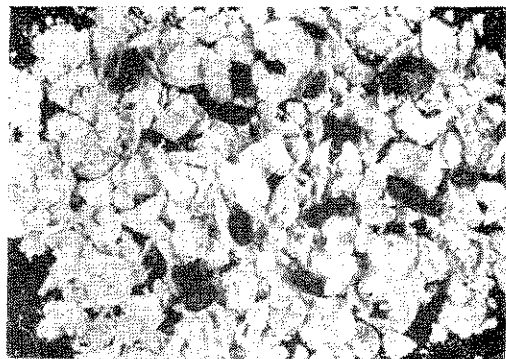


Fig. 1 — Excremento de rato encontrado em aveia em flocos destinada à alimentação infantil. Aum. 2 ×.

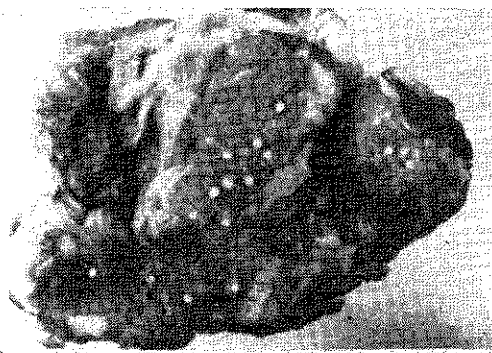


Fig. 2 — Infestação de carne de suíno por *Cysticercus cellulosae* (cisticercose)

Muitas vezes o parasita requer uma pesquisa minuciosa para a sua identificação. É o caso de produto infestado por pequeninos ovos, ou larvas de pequenos insetos ou parasitas intestinais do homem, como a cisticercose, encontrada em linguças, presuntos e outros produtos de origem animal, geralmente de fabricação clandestina.

(1) Elaborado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

As principais fontes de contaminação e infestação dos alimentos são os depósitos de lixo, locais onde vivem ratos, gatos e cães, criações de porcos e de aves, insetos, principalmente moscas e baratas, águas estagnadas onde proliferam larvas de insetos; fontes de fuligem, como chaminés e outras.

As baratas e os roedores por exemplo, ao atacarem os alimentos, deixam sinais de mordeduras e excrementos sôbre os mesmos.

Os insetos, além de depositarem os seus ovos e conseqüentemente as larvas sôbre os alimentos, transmitem grande número de microorganismos nocivos ao homem.

A matéria-prima infestada, se utilizada para a fabricação de produtos alimentícios, acarreta para os mesmos os seus contaminantes, como é o caso do leite colhido e transportado sem os devidos cuidados de higiene, utilizado na fabricação clandestina de alimentos. É comum encontrarmos em exames microscópicos de queijos, manteigas, geralmente vendidos a

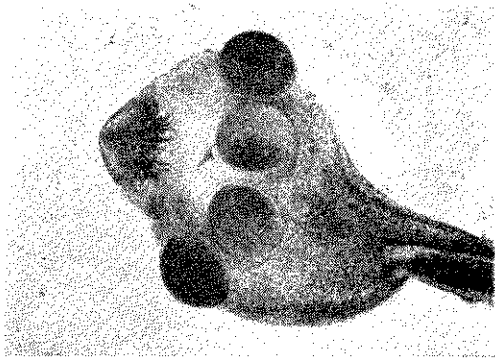


Fig. 3 — *Cysticercus cellulosae* (larva) evaginada, vista ao microscópio. Encontrada em carne de suíno. Aum. 3 000 x.



Fig. 4 — Infestação de presunto por ovos e larvas de insetos.

granel, larvas de moscas, carrapatos de gado, pêlos de animais, fungos e outras sujidades⁵.

Os exames microscópicos de pães e similares têm revelado a presença de fragmentos de ratos, cascas de ovos, fragmentos de cabelos, unhas, papel e numerosas outras sujidades, muitas vêzes oriundas da matéria-prima^{1, 2, 3, 4}.



Fig. 5 — Fungos e esporos encontrados em extrato de tomate. Aum. 250 x.

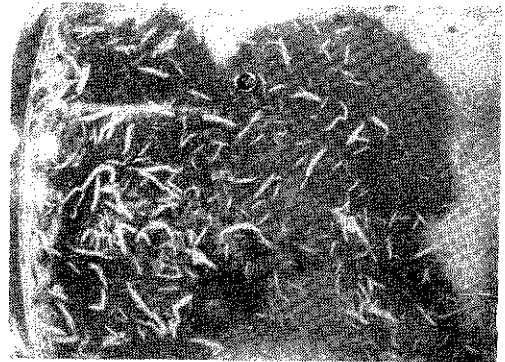


Fig. 6 — Infestação de carne bovina por larvas de *Drosophila* (môscas).

Considerando a grande quantidade de produtos alimentícios contendo sujidades e impurezas, condenados pelos exames microscópicos, nestes últimos anos, sentimos a necessidade imediata de um método mais simples, rápido e eficiente para a pesquisa e identificação desses elementos contaminantes em produtos amiláceos (pães, massas alimentícias, bolachas, farinhas e similares).

O método que descrevemos mostrou bons resultados práticos, pois evita principalmente o cansaço ao analista que anteriormente examinava o produto campo por campo ao

microscópio estereoscópico. Permite, a um só tempo, a retenção e concentração, em papel de filtro, dos elementos contaminantes do produto em exame. Fragmentos de insetos, larvas e ovos são facilmente identificáveis, pois são retidos de forma concentrada completamente limpos, livres de poeira e de possíveis amidos.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Frasco de 2 000 ml, água destilada, hidróxido de sódio a 5%, ácido acético a 3%, glicerina a 20%, placas de Petri, lâminas e lamínulas, espátula, funil de Buchner, papel de filtro tipo xarope, microscópio estereoscópico.

Método

Homogeneize a amostra a ser examinada, transfira 20 gramas para um frasco de 2 000 ml, junte 100 ml de água destilada e deixe em contacto por 30 minutos. Junte 100 ml de hidróxido de sódio a 5% e 100 ml de água destilada previamente aquecida a 100°C, e agite bem o conteúdo do frasco. Aqueça em banho-maria durante 60 minutos e junte 600 ml de água destilada previamente aquecida a 100°C. Agite e deixe a mistura novamente em banho-maria por mais 60 minutos, agitando a cada 10 minutos. Deixe em repouso durante 24 horas, agitando de vez em quando; complete então o volume do frasco com água destilada previamente aquecida a 100°C e agite. Filtre todo o conteúdo do frasco a vácuo através de papel de filtro, tipo xarope, em funil de Büchner. Desligue a bomba de vácuo e adicione ao funil de Büchner 40 ml de ácido acético a 3%. Deixe em contacto por 15 minutos. Ligue a bomba de vácuo até a secura. Desligue a bomba e junte ao funil 20 ml de glicerina a 20%. Ligue novamente o vácuo e termine a filtração por sucção lenta. Retire do funil de Büchner, o papel de filtro com o material retido e transfira-o para uma placa de Petri. Examine ao microscópio estereoscópico, pesquise e identifique os contaminantes presentes (ovos, larvas, insetos e sujidades). Com o auxílio de uma pequena espátula, transfira do papel de filtro os fragmentos de cascas vegetais (súber, epicarpo, etc.)

para um lâmina contendo uma gota de água destilada, cubra com uma lamínula, examine e identifique ao microscópio.

Os excrementos de roedores são reconhecidos pelos seus caracteres morfológicos; estão envolvidos por uma mucilagem esverdeada, são alongados, afilados nas duas extremidades, escuros e medem em média 10 mm de comprimento, os maiores medem até 16 mm de comprimento.

O principal diagnóstico para reconhecer o excremento de rato é a presença do próprio pêlo do roedor no excremento.

Os fragmentos destes excrementos são reconhecidos ao microscópio por formarem um aglomerado escuro constituído por partículas envolvidas por substância muculaginosa, e contendo grande número de bactérias.

Os excrementos de insetos são truncados nas duas extremidades e seu tamanho varia com o tamanho do inseto.

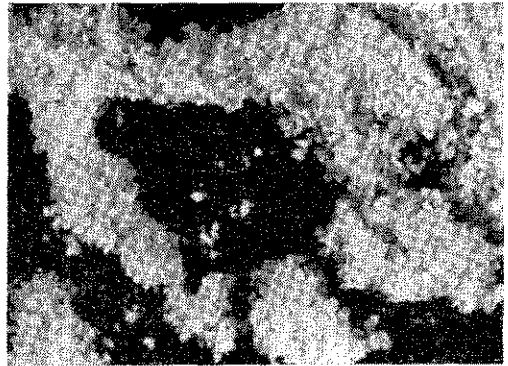


Fig. 7 — Excremento de insetos em farinha. Aum. 2 x.

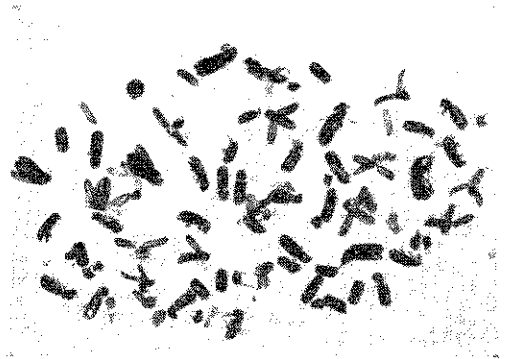


Fig. 8 — Parasitas e larvas retidos de 20 g de macarrão infestado. Aum. 3 x.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Usando o método descrito, analisamos 2667 amostras de alimentos (pães, bolachas, massas alimentícias, açucarados, sucos, geléias, farinhas, condimentos, etc.), enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para análises fiscais e orientação, durante o período de janeiro de 1968 a novembro de 1970. Êstes exames mostraram que 25% das amostras são impróprias para o consumo humano, por estarem infestadas por insetos, larvas, ovos, fungos, acarinos e outros parasitas.

Os acarinos, por exemplo, o *Tyroglyphus*, freqüentemente atacam os queijos nas queijarias. Reproduzem-se facilmente por meio de ovos e larvas e o seu ataque começa na casca de queijo, perfurando-a e formando cavernas onde se alojam; continuam perfurando, cavando galerias de fora para dentro e atacam toda a massa de caseína, chegando a pulverizá-la totalmente, comunicando ao queijo um odor desagradável e modificando todos os seus caracteres organolépticos. O pó dêste queijo acumula-se nas fendas das prateleiras e assoalhos e, se não sofrerem limpeza e desinfecção constante, todos os queijos aí depositados serão atacados rapidamente e a infestação se alastra.

Êste parasita ataca também os produtos açucarados, principalmente as frutas cristalizadas, dessecadas, e as farinhas. Os bombons e similares fabricados e recheados com as frutas e açúcares atacados por acarinos serão, após o acondicionamento, infestados pelos parasitas, de dentro para fora.

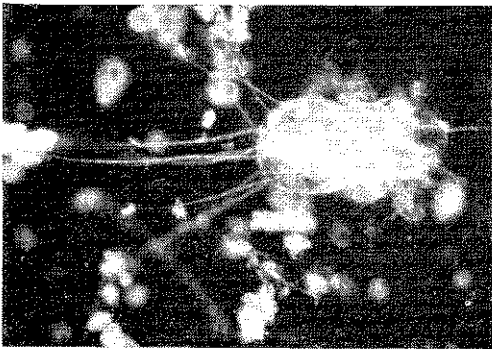


Fig. 9 — *Tyroglyphus* sp. (acarino) encontrados em produtos destinados à alimentação infantil. Aum. 1 200 x.

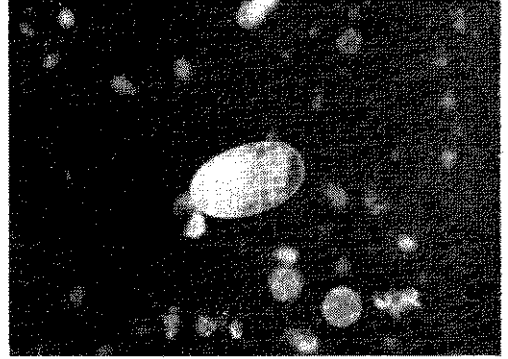


Fig. 10 — Ovo de *Tyroglyphus* (ácaro) encontrado em produto destinado à alimentação infantil. Aum. 1800 x.

O acarino, conhecido vulgarmente com o nome de “a sarna dos vendeiros”, produz uma forte coceira principalmente nas mãos e no rosto, causando inflamações cutâneas. Quando ingerido, o parasita causa perturbações digestivas no homem, sendo encontrado no exame de fezes.

Para combater êste parasita, recomenda-se vaporizar com formol, durante 20 horas, os depósitos infestados.

O *Turbatrix aceti*, nematóide vulgarmente conhecido pelo nome de “a praga das vinagreiras” ataca os vinagres. Êstes parasitas reproduzem-se rapidamente e infestam, por meio de numerosas larvas, os depósitos de vinagre. Se êstes depósitos infestados não forem lavados e desinfetados periodicamente, todos os vinagres neles depositados serão contaminados pelo parasita. Êstes produtos podem ser vendidos ao consumidor ou empregados em



Fig. 11 — *Turbatrix aceti* (angüilula) encontrada em conserva vegetal. Aum. 1 200 x.

fábricas de conservas vegetais, contaminando assim os alimentos com eles fabricados. Encontramos, nos exames microscópicos de pickles e outras conservas vegetais, muitos destes parasitas, oriundos dos vinagres empregados em sua preparação.

Os vegetais empregados no preparo de produtos alimentícios devem estar desprovidos das partes não comestíveis, como pedúnculos, caroços, galhos, raízes, cascas, e da terra aderente. É comum, nos exames microscópicos, encontrarmos condimentos, como orégano e outros, contendo até 50% de galhos, folhas estranhas e matéria terrosa; também, temperos e molhos contendo cascas, raízes e pedúnculos de alho, cebola e pimenta, etc.



Fig. 12 — Pedúnculos, cascas e raízes encontrados em temperos destinados ao consumo humano.

A erva-doce é comumente substituída, parcial ou totalmente, por funcho de péssima qua-



Fig. 13 — Infestação de *Pimpinella anisum*. (erva-doce) por parasitos, e falsificação com *Foeniculum vulgare* (funcho). Aum. 2 x.

lidade, infestado por larvas e insetos. As padarias, restaurantes, *pizzarias* que adquirem estes produtos fabricam pães, *pizzas*, bróas e similares e, conseqüentemente, os consumidores vão ingerir tais sujidades.

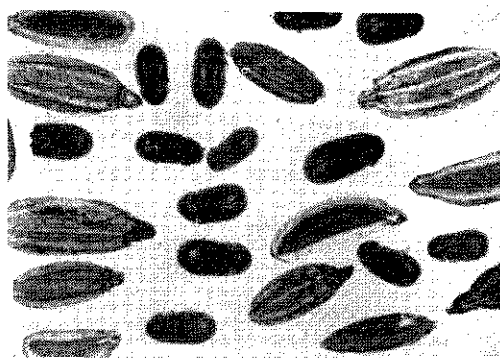


Fig. 14 — Parasitas de *Foeniculum vulgare* (funcho). Aum. 8 x.

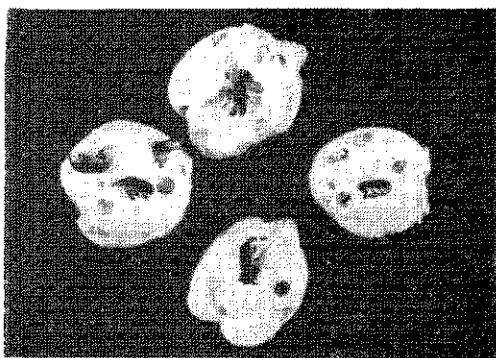


Fig. 15 — Infestação de *Cicer arietinum* (grão-de-bico) por parasitas e larvas. Aum. 2 x.



Fig. 16 — Infestação de peixe dessecado por insetos e larvas. Aum. 15 x.

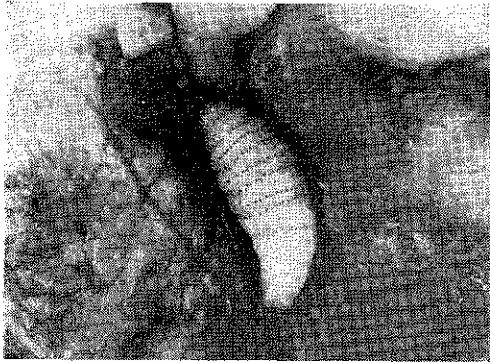


Fig. 17 — Infestação de carne bovina por larva de *Dermatobia hominis* (berne).

Os rizomas, raízes e tubérculos utilizados para a fabricação de farinhas, doces, conservas vegetais, etc., não desprovidos das cascas e da terra aderente, acarretam, para os produtos com eles fabricados, ovos de parasitas intestinais e outras sujidades.

A terra muitas vezes está presente nos alimentos, adicionada propositalmente com a intenção de aumentar o peso dos mesmos, como é o caso de várias amostras examinadas de pimenta do reino em pó, condimentos moídos, café e outros. É comum encontrarmos, em doces de batata-doce, grande quantidade de súber (cascas) e matéria terrosa.

As principais fontes de contaminação dos produtos alimentícios são: uso de maquinaria e equipamentos sujos, contendo resíduos acumulados; falta de higiene do local de trabalho e falta de asseio do operário.

Os moinhos sujos com resíduos de moagens anteriores contaminam os produtos que por eles passam e, assim, teremos farinhas misturadas com elementos estranhos e sujidades, as quais, naturalmente, serão condenadas nos exames microscópicos. Os resíduos de fabricação devem ser retirados diariamente para não se constituírem em alimentos para ratos e insetos, ou em fontes de contaminação.

O local de trabalho deve ser mantido limpo e seco, pois a umidade e as águas paradas nas pias e tanques favorecem o desenvolvimento de ovos e larvas de insetos que podem infestar os produtos.

O chão, teto, paredes, prateleiras, janelas, armários, cadeiras e mesas dos locais de fabricação e armazenamento devem ser limpos e desinfetados periodicamente, para eliminar a poeira acumulada, carvão, teias, insetos e outras sujidades. Os ralos e todos os buracos por onde possam penetrar ratos e insetos devem ser bem tampados.

O ar, se possível, deve entrar nas salas de fabricação filtrado e sob pressão.

Os sanitários requerem limpeza constante e desinfecção diária.

Recomenda-se, para a limpeza cuidadosa e freqüente do local de fabricação e acondicionamento, bem como dos utensílios e máquinas, lavá-los com grande quantidade de água potável e detergentes adequados, o que reduzirá ao máximo a contaminação.

O asseio corporal do operário é fator primordial na fabricação dos produtos em boas condições de higiene. Deve este usar vestimenta limpa e adequada e estar sempre com a cabeça coberta, para evitar a queda dos cabelos sobre os produtos, durante a fabricação. Deve, após utilizar-se do sanitário, lavar as mãos e desinfetá-las adequadamente.

Recomenda-se por fim, como medida profilática para diminuir, e mesmo evitar, a infestação dos produtos alimentícios, manterem as autoridades sanitárias uma supervisão periódica tanto dos locais de produção, armazenamento, transporte, como dos locais próximos a essas fontes.

RESUMO

Os exames microscópicos realizados em 2 667 amostras de produtos alimentícios demonstraram que 25% das mesmas estavam infestadas por parasitas ou por insetos, larvas, ovos, fungos ou sujidades. Estas infestações ocorreram durante o armazenamento da matéria-prima, ou na fabricação, embalagem e estocagem dos produtos.

Foi introduzido um método microscópico que permite, a um só tempo, a retenção e concentração, em papel de filtro, dos elementos contaminantes, que se apresentam completamente limpos, livres de poeira ou amidos.

DECANIO, M. V. — Infestação de produtos alimentícios nas fontes de produção e durante o armazenamento. Um método para a pesquisa microscópica de sujidades e impurezas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:31-37, 1971.

Agradecimentos — Ao Sr. Justino da Silva, Chefe da Seção de Fotomicrografia do Instituto Adolfo Lutz, pela valiosa colaboração prestada ao nosso trabalho na obtenção das fotografias e microfotografias.

À Sra. Maria Aparecida Carvalhaes Guillaumon, cuja colaboração se fez presente em várias etapas deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TOWNSEND, C. T.; SOMERS, I. I.; LAMB, F. C. & OLSON, N. A. — A laboratory manual for the canning industry. 2nd. ed. Washington, Nac. Can. Assoc., 1956.
2. VILLIERS, A.; COLLIN, E. & FAYOLLE, M. — *Traité des falsifications et altérations des substances alimentaires*. v.5: Aliments féculents — matières colorantes et produits antisséptiques. 2^{ème} ed. Paris, Octave Doin, 1909-1911.
3. WINTON, A. L. — *A course in food analysis*. New York, Wiley, c1917. 252 p.
4. WINTON, A. & WINTON, K. B. — *The structure and composition of foods*. New York, Wiley, 1932. p. 28.

Recebido para publicação em 2 de julho de 1971.

ACÇÃO DA ASSOCIAÇÃO L-TRIPTOFANO E CITRATO DE FERRO AMONIAICAL SÓBRE A FORMAÇÃO DE BAFO DE *PROTEUS*

L-TRYPTOPHAN AND FERRIC AMMONIUM CITRATE AS AN INHIBITORY ASSOCIATION ON *PROTEUS* SWARMING

GIL VITAL ALVARES PESSÓA ⁽¹⁾
DILMA SCALA GELLI ⁽¹⁾
MARIA ELISA FERNANDES DE FIGUEIREDO ⁽¹⁾
JOSÉ FERREIRA BRANDÃO ⁽¹⁾

SUMMARY

Inhibitory effect of L-tryptophan plus ferric ammonium citrate on *Proteus* swarming was tested with good results in sheep blood-agar plates.

INTRODUÇÃO

A formação de bafo por espécies do gênero *Proteus* é um fenômeno bem conhecido, causador de inúmeras dificuldades na rotina laboratorial. Segundo JONES & PARK ¹, duas teorias poderiam explicar este fenômeno: a primeira é que a superpopulação local exaure os nutrientes na área de crescimento, o resultante gradiente desses elementos estimulando o crescimento e o movimento em direção à periferia; a segunda, que é ele uma resposta aos produtos metabólicos acumulados durante o crescimento dos organismos não formadores de bafo.

As várias substâncias estudadas como inibidoras da formação de bafo de *Proteus* (azida sódica ⁶, ácido bórico ⁷, sais biliares ³, desoxicolato de sódio ² e outras) apresentam também efeito inibidor secundário sobre o crescimento de outras bactérias. NAYLOR ⁴ faz uma revisão e classificação dos métodos, mecânicos e químicos, usados até então para inibição do bafo. Jones & Park, estudando 22 aminoácidos adicionados ao meio mínimo de Fildes, verificaram que a estimulação do fenômeno não era devida a um simples aminoácido ou a um grupo específico de aminoácidos, agindo eles, talvez, de maneira não específica dada a possibilidade de existir relação entre formação de bafo e aumento resultante do metabolismo daqueles elementos.

Com base em observação prévia ⁵ de que L-triptofano associado ao citrato de ferro amoniacal (como contrastante de colônias) inibia a formação do bafo de *Proteus*, no presente trabalho foi estudada possível ação sinérgica dessas substâncias para inibir a formação de bafo em placas de agar-sangue de carneiro.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Meio de cultura

Foram utilizadas placas de agar-sangue de carneiro preparado como segue:

| | |
|---------------------------------|----------|
| Proteose peptona n.º 3 (Difco) | 1,0 g |
| Cloreto de sódio | 0,5 g |
| Extrato de carne (Difco) | 0,3 g |
| Agar n.º 3 (Oxoid) | 1,2 g |
| Sangue desfibrinado de carneiro | 0,5 ml |
| Água destilada | 100,0 ml |

pH = 7,6

O L-triptofano e o citrato de ferro amoniacal foram adicionados, em diferentes concentrações, ao agar-base, antes da adição do sangue.

(1) Do Instituto Adolfo Lutz.

2. Cepas

Foram utilizadas três cepas de *Proteus mirabilis*, isoladas de coproculturas (n.ºs IAL-457, IAL-458 e IAL-466).

3. Provas realizadas

3.1 — Para verificação da proporção ideal inibitória, foram testadas concentrações variáveis das duas substâncias em estudo (quadro I) adicionadas ao meio de agar-sangue de carneiro. A partir de uma suspensão de *Proteus mirabilis* em solução fisiológica, com turvação correspondente ao tubo n.º 1 da escala de Mac Farland, foi feita diluição a 1:10 em solução fisiológica; dessa diluição foram inoculados 0,05 ml nas placas do meio de cultura em prova por espalhamento com bastão em L. Após incu-

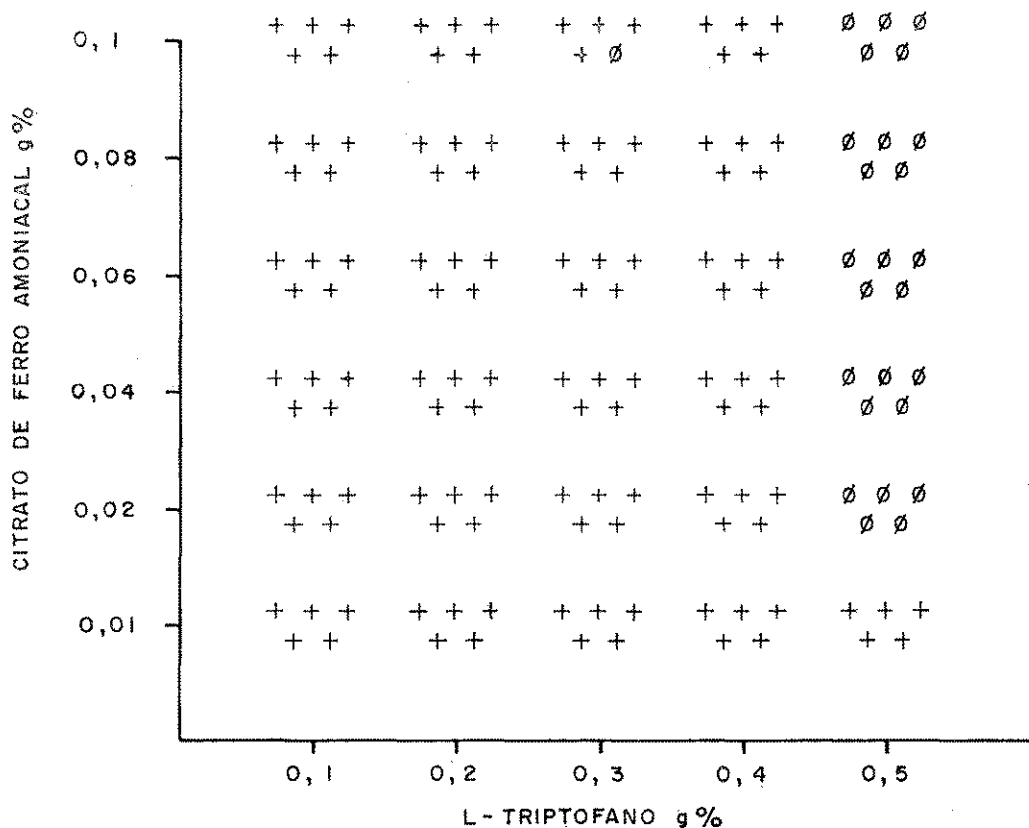
bação a 37°C durante 24 hs foi feita a verificação da presença ou não de bafo.

3.2 — Para verificação da possível ação inibitória da associação em prova sobre o crescimento de outras bactérias foram inoculadas diluições seriadas dobradas de suspensões, em solução fisiológica, de cepas de *Sh. sonnei*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *St. aureus* e estreptococos alfa e beta-hemolíticos, em placas de agar-sangue de carneiro contendo L-triptofano e citrato de ferro amoniacal na proporção inibitória mínima ideal, verificada anteriormente, e em placas de agar-sangue; após incubação a 37°C, durante 24 hs, procedeu-se à contagem comparativa das colônias (quadro II).

RESULTADOS

A observação dos resultados das verificações para determinação da proporção inibitória ideal do gráfico abaixo mostra que o

Relação entre concentrações de L-triptofano e citrato de ferro amoniacal na inibição de bafo pelo *Proteus mirabilis*, em placas de agar-sangue de carneiro.



+ = presença de bafo

Ø = ausência de bafo

Verificação de ação inibitória da associação de L-triptofano (0,5 g%) e citrato de ferro amoniacal (0,02 g%), sobre o crescimento de outras bactérias, no meio em estudo e em agar-sangue de carneiro.

| Bactérias por placa Diluições semeadas | Salmonella typhimurium | | Shigella sonnei | | Escherichia colli | | Staphylococcus aureus | | Estreptococo alfa hemolitico | | Estreptococo beta hemolitico | |
|--|---------------------------|------|--------------------|------|----------------------|------|--------------------------|------|------------------------------------|------|------------------------------------|------|
| | AS | AS+T | AS | AS+T | AS | AS+T | AS | AS+T | AS | AS+T | AS | AS+T |
| 10 ⁻⁴ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | 40 | 50 | ∞ | ∞ |
| 10 ⁻⁶ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | 6 | 3 | ∞ | ∞ |
| 10 ⁻⁸ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | 30 | 36 | 2 | 3 | ∞ | ∞ |
| 10 ⁻¹⁰ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | 10 | 10 | — | — | 800 | 900 |
| 10 ⁻¹² | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | 6 | 7 | — | — | 580 | 500 |
| 10 ⁻¹⁴ | ∞ | ∞ | 34 | 32 | 40 | 42 | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 10 ⁻¹⁶ | ∞ | ∞ | 34 | 32 | 30 | 36 | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 10 ⁻¹⁸ | 600 | 700 | 15 | 15 | 16 | 14 | ... | ... | ... | ... | ... | ... |

∞ incontáveis
— ausência de crescimento
... desconhecido

AS agar - sangue
T L - triptofano

L-triptofato, na concentração mínima de 0,5 g%, associado ao citrato de ferro amoniacal em concentrações superiores a 0,01 g%, impediu em tôdas as placas do meio em estudo a formação de bafo.

Tendo em vista os resultados acima, foram estabelecidas as concentrações mínimas de 0,5 g% de L-triptofano e 0,02 g% de citrato de ferro amoniacal como as adequadas.

Examinando-se os resultados do quadro da pág. anterior referentes ao comportamento de várias espécies bacterianas nas placas em estudo, em comparação ao verificado em placas de agar-sangue comum, foi constatado não ter havido efeito inibitório sobre seu crescimento, nem alterações aparentes na morfologia das colônias.

CONCLUSÕES

Estes resultados preliminares evidenciam a utilidade do emprêgo da associação de L-triptofano e citrato de ferro amoniacal para inibir a formação do bafo de *Proteus*. Resultados semelhantes foram obtidos por um dos autores⁵ quando estudou essa associação para isolamento de enterobactérias. O meio descrito está sendo, no momento, experimentado para o isolamento de germes patogênicos de urina, com a finalidade de estudar-se sua aplicação em laboratório.

RESUMO

Foi verificado o efeito inibitório da associação de L-triptofano e citrato de ferro

amoniacal sobre a formação de bafo por *Proteus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. JONES, H. G. & PARK, R. W. A. — The influence of medium composition on the growth and swarming of *Proteus*. *J. Gen. Microbiol.*, 47:369-77, 1967.
2. LEIFSON, E. — New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J. Path. Bact.*, 40:581-99, 1935.
3. MacCONKEY, A. T. — *Bile-salt neutral red lactose agar*. In MACKIE, T. J. & McCARTNEY, J. E. — *Handbook of practical bacteriology*. 6.ed. Edinburg, Livingstone, 1942. p. 137.
4. NAYLOR, P. G. D. — The effect of electrolytes or carbohydrates in a sodium chloride deficient medium on the formation of discrete colonies of *Proteus* and the influence of these substances on Growth in liquid culture. *J. Appl. Bact.*, 27(3):422, 1964.
5. PESSOA, G. V. A. et alii — Um novo meio para diferenciar o grupo *Proteus-Provuidence* de outras bactérias. Trabalho em elaboração.
6. SNYDER, M. L. & LICHSTEIN, H. C. — Sodium azide as an inhibiting substance for gram-negative bacteria. *J. Infect. Dis.*, 67:113-5, 1940.
7. SYKES, J. A. & REID, R. — The control of the swarming of *Proteus vulgaris* by boric acid. *J. Gen. Microbiol.*, 3:117, 1949.

Recebido para publicação em 14 de julho de 1971.

NOVA TÉCNICA DE MONTAGEM DE COLÔNIAS PERMANENTES DE FUNGOS EM PLACAS DE PETRI ⁽¹⁾

A NEW MOUNTING TECHNIC OF PERMANENT GIANT COLONIES OF FUNGI IN PETRI DISHES

HASSIB ASHCAR ⁽²⁾

S U M M A R Y

The author presents the results obtained with the use of a new mounting technic of permanent giant colonies of fungi in Petri dishes. This technic provides an easy and economical way in preparing a museum of fungi useful for both demonstrative and teaching purposes.

INTRODUÇÃO

A grande variedade de caracteres macroscópicos e de estruturas microscópicas dos fungos se destaca, sem dúvida, entre as maiores dificuldades encontradas pelos que iniciam o estudo de micologia. Este estudo, entretanto, pode ser consideravelmente facilitado desde que se disponha de uma coleção de colônias gigantes permanentes e, também, de lâminas de estruturas microscópicas das espécies de fungos de maior interesse.

Para o preparo de lâminas permanentes para o estudo dos caracteres microscópicos dos fungos, já é bem conhecida a técnica de Rivalier & Seydel.

No entanto, com relação ao estudo dos caracteres macroscópicos dos fungos, embora muitos autores recomendem o preparo de colônias gigantes, não encontramos referência a qualquer técnica de fixação e conservação de tais colônias em caracter permanente. Por esse motivo fizemos uma série de ensaios, no sentido de obter uma coleção de colônias gigantes permanentes de fungos de modo a possibilitar, a qualquer momento, a observação dos seus caracteres macroscópicos.

MATERIAL E MÉTODO

Os nossos primeiros ensaios foram feitos em 1950, ocasião em que usamos frascos de

Kolle para o preparo de colônias gigantes permanentes das seguintes espécies de fungos: *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton granulosum*, *Trichophyton ferrugineum*, *Achorium gallinae* e *Sporotrichum schenckii*. A técnica usada foi a seguinte:

Transferiu, com fio de platina, pequena porção de cultura de estoque para o centro de um frasco de Kolle com camada delgada (± 3 milímetros) de agar Sabouraud glicosado. Incubar à temperatura ambiente durante 30 dias. Conservar o frasco deitado, com o meio para o lado de cima, e aspergir pela parede inferior 2 ml de formol a 40%. Deixar, durante 48 horas, que os vapores de formol fixem a cultura. Retirar o excesso do fixador com pipeta de Pasteur. Vedar, com lacre comum, o frasco tamponado com chumaço de algodão revestido de gaze.

Empregando a técnica referida, foram também preparadas, em ocasiões diferentes, colônias gigantes das seguintes espécies de fungos; em 1955, *Candida albicans* em fase rugosa, *Pullularia pullulans*, *Paecilomyces sp*, *Geotrichum sp* e, em 1965, *Epidermophyton floccosum*, *Nocardia brasiliensis*, *Sporotrichum schenckii* e *Hormodendrum sp*. A observação dessas colônias, durante vários anos, mostrou-nos que a montagem, segundo a téc-

(1) Realizado na Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz e do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

nica acima descrita, apresenta certos inconvenientes, tais como, dificuldade de manuseio dos frascos de Kolle e ocorrência eventual de roturas no lacre de vedação. Esses inconvenientes nos levaram a modificar essa técnica de montagem. As principais modificações introduzidas foram: a) preparo das colônias gigantes em placas de Petri; b) vedação por colagem da tampa com o fundo da placa com adesivo Araldite. Passaremos a descrever a nova técnica.

Preparar placas de Petri com agar Sabouraud glicosado com a espessura de ± 3 milímetros. As placas devem ser de vidro resistente e bem transparente. Com fio de platina, retirar pequena porção de cultura jovem do fungo e semear no centro da placa para obter uma única colônia gigante. Para se preparar duas ou três colônias gigantes numa mesma placa, deve-se fazer as semeaduras correspondentes em pontos equidistantes do centro do meio de cultura. Incubar até desenvolvimento completo das colônias, observando-se as condições de temperatura e de tempo de cultivo adequados para cada espécie. Fixar as colônias gigantes por meio de vapôres de formol da seguinte maneira: colocar as placas em posição invertida, ficando a cultura para o lado de cima; aspergir 1 ml de formol puro a 40% no interior de cada tampa, selar as placas com fita adesiva e deixar em fixação durante 48 horas. Retirar a fita adesiva e substituir as tampas das placas com restos de fixador por tampas de outras placas iguais e estéreis.

Passar adesivo Araldite somente nas bordas livres dos fundos das placas, colar as respectivas tampas e deixar o adesivo secar durante 2 a 3 dias. Vedar os espaços livres, resultantes da sobreposição das tampas com os respectivos fundos, com cêra constituída da seguinte mistura: parafina 40%, cêra de carnaúba 25%, cêra de abelhas 25% e breu 10%.

Com essa nova técnica foram preparadas, em 1969, colônias gigantes de numerosas espécies de fungos patogênicos e de saprófitas, incluindo-se entre elas: *Trichophyton tonsurans*, *Microsporium canis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporotrichum schenckii*, *Candida albicans*, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium notatum*, *Hormodendrum sp.* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

RESULTADOS

Colônias gigantes em frascos de Kolle

A observação, durante o período de 1950 a 1971, das colônias gigantes montadas em frascos de Kolle nos quais o lacre de vedação se manteve íntegro, mostrou que se conservaram os caracteres morfológicos tanto da superfície como do reverso das colônias. Nos frascos em que houve rotura do lacre, o meio de cultura ficou dessecado e escuro, e as colônias apresentaram alterações no aspecto.

Em certos casos foram observadas alterações de tonalidade de cor da colônia ou do pigmento elaborado e difundido no meio de cultura. Assim, a superfície da colônia de *Penicillium notatum* mudou de verde-azul para verde-cinza, e, a colônia de *Microsporium canis* mostrou esmaecimento da pigmentação amarela observada no reverso.

Colônias gigantes em placas de Petri

A observação, durante dois anos (1969-1971), das colônias gigantes permanentes preparadas em placas de Petri, mostrou sempre conservação de todos os caracteres morfológicos das colônias.

No entanto, com relação à cor das colônias e dos pigmentos difundidos no meio de cultura, foram também observadas, após algum tempo, as alterações de tonalidades já referidas para os frascos de Kolle. Com a colônia de *Rhodotorula mucilaginosa*, de cor avermelhada peculiar, houve total descoloração durante a fixação pelo vapôres de formol.

A Fig. 1, placa montada com Araldite há dois anos, mostra conservação dos caracteres morfológicos e da cor da superfície de colônia gigante de *Aspergillus niger*. A Fig. 2 mostra o reverso da mesma colônia.

DISCUSSÃO

Os dois tipos de montagem já referidos são de fácil execução. No entanto, o uso de placas de Petri apresenta, a nosso ver, as seguintes vantagens, sobre os frascos de Kolle: a) manuseio mais simples, permitindo, com maior facilidade o exame da superfície e do reverso das colônias; b) necessidade de menos espaço, simplificando o alojamento e



Fig. 1 — Superfície da colônia gigante permanente de *Aspergillus niger* em placa de Petri (tamanho natural)

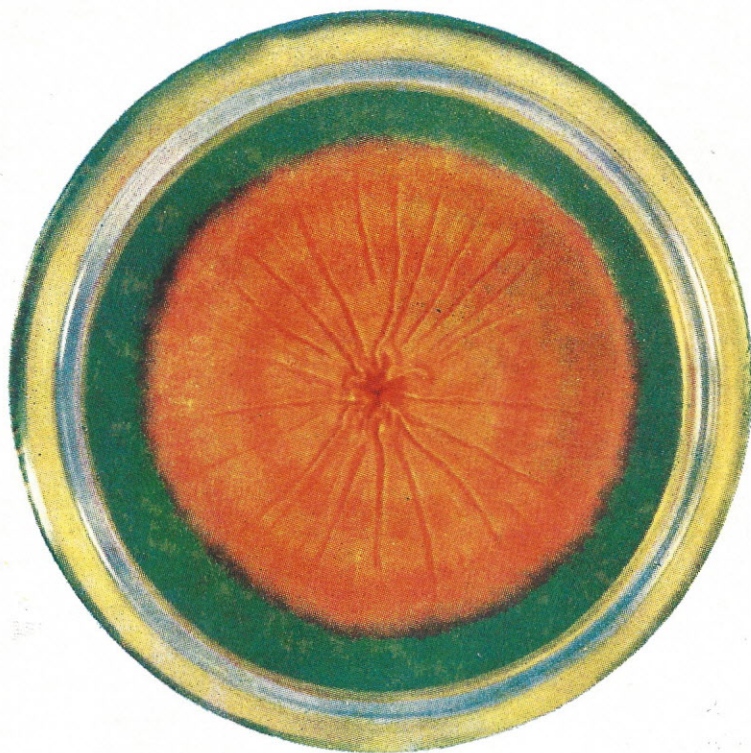


Fig. 2 — Reverso da mesma colônia.

transporte; c) obtenção mais fácil no comércio, com menor custo; d) maior resistência; e) melhor estética.

CONCLUSÕES

1. As placas de Petri, de vidro resistente e bem transparente, são recomendáveis à montagem de colônias gigantes permanentes de fungos.
2. O adesivo Araldite é satisfatório para a colagem e vedação de placas de Petri.
3. A fixação pelos vapores de formol conserva os caracteres morfológicos das colônias gigantes de fungos.
4. As causas de alterações de tonalidade de cor das colônias de certas espécies de

fungos, assim como dos pigmentos por eles elaborados não foram por nós determinadas.

RESUMO

O autor apresenta os resultados obtidos na montagem de colônias gigantes permanentes de fungos, com o emprêgo de técnica original. Por essa técnica pode-se preparar, de modo fácil e econômico, material permanente para fins demonstrativos e didáticos.

Agradecimentos — Desejamos consignar nossos agradecimentos ao Sr. Januário José Delle Cave pela valiosa colaboração na parte técnica deste trabalho.

Recebido para publicação em 15 de julho de 1971.

A OCORRÊNCIA DE "PONTOS DE QUEBRA PREFERENCIAIS" EM VÍRUS ALONGADOS

THE OCCURRENCE OF "PREFERENTIAL BREAKING POINTS" IN ELONGATED VIRUS PARTICLES

KARL MARTIN SILBERSCHMIDT ⁽¹⁾
DALTON RAMALHO WEIGL ⁽²⁾
THEREZINHA APARECIDA SALOMÃO ⁽³⁾

SUMMARY

The authors, starting from the concept of the "normal length" of virus particles point out the dependency sometimes observed of the length of virus particles on the method of preparation, to which the virus sample had been submitted.

In preparations, obtained by the relatively mild methods of "dipping" or "exudation", higher percentages of large particles can be seen, when observed with the electron microscope than in preparations of samples deriving from the same virus source, but involving greater mechanical stress (ultra-centrifugation, alcali desintegration, ultrason-waves etc.).

Generally, in preparations of this second type, the group of additional small particles (not represented in preparations obtained by milder methods) consists of rods of approximately the same size, what agrees with the idea, that the smaller elements are fragments of the larger particles.

The rather uniform size of such fragments suggests the occurrence, in large particles, of "weak points", where a breakage under stress would easily occur. Such observations are considered indirect proofs for the occurrence of "preferential breaking points" of virus particles.

The electronmicrographies of particles of several types of virus supply also direct evidence for the occurrence of such preferential breaking points. Sometimes in such micrographies the particles are seen during the very process of breaking, exhibiting intact one side of the particles border line and a gap on the opposite side.

Based upon references of the literature and on their own observations regarding the tobacco rattle virus, the authors point out that the supposed position of the "preferential breaking points" is often acentric, what results in the fragmentation of the particle in pieces corresponding f.i. to 1/3 and 2/3 of the original size of the particle.

Attention is called upon the occurrence of biochemically weak points on the virus particle, a phenomenon, which does not explain but makes easier understandable the occurrence of comparable weak points in relation to mechanical stress.

INTRODUÇÃO

1. O "tamanho normal" das partículas

Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica surgiu a possibilidade de observação das partículas virais. Com isso se estabeleceu, para a caracterização de um vírus, uma nova propriedade importante: o

tamanho das partículas. Essa propriedade é muito significativa, especialmente nos vírus cujas partículas são alongadas.

BRANDES & WETTER² (1959), usaram o tamanho das partículas como base auxiliar na classificação e identificação de alguns vírus vegetais que apresentam aquela característica morfológica. Utilizaram, para es-

(1) Do Instituto Biológico, São Paulo. Pesquisador conferencista do CNPq.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

(3) Da Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia, Jaboticabal, São Paulo.

tabelecer o tamanho das partículas de cada vírus, o conceito de “tamanho normal”, isto porque, na preparação de um determinado vírus, quando observada ao microscópio eletrônico, nem tôdas as partículas virais têm exatamente o mesmo tamanho. Puderam assim, estabelecer um tamanho médio, resultante de uma distribuição das partículas em classes crescentes de tamanho. Esse tamanho é chamado de *tamanho normal*. Para citar alguns exemplos escolhidos do trabalho de Brandes & Wetter, podemos mencionar que um vírus de trigo, transmitido através do solo, possui tamanho normal de 130 m μ , que o vírus do mosaico do fumo (TMV) caracteriza-se por um tamanho normal de 300 m μ e que o vírus X da batatinha tem tamanho normal de 515 m μ .

O “tamanho normal” como uma das propriedades características de um vírus, não é prejudicado pelo fato de que alguns vírus, como o “rattle” do fumo, possuem partículas que se distribuem, quando em histograma representativo da frequência das partículas, de modo a apresentar *dois* tamanhos normais.

Nas nossas pesquisas sobre o vírus “rattle” do fumo, atribuímos às partículas pequenas e grandes do vírus tamanhos normais de 57 e 223 m μ respectivamente.

Muitas vezes, nas preparações ao microscópio eletrônico, constatamos partículas virais de tamanhos bem diferentes do tamanho normal e que, de forma alguma, se enquadrariam dentro das frequências próximas ao tamanho normal. Tais partículas devem ser compreendidas como frações ou pedaços de partículas completas. O problema que queremos discutir neste trabalho é a existência de “pontos fracos” nas partículas dos vírus, onde haveria maior facilidade para fraturas, o que explicaria o aparecimento preferencial dos fragmentos pequenos de um determinado tamanho.

2. *Provas da ocorrência de quebras da partícula e da formação de fragmentos de tamanhos uniformes*

Dispomos de provas indiretas e diretas da ocorrência freqüente de quebras da partícula do vírus.

2.1 *Provas indiretas* — As provas indiretas apoiam-se nos dados relativos à influência que a técnica de obtenção das prepara-

ções exerce sobre a frequência do tamanho das partículas, desde a técnica mais branda até aquela envolvendo mais agitação.

Em outras palavras, preparações obtidas pelo método de “dipping” ou de exsudação contêm maior porcentagem de partículas grandes ou inteiras que preparações do mesmo vírus e do mesmo material, submetidas à ultracentrifugação.

Observações comparativas da distribuição de partículas do vírus “Stengelbont” da batatinha, variante do vírus “rattle” do fumo, em preparação do mesmo material, obtido por exsudação (método brando) e por ultracentrifugação (método agitado) já foram feitas por PAUL & BODE¹⁶ (1955). Interpretando os resultados que reuniram numa tabela do citado trabalho, os autores verificam que “a porcentagem das partículas pequenas (na preparação submetida à centrifugação) aumentou, como parece, à custa da porcentagem das maiores”. “Esse resultado”, continuam os autores, “é fácil de se interpretar, ao admitir-se que em consequência da centrifugação é favorecida uma quebra em frações menores”.

Na discussão os autores voltam ao problema da fragmentação das partículas em consequência da centrifugação e aventam uma hipótese segundo a qual para cada variante do vírus o grau de resistência contra quebra seria específico. Determinam ainda os autores o quociente do tamanho dos fragmentos como sendo 1:2,6.

Nas nossas próprias experiências sobre vírus “rattle” do fumo, originalmente encontrado em tomateiros, incluímos também algumas observações referentes à influência do tratamento do suco de plantas infectadas sobre a distribuição percentual de partículas em classes crescentes de comprimento, escolhendo, para essa observação classes de 12,5 m μ . Foram medidas e incluídas nas respectivas classes de frequência 235 partículas observadas em preparações obtidas pelo método de “dipping” — Grupo A (Fig. 1) — e 953 partículas observadas em preparações resultantes de uma ultracentrifugação de suco — Grupo B (Fig. 2).

A distribuição percentual das partículas dos grupos A e B está demonstrada nas figuras 1 e 2.

Uma comparação destes gráficos mostra que:

a) O histograma representativo da frequência das partículas em classes crescentes

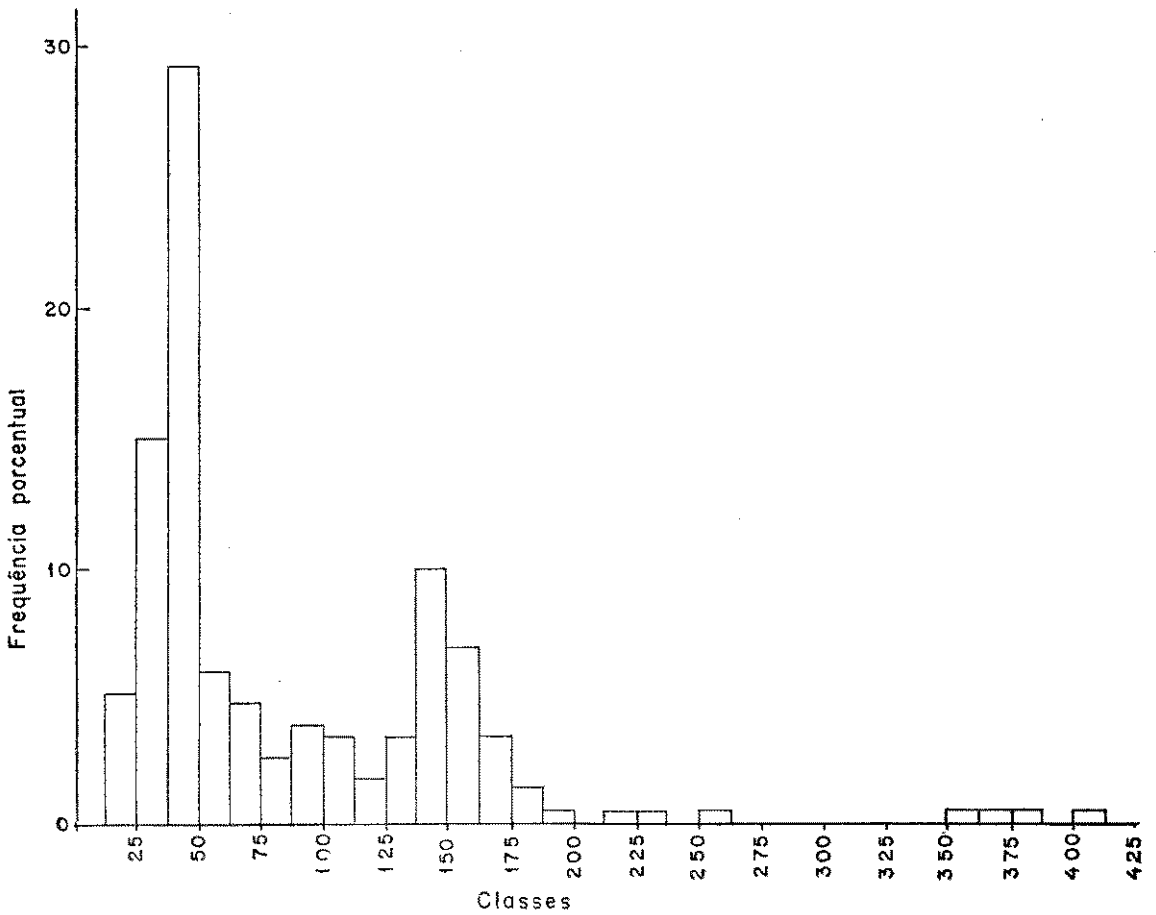


Fig. 1 — Grupo A: Frequência percentual de 235 partículas de “rattle” — virus do fumo, em classes crescentes de 12,5 m μ . Preparações obtidas com o método “Dipping”.

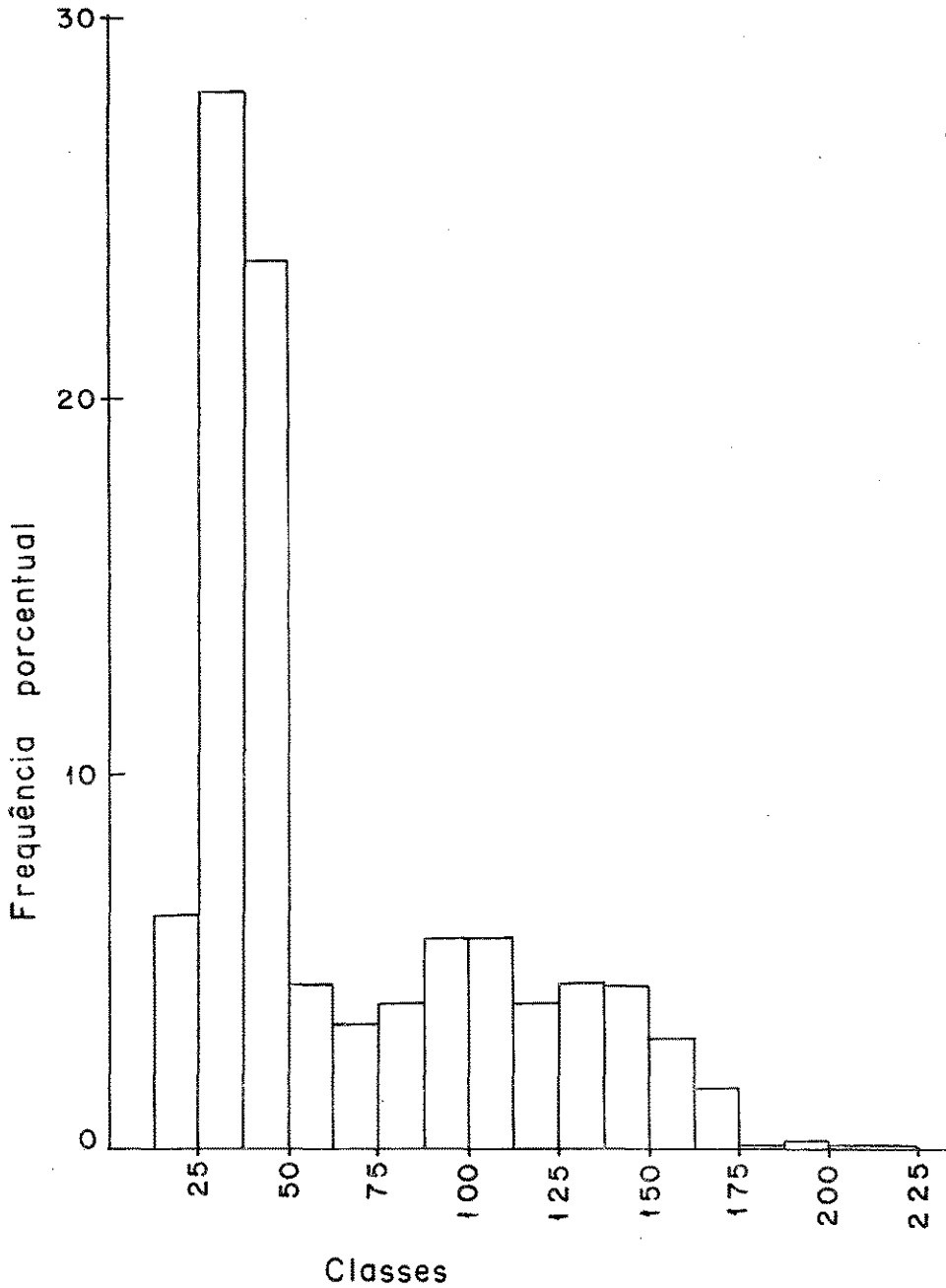


Fig. 2 — Grupo B: Frequência percentual de 953 partículas de "rattle" — vírus do fumo em classes crescentes de 12,5 mμ. Preparações feitas após ultracentrifugação do suco.

de tamanho exhibe, no grupo A, dois picos situados nas classes 37,5-50,0 $m\mu$ e 137,5-150,0 $m\mu$;

b) De tôdas as partículas do grupo A, 39,3% têm tamanhos que se enquadram nas duas classes apontadas no item a;

c) O histograma correspondente à distribuição das partículas do grupo B, nas mesmas classes de tamanho, só tem *um* pico, formado pelas partículas incluídas na classe 25,0 — 37,5 $m\mu$ ou em classes vizinhas a esta. Nota-se que êste pico está transferido para uma classe representativa de partículas de tamanho menor (25,0-37,5 $m\mu$);

d) As classes onde se situam os dois picos do Grupo A englobam 39,3% de tôdas as partículas; as mesmas classes, no Grupo B, apresentam apenas 28,2% das partículas.

A explicação mais viável para a diferença da distribuição das partículas em grupos de tamanhos crescentes é a suposição de que, em consequência de forças mecânicas agindo durante a ultracentrifugação sôbre as partículas, algumas delas quebrem em frações menores. Se essa suposição é correta, devemos, no histograma da Fig. 2, não só encontrar um sensível aumento de partículas nas classes representativas de tamanhos pequenos, mas provavelmente ainda um aumento correspondente da freqüência de partículas em classes intermediárias. Isso corresponderia à suposição de que a partícula grande, medindo cêrca de 146 $m\mu$, quebraria num ponto tal que determinaria um componente menor (de um tamanho aproximado de 46 $m\mu$) e um maior, de tamanho aproximado de 100 $m\mu$. Essa suposição, para a qual falta ainda prova segura experimental, não está, em todo caso, em desacôrdo com as conclusões que podemos tirar da comparação dos dois gráficos.

Partículas pequenas, que se enquadram na classe 37,5-50,0 $m\mu$ constituem no grupo A apenas 14,8% das partículas contadas, mas representam no grupo B, 28,4% dessas partículas. Por outro lado, partículas grandes, enquadradas nas classes entre 125 e 175 $m\mu$ constituem, no grupo A, 24,0% e no grupo B apenas 13,5%. Ao mesmo tempo pode-se notar, no grupo das partículas submetidas à ultracentrifugação (B), um aumento da freqüência de partículas de tamanho intermediário. Partículas do tamanho aproximado de 100 $m\mu$ (incluídas nas clas-

ses abrangendo os tamanhos de 75-125 $m\mu$) constituem apenas 11,5% das partículas do grupo A, mas 19,6% daquelas do grupo B. Não podemos afirmar, por enquanto, que são sempre as partículas grandes que sofrem fração no curso da ultracentrifugação. É muito provável que em certos casos também algumas das partículas pequenas sofram quebras. Acreditamos, entretanto, que algumas das peculiaridades dos histogramas A e B podem ser explicadas satisfatôriamente pela suposição de que partículas grandes, de um tamanho de cêrca de 150 $m\mu$, intactas em preparações obtidas com o método de "dipping", quebram, em consequência da ultracentrifugação, em um pedaço menor (de cêrca de 46 $m\mu$) e um maior (de cêrca de 100 $m\mu$).

Observações relativas à influência da ultracentrifugação sôbre o tamanho das partículas não foram apenas relatadas por Paul & Bode, mas por diversos outros autores. FRANCKI⁶ (1966), estudou o efeito da ultracentrifugação e de alguns outros fatores; como o pH do solvente e da solução dialisadora sôbre a distribuição de partículas em classes crescentes de tamanho. Queremos considerar aqui, apenas a influência da ultracentrifugação e escolher, dos dados que o autor reúne na Tabela 1, pág. 392 só os referentes à preparação 3. O autor fez medições de duzentas partículas de duas preparações contendo TMV. A primeira (A) tinha sofrido apenas uma centrifugação de 9 000 g por 10 minutos, a segunda (B) tinha sido submetida a duas ultracentrifugações a 144 000 g durante uma hora cada vez. Notou êle, na distribuição porcentual das partículas em diversas classes, as seguintes diferenças:

Partículas %

| | < 275 $m\mu$ | 275-350 $m\mu$ | > 350 |
|---|--------------|----------------|-------|
| A | 23 | 73 | 4 |
| B | 56 | 42 | 2 |

Isso mostra de novo que, em preparações submetidas à ultracentrifugação, a porcentagem das partículas pequenas aumenta à custa das partículas maiores, o que se pode explicar admitindo que, devido às forças mecânicas agindo sôbre as partículas grandes, elas quebram dando origem a fragmentos.

Com o vírus X da batatinha, resultados semelhantes foram obtidos por CHICO & GUTHRIE⁴ (1969). Em preparações obtidas com método de "dipping" (brando), 57-80% das partículas medidas apresentavam um tamanho de 500-600 m μ . Após centrifugação diferencial, apenas 23-43% das partículas caracterizavam-se por esse tamanho indicado.

Não podemos aqui analisar em detalhe todos os fatores que, de acordo com as indicações da literatura, provocam uma fragmentação de partículas alongadas.

Queremos, porém, mencionar que a capacidade de provocar fragmentação de partículas foi atribuída a: 1) Raios ultra-violeta (MC LAREN & KLINKOWSKI¹², 1967); 2) Ondas ultra-sônicas (DE MONTGREMIER, GRABAR & CROISSANT⁵, 1954 e HIDAKA & KIRIYAMA⁷, 1953); 3) Exposição das preparações ao espaço — talvez consequência da ação de raios ultra-violeta (ORLOB¹⁵, 1969); 4) Ação de algumas substâncias químicas, como formalina ou extrato de *Phytolacca americana* (HIDAKA & KIRIYAMA⁷, 1953); 5) pH neutro ou alcalino do líquido em que as partículas se acham suspensas (FRANCKI⁶, 1966) mas, principalmente, a temperaturas elevadas ou muito baixas (HIDAKA & KIRIYAMA⁷, 1953, KASSANIS & MCCARTHY¹⁰, 1967, OLIVEIRA¹⁶, 1967 e KANGIESSER & DEUBNER⁹, 1953).

Alguns trabalhos referem-se ao tamanho dos fragmentos que se formam em consequência da quebra. Tais indicações são para o assunto aqui tratado de interesse especial, porque permitem tirar conclusões relativas a eventuais "pontos fracos" das partículas.

No primeiro trabalho que vamos considerar (BURCI, HERSHEY & INGRAHAM³ 1966), os pontos de quebra preferenciais foram determinados não para a partícula de um vírus, mas sim para a molécula de DNA do bacteriófago D₅. Verificou-se, nos estudos reunidos no referido trabalho, que as moléculas, sob o impacto de forças mecânicas, formam fragmentos que representam 0,6 e 0,4 respectivamente do tamanho original da molécula. Os pedaços maiores, expostos a forças mecânicas ainda mais poderosas, quebram em pedaços que representam respectivamente 0,4 e 0,2 do tamanho original da molécula. Merece ser destacado o fato de que a molécula não quebra em dois pedaços iguais, o que leva os autores a admitir a existência de pontos de quebra acêntricos que explicam a formação de fragmentos de-

iguais. Uma das hipóteses formuladas pelos autores prevê a ocorrência de pontos de quebra em posições distantes 0,4 e 0,6 do tamanho da molécula, medindo-se essa distância de cada extremidade da molécula. Outra hipótese admite a ocorrência de 4 pontos fracos, dividindo a molécula em 5 segmentos iguais. Esses resultados são bastante elucidativos para a melhor compreensão da localização de pontos de quebra em partículas completas do vírus, porque é provável que também nelas "os pontos fracos" se situem na molécula do ácido nucléico.

SCHRAMM¹⁷ (1954), referindo-se à decomposição alcalina do TMV, menciona a formação de fragmentos que corresponderiam à 6.^a parte do valor original. Em estudos mais recentes e ainda relacionados com a decomposição alcalina do TMV, ONDA, TANIGUCHI & MATSUI¹⁴ (1970), verificam que a degradação pára quando um terço do bastonete é decomposto. Seria então uma fragmentação na proporção 2:1. Hidaka e colaboradores, nos estudos já mencionados sobre a influência de vários fatores inativadores sobre o TMV, chegaram a destacar partículas medindo 25 m μ ou menos. O tamanho de 25 m μ corresponderia exatamente à metade do tamanho dos fragmentos observados por Schramm. A resultados comparáveis com os já relatados chegaram também Kassanis & McCarthy em estudos relacionados com a influência da temperatura sobre as propriedades de diversas variantes do vírus TMV. Numa determinada fase desses estudos, em que preparações purificadas de uma variante nova foram expostas a 20°C em meio alcalino (pH 8), foi libertado RNA numa quantidade correspondente a um terço da partícula. Finalmente, ainda em conexão com o assunto, devem ser mencionados os resultados, caracterizados como preliminares pelos próprios autores, DE MONTGREMIER, GRABAR & CROISSANT⁵ (1954), que submetteram preparações purificadas de partículas do vírus X da batatinha, a ultrassom. Chegaram os autores a observar fragmentos da partícula do vírus X da batatinha, do tamanho normal de 466 m μ . Os menores fragmentos mediram 33 m μ ; os outros, múltiplos aproximados desse tamanho.

Os exemplos citados são suficientes para mostrar que muitos dados, obtidos por métodos indiretos, falam a favor da existência de "pontos preferenciais" de quebra nas partículas de vírus.

2.2 *Provas diretas da quebra de partículas e da ocorrência de "pontos preferenciais" de quebra* — Falta ainda demonstrar se as quebras de partículas, postuladas pelos resultados obtidos com métodos indiretos, podem ser observadas diretamente por meio do microscópio eletrônico e se tais observações podem fornecer algumas indicações a respeito da ocorrência de "pontos preferenciais" de quebra. Antes de fazer uma revisão sucinta da literatura a respeito, devemos mencionar uma das dificuldades que na resolução desse problema deve ser levada em consideração. Se alguns fatores tendem a provocar uma quebra das partículas (por exemplo: pH neutro ou levemente alcalino), outros (por exemplo: pH ácido) causam agregação das partículas, isto é, uma justaposição das extremidades das partículas. Na interpretação de micrografias eletrônicas deve-se então tomar o cuidado de estudar as condições externas em que as preparações

foram obtidas, para poder diferenciar entre partículas quebradas e agregadas. Achamos, para a apreciação deste problema, especialmente convincentes os casos em que as partículas se acham em plena fase de quebra, isto é, apresentam ao longo de um de seus lados, o início de uma fenda transversal, enquanto que o outro lado encontra-se intacto. Nesse ponto às vezes os dois componentes da partícula formam um ângulo agudo (Fig. 3). Para o nosso problema parece-nos importante a observação em detalhe de tais partículas, a que podemos chamar aqui "partículas descontínuas", porque elas, apresentando rachadura nítida, não podem ser confundidas com partículas agregadas.

Tais partículas descontínuas são ilustradas p.ex. num trabalho de LEE¹¹ (1968), sobre um vírus do trigo, cujas partículas possuem forma oval-alongada. Na Figura 9 do referido trabalho pode-se ver nitidamente que, nesse caso, o ponto de quebra é acêntrico e que os dois componentes da partícula,

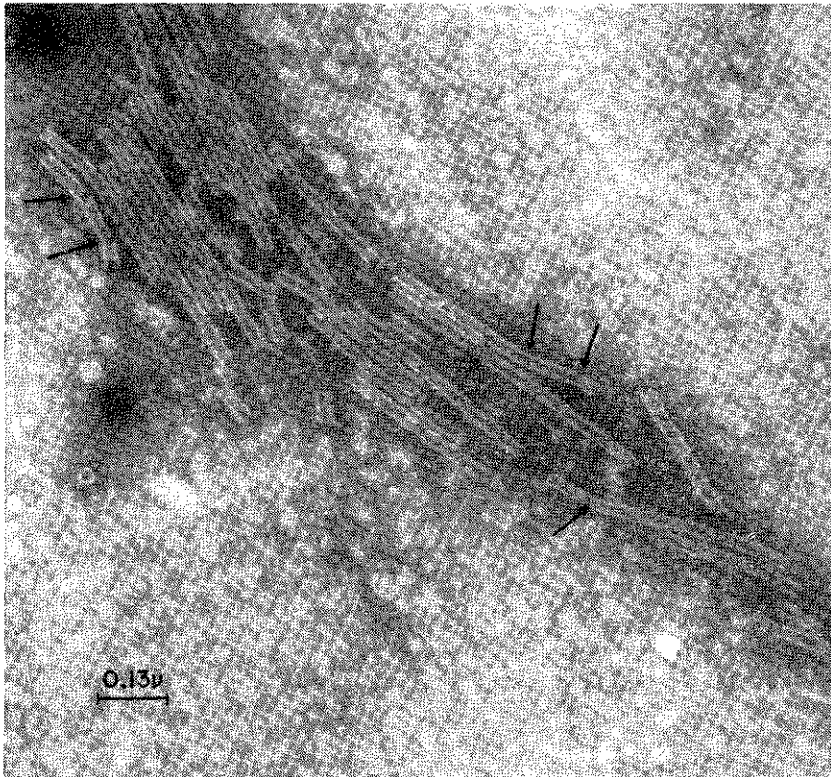


Fig. 3 — Micrografia eletrônica de partículas de vírus "rattle" do fumo, observadas em preparações obtidas pelo método "dipping". As setas indicam os pontos fracos nas partículas "descontínuas".

ainda unidos, têm comprimentos relativos de 1 e 0,44. Na Figura 8d é ilustrada outra partícula descontínua, cujo ponto de quebra está localizado de maneira a favorecer a formação de componentes dos tamanhos relativos de 1 e 0,5. Em outras figuras não é fácil medir o exato tamanho relativo dos componentes; entretanto, elas permitem distinguir a localização acêntrica dos pontos de quebra e a acentuação da ruptura na medula da partícula.

Outras partículas em vias de quebra ou descontínuas podem ser observadas também nas figuras que acompanham o trabalho de ATABEKOV *et alii*¹ (1970) sobre propriedades dos vírus "híbridos"; a Fig. 6 mostra 3 partículas descontínuas, tendo duas delas pontos acêntricos de quebra, ao passo que a terceira partícula parece ter quebrado no centro.

No curso de nossos estudos sobre o vírus causador da doença "rattle" do fumo (SILBERSCHMIDT, WEIGL & SALOMÃO¹⁹ (1969) obtivemos preparações que permitiram a observação de um número relativamente elevado (81) de partículas descontínuas desse vírus. Para poder determinar o tamanho desses componentes, projetamos as micrografias eletrônicas numa tela e medimos com régua o tamanho dos componentes das partículas descontínuas. Dos resultados se pode tirar a conclusão de que, em muitos casos, os componentes das partículas descontínuas têm um comprimento correspondente àquele do tamanho normal das partículas longas ou curtas do vírus "rattle" do fumo. Interpretamos os resultados admitindo que havia nas preparações numerosos "agregados" de partículas, e que provavelmente nos agregados as extremidades das partículas representam pontos fracos. Mas o resultado das nossas medidas mostrou também que alguns componentes das partículas tinham um comprimento ainda menor do que o tamanho normal das partículas curtas do vírus "rattle". A ocorrência de semifragmentos tão pequenos só pode ser explicada admitindo-se que havia pontos de quebra também nas partículas e não só nos agregados. A maioria dos componentes pequenos das partículas descontínuas, que podiam ser medidas com suficiente exatidão, caracterizava-se por um tamanho de cerca de 35 m μ . Componentes desse tamanho podem resultar da ocorrência de pontos de quebra ou no centro das partículas pequenas ou, em partículas grandes,

numa distância correspondente a 1/6 do tamanho da partícula, a contar de uma das extremidades. O caso mais freqüentemente observado nas nossas micrografias eletrônicas foi a fragmentação inicial no centro das partículas pequenas.

3. Possíveis causas da ocorrência de "pontos fracos" nas partículas

Já ao expor as provas indiretas da ocorrência de quebras de partículas, explicamos que essas quebras são a conseqüência de forças mecânicas que agem sobre a partícula, às vezes de maneira tal que uma extremidade fica exposta a um potencial mais forte de que a outra. Isso explica a ocorrência de quebras, mas não ainda a existência de pontos fixos de quebra nas partículas. As partículas "descontínuas" ilustradas por Lee, demonstram claramente que a ruptura ocorre primeiramente na medula, isto é, na molécula gigante do ácido ribonucléico. Essa molécula, composta de uma cadeia muito grande, em que os nucleotídeos estão enquadados numa seqüência significativa, pode ser, no laboratório, decomposta pela ação de diversas substâncias químicas. Algumas dessas substâncias agem de maneira drástica, como o ácido clorídrico diluído ou uma solução fraca de álcali; sob a influência desta última, por exemplo, ocorre uma hidrólise completa de todas as ligações entre nucleotídeos, mas existem também substâncias que causam degradações mais limitadas e específicas na molécula. Entre estas, queremos mencionar aqui, baseando-nos no esquema apresentado por INGRAM⁸ (1966), apenas duas — a ribonuclease T₁, derivada da taka-diastase, e uma outra ribonuclease — a pancreática. A primeira delas rompe a cadeia do ácido nucléico num ponto em que um dos fragmentos resultantes termina em ácido guanílico. A ribonuclease pancreática tem especificidade para bases pirimidínicas (citosina e uracil).

Citamos os pontos específicos do ataque dos enzimas apenas como exemplos da ocorrência de ligações bioquimicamente distintas na cadeia da molécula do ácido ribonucléico, sem dispormos de prova alguma para a suposição de que tais ligações são vulneráveis a um impacto mecânico. Podemos até afirmar que nem todas as ligações, sujeitas à ação da ribonuclease, constituem pontos preferenciais de quebra, porque neste caso

provavelmente a partícula fragmentar-se-ia em grande número de pedaços pequenos. Mas assim mesmo achamos interessante chamar a atenção sobre a ocorrência, já provada, de ligações especificamente susceptíveis à ação da ribonuclease, porque, já que existem na molécula pontos bioquimicamente fracos, não é improvável que existam também pontos mecânicamente fracos.

RESUMO

No trabalho focaliza-se primeiramente o conceito do “tamanho normal” das partículas e em seguida discute-se a relação existente entre o método da preparação e o comprimento das partículas virais.

Preparações obtidas por métodos relativamente brandos (“dipping”, exsudação), quando observadas ao microscópio eletrônico contêm maiores porcentagens de partículas longas que preparações obtidas por métodos que envolvem grandes tensões mecânicas (ultra-centrifugação, ultra-som, temperatura elevada). Estas apresentam maior porcentagem de partículas pequenas, consistindo de bastonetes aproximadamente do mesmo comprimento. Isso está de acôrdo com a hipótese de que as partículas curtas, encontradas em preparações que envolvem tensões, são fragmentos das partículas longas. O tamanho uniforme dos fragmentos curtos sugere a ocorrência de pontos fracos nas partículas longas nas quais, sob tensão, a quebra poderia ocorrer. Tais observações são consideradas neste trabalho como provas indiretas da ocorrência de “pontos de quebra preferenciais” das partículas virais.

Finalmente são aduzidas observações da microscopia eletrônica a respeito de partículas chamadas “descontínuas”, isto é, em vias de ruptura. A ocorrência de tais partículas “descontínuas” e a relação existente entre o tamanho dos fragmentos são consideradas neste trabalho como provas diretas da existência de “pontos de quebra preferenciais” das partículas longas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATABEKOV, I. G.; NOVIKOV, V. K.; VISHNICHENKO, V. K. & KAFTANOVA, A. S. — Some properties of hybrid viruses reassembled in vitro. *Virology*, 41(3):519-32, 1970.
2. BRANDES, J. S. & WETTER, C. — Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology*, 8:99-115, 1959.
3. BURGI, E.; HERSHEY, A. O. & INGRAHAM, L. — Preferred breakage points in T₃ DNA molecules subjected to shear. *Virology*, 28:11-4, 1966.
4. CHICO, A. W. & GUTHRIE, J. W. — Changes in potato virus X particle length following purification by differential centrifugation. *Phytopathology*, 59:1021.
5. DE MONTGREMIER, H. A.; GRABAR, F. & CROISSANT, O. — Action des ultrasons sur des suspensions de virus X. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 238(6):722-4, 1954.
6. FRANCKI, R. I. B. — Some factors affecting particle length distribution in tobacco mosaic virus preparations. *Virology*, 30(3):388-96, 1968.
7. HIDAKA, Z. & KIRIYAMA, K. — Studies on the types of inactivation of purified tobacco mosaic virus. Experiments with temperature, sonic waves, formalin, extract from *Phytolacca americana* and bukulin extract from *Pachyma hoelen. Virus* [Kyoto Univ.] 3(1):30-50, 1953. Resumo em *Rev. Appl. Myc.*, 35(4):240, 1956.
8. INGRAM, V. M. — *The biosynthesis of macromolecules*. 2. ed. New York, W. Ar. Benjamin, 1966. 223 p.
9. KANNGIESSER, W. & DEUBNER, R. — Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kartoffel — X — Virus in gefriergetrocknetem Tabakrohsaft. *Naturwissenschaften*, 40(160):442-3, 1953.
10. KASSANIS, B. & MCCARTHY, D. — The quality of virus as affected by the ambient temperature. *J. Gen. Virol.* 1(4):425-40, 1967. Resumo em *Rev. Appl. Mycol.* 47:84, 1968.
11. LEE, P. E. — Partial purification of wheat striate mosaic virus and fine structural studies of the virus. *Virology*, 34:583-9, 1968.
12. McLAREN, A. D. & KLINKOWSKI, A. — Some gross changes in particles of tobacco mosaic virus caused by large doses of ultraviolet radiation. *J. Gen. Vir.*, 1:391-4, 1967.
13. OLIVEIRA, A. R. — *Sorologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão*. Campinas, S.P., Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1967. 40 p. Tese [dout.] Univ. S. Paulo.
14. ONDA, H.; TANIGUCHI, T. & MATSUI, C. — Polar stripping of tobacco mosaic virus by alkali. *Virology*, 42:551-3, 1970.

SILBERSCHMIDT, K. M.; WEIGL, D. R. & SALOMAO, T. A. — A ocorrência de "pontos de quebra preferenciais" em vírus alongados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:47-56, 1971.

15. ORLOB, G. B. — Morphological changes in tobacco mosaic virus after exposure to space. *Can. J. Microbiol.*, 15(2):245-6, 1968.
16. PAUL, H. L. & BODE, O. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. II. Vermessung der Teilchen von drei Stämmen des Rattle-virus. *Phytopath. Z.*, 24(3):341-51, 1955.
17. SCHRAMM, G. — Die Struktur des Tabakmosaikvirus und seiner Mutanten. *Adv. Enzymol.*, 15:449-84, 1954.
18. SILBERSCHMIDT, K. M.; WEIGL, D. R. & SALOMÃO, T. A. — Electron microscopic observations on the causal agent of the Brazilian tomato ringspot disease. *Phytopath. Z.*, 60:278-90, 1967.
19. SILBERSCHMIDT, K. M.; WEIGL, D. R. & SALOMAO, T. A. — Breaking points of particles in electronmicroscopic preparations of a strain of Tobacco rattle virus (TRV). *Phytopath. Mediterranea*, 8(1):45-50, 1969.

Recebido para publicação em 16 de julho de 1971.

AÇÃO DO FERRO SOBRE O GRUPO DOS POXVIRUS IN VITRO (1)

ACTION OF IRON ON THE POX VIRUS GROUP IN VITRO

MARTA IRENA MALACHOWSKA (2)
ADELA ROTH (2)

SUMMARY

In experiments with embryonated hen eggs and continuous line of human kidneys cells was demonstrated a inhibitory action of iron-glycerophosphate on the pox virus group.

INTRODUÇÃO

Últimamente foram publicados vários trabalhos sobre substâncias antivirais^{4, 5, 7, 13, 15, 16} e realizadas pesquisas sobre a ação de metais leves na membrana celular^{8, 18}. Por outro lado, os cations de ferro são conhecidos como inibidores de produção de toxinas de várias bactérias como *Clostridium perfringens* e *Corynebacteriae diphtheriae*^{1, 5, 6, 11, 14, 19}.

Também foi demonstrado que o vírus da influenza foi quantitativamente absorvido pelo óxido de ferro¹⁷, e é conhecida a ação inibidora dos cations de ferro sobre os vírus de plantas e animais^{2, 10, 12}.

Neste trabalho apresentamos os resultados da ação dos cations do ferro sobre os poxvírus em culturas celulares e em ovos embrionados de galinha.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus

Usamos o vírus da *Variola major*, cepa Harvey, *Variola minor*, cepa Butler e o vírus vacínico usado no Instituto Butantã para produção de vacinas, todos adaptados a membranas coriolantóides com passagens em nosso laboratório em ovos e em culturas celulares. Os títulos de *V. major* e *V. minor* foram

iguais, isto é, em ovos 10^6 e em culturas celulares 10^5 ; o título do vírus vacínico, em ovos, foi de 10^5 e, em culturas celulares, 10^4 , todos em 0,1 ml.

Culturas celulares

Usamos linhagem contínua de células de rim humano (RH) originárias de Ness Zion, Israel, mantidas pelo laboratório de culturas celulares de nosso Serviço.

Meios

Como meio de manutenção usamos o de Hanks com 2% de soro de vitelo (HNV 2%).

Ovos

Foram usados ovos embrionados de galinha de 10-11 dias de incubação e a inoculação foi feita na membrana coriolantóide, pela técnica usual.

Ferro

Dos diversos sais de ferro, escolhemos o glicerosfosfato de ferro (GFF) que é facilmente solúvel. Como solvente, usamos salina tamponada estéril (PBS), ajustando-se com bicarbonato de sódio o pH da solução para 7,2-7,4. Em experiências preliminares verificamos a quantidade de sal de ferro a

(1) Trabalho realizado no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.
(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

ser usada na inoculação. Com doses variáveis, observamos que a dose máxima não nociva para ovo embrionado de galinha foi de 500 γ ; para culturas celulares, foi de 100 γ por tubo e de 300 γ por frasco de 60 ml.

Teste de ação do ferro

Em ovos — Uma mistura de 40-80 partículas de vírus em 0,1 ml, com 500 γ de glicerosfato de ferro em 0,1 ml, inoculava-se numa série de 12-15 ovos para cada vírus, em quantidade de 0,2 ml por ovo. Após 3 dias de incubação a 36°C, abriam-se os ovos para contagem das lesões nas membranas corioalantóides. Simultaneamente abriam-se os ovos controle inoculados só com vírus.

Em cultura de tecidos — De frascos de 60 ml com culturas de células RH retirava-se o meio e inoculava-se com 0,3 ml de vírus previamente titulado. Em seguida, adicionavam-se 300 γ de GFF dissolvido em PBS na concentração de 100 γ /0,1 ml. Após 1 hora, de contacto em temperatura ambiente, adicionavam-se 10 ml do meio nutritivo e incubavam-se as culturas em estufa a 37°C, durante 6 dias. Para cada vírus usava-se uma série de 10-12 frascos. O mesmo número de culturas foi inoculado só com vírus para controle. As culturas eram observadas diariamente. No 6.º dia, após a retirada do meio, as culturas foram coradas pelo método de LINDENMANN⁹ e contaram-se as lesões. Os experimentos foram realizados também em tubos com células RH, usando uma série de 10 tubos para cada vírus. O procedimento foi o mesmo usado para os frascos, inoculando-se 0,1 ml de vírus previamente titulado e 100 γ de GFF/tubo.

As inoculações foram realizadas da seguinte maneira:

1. Inoculava-se o vírus simultaneamente com o GFF.
2. Colocava-se o GFF 24 horas antes da inoculação.
3. Deixava-se o GFF 24 horas em contacto com culturas, em seguida retirava-se

o meio de manutenção, inoculava-se o vírus e, após 1 hora de contacto, adicionava-se novo meio de manutenção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas experiências em ovos, observamos nítida diminuição do número das lesões nas membranas corioalantóides inoculadas com vírus mais GFF quando comparadas com controles inoculados só com vírus.

O quadro I ilustra os resultados de um dos experimentos escolhidos ao acaso.

QUADRO I

Número de lesões nas membranas corioalantóides inoculadas com vírus vacínico

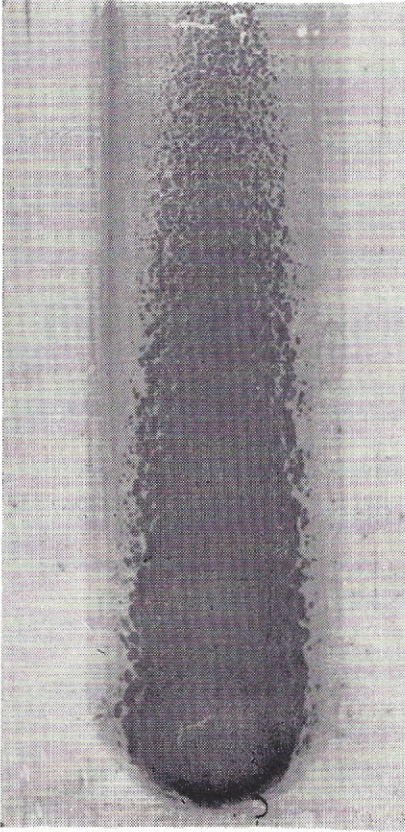
| Ovos n.º | Vírus 0,1 ml | Vírus 0,1 ml + 500 γ GFF |
|-------------|-----------------|------------------------------------|
| 1 | 30 | 10 |
| 2 | 80 | 10 |
| 3 | 32 | 10 |
| 4 | 42 | 0 |
| 5 | 64 | 5 |
| 6 | 20 | 7 |
| 7 | 72 | 10 |
| 8 | 51 | 4 |
| 9 | 33 | 0 |
| 10 | 54 | 0 |
| 11 | 60 | 2 |
| 12 | 30 | 0 |
| 13 | 22 | 0 |
| 14 | 42 | 3 |
| Total | 635 | 61 |
| Média | 45,35 | 4,35 |

"t" calculado = 8,939

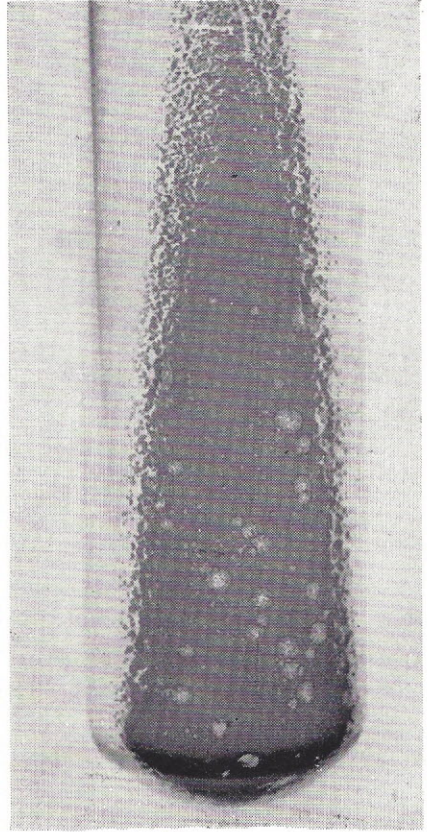
"t" tabelado = 2,779

P = 0,01

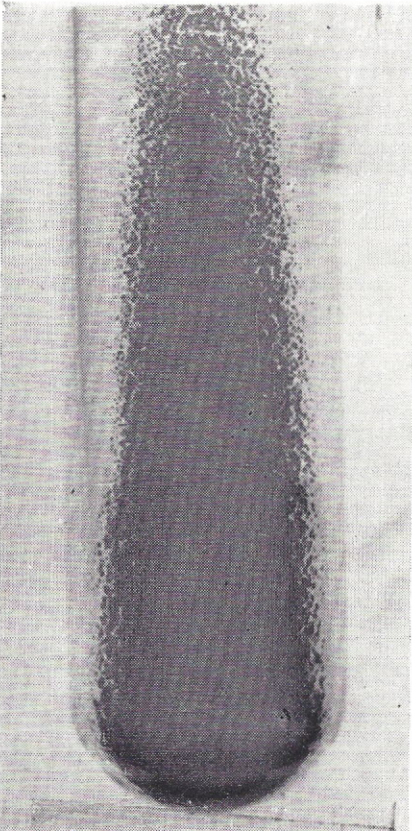
Embora obtivéssemos resultados significantes, deixamos de trabalhar com ovos por causa da variação dos números obtidos nos experimentos, e pelas grandes diferenças entre esses números. Dos frascos com culturas celulares, onde foi inoculado o vírus e GFF, simultaneamente, obtivemos os resultados expostos nos quadros II e III.



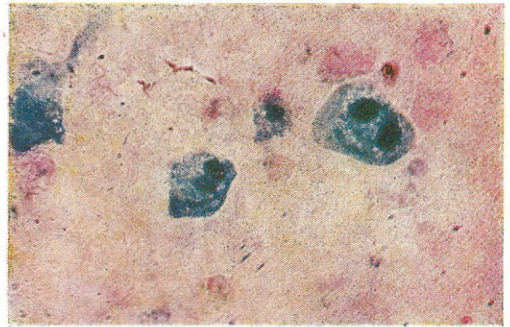
Células normais



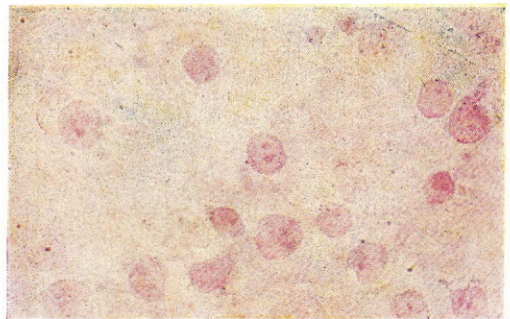
Contrôle do vírus



Vírus com ferro



Vírus com ferro



Contrôle

QUADRO II

Número de lesões em culturas celulares inoculadas com vírus vacínico

| Frascos n.º | Vírus 0,1 ml | Vírus 0,1 ml + 300 γ GFF |
|-------------|--------------|---------------------------------|
| 1 | 45 | 6 |
| 2 | 49 | 4 |
| 3 | 41 | 5 |
| 4 | 21 | 5 |
| 5 | 42 | 2 |
| 6 | 45 | 4 |
| 7 | 48 | 3 |
| 8 | 49 | 1 |
| 9 | 36 | 5 |
| 10 | 56 | 1 |
| Total | 432 | 36 |
| Média | 43,2 | 3,6 |

"t" calculado = 5,380

"t" tabelado = 2,878

P = 0,01

QUADRO III

Número de lesões em culturas celulares inoculadas com vírus variola (Harvey)

| Frascos n.º | Vírus 0,1 ml | Vírus 0,1 ml + 300 γ GFF |
|-------------|--------------|---------------------------------|
| 1 | 42 | 8 |
| 2 | 88 | 7 |
| 3 | 60 | 12 |
| 4 | 40 | 11 |
| 5 | 58 | 10 |
| 6 | 66 | 12 |
| 7 | 39 | 7 |
| 8 | 60 | 7 |
| 9 | 44 | 5 |
| 10 | 30 | 6 |
| 11 | 61 | 6 |
| 12 | 60 | 5 |
| Total | 648 | 96 |
| Média | 54 | 8 |

"t" calculado = 9,8

"t" tabelado = 2,51

P = 0,01

QUADRO IV

Resultado dos experimentos feitos com 10 tubos nos quais foi colocado o GFF, 24 horas antes da inoculação do vírus vacínico

| Vírus vacínico ml | GFF γ | Média das lesões |
|-------------------|--------------|------------------|
| 0,1 | — | 43,2 |
| 0,1 | 100 | 5,3 |

Outros resultados obtivemos em experimentos nos quais deixávamos o GFF nas células, 24 horas, retirávamos o meio, e inoculávamos o vírus. O quadro V ilustra o resultado:

QUADRO V

Resultado dos experimentos feitos com 10 tubos nos quais foi colocado o GFF e, após 24 horas, retirado o meio e inoculado o vírus vacínico.

| Vírus vacínico ml | GFF γ | Média das lesões |
|-------------------|--------------|------------------|
| 0,1 | — | 43,2 |
| 0,1 | 100 | 23,3 |

Nossas observações demonstram que o cation de ferro na forma de glicerofosfato de ferro exerce ação inibidora de crescimento nos vírus usados, tanto nos ovos embrionados de galinha como nas culturas celulares, conforme demonstram os resultados altamente significativos obtidos pela aplicação do teste Student "t".

Foi observada nítida inibição dos vírus nos experimentos em que o vírus e ferro foram inoculados simultaneamente. Uma inibição em grau menor, porém também significativa, foi observada quando o GFF foi deixado durante 24 horas em contacto com as células, antes da inoculação do vírus. Nos experimentos onde após 24 horas da inoculação de GFF retirávamos o meio e inoculávamos o vírus, observamos diminuída inibição do número de lesões produzidas pelo vírus. Poderíamos supor que somente parte do ferro foi aproveitada pelas células, enquanto que a maior parte ficou no meio. Posteriormente, foi verificada a presença de ferro nas

células, pelo método histoquímico específico de Gomori. Nas células tratadas com ferro e simultaneamente inoculados com vírus, verificou-se coloração azul intensa nos núcleos e leve cor azulada no citoplasma, indicando localização preferencial do metal.

Os esclarecimentos do mecanismo da função inibidora de cation de ferro exige estudos bioquímicos que já foram iniciados.

RESUMO

Em experiências com ovos embrionados de galinha e em linhagem contínua de sistema celular de rim humano, foi demonstrada a ação inibidora de glicerofosfato de ferro sobre amostras de poxvirus.

Agradecimentos — As autoras agradecem ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes pelas críticas e sugestões formuladas durante o trabalho; à Sra. Adriana Manginelli Massignani, pelo ótimo trabalho de coloração das culturas e aos Srs. José Olavo de Freitas Júnior e José Vitor Jankevicius pela ajuda no cálculo estatístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKSDALE, L. — *Corynebacteriae diphtheriae* and its relatives. *Bact. Rev.* 34 (4):368-422, 1970. [Iron and *C. diphtheriae*, p. 398.]
2. BAWDEN, F. C. & PIRIE, N. W. — The infectivity and inactivation of nucleic acid preparations from tobacco mosaic virus. *J. Gen. Microbiol.*, 21:438-53, 1959.
3. CHRISTENSEN, P. E. — Studies on toxigenicity in *C. diphtheriae*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 41:56-66, 1957.
4. EATON, M. D. & SCALA, A. R. — Inhibitory effect of glutamine and ammonia on replication of influenza virus in ascitis tumor cells. *Virology*, 13:300-307, 1961.
5. HERRMANN JR., E. C. & ROSSELET, J. P. — Method for detecting antiviral agents on paper chromatograms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104:304-9, 1960.
6. JANOFF, A. & ZWEIFACH, B. W. — Inactivation of bacterial exotoxins and endotoxin by iron. *J. Exp. Med.*, 112:23-34, 1960.
7. KAUFMAN, H. E. & MALONEY, E. D. — Therapeutic anti-viral activity in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112:4-7, 1963.
8. LABORIT, H. & LABORIT, G. — Excitabilité neuro-musculaire et équilibre Jonique. Paris, Masson, 1955.
9. LINDENMANN, J. & GIFFORD, G. E. — Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon. I. Dynamics of plaque formation by vaccinia virus. *Virology*, 19:283-93, 1963.
10. NORTH, C. P.; WALLACE, A.; RYAN, G. F. & MUELLER, R. T. — Amelioration of virus symptoms in *Camellia* with iron. *Virology*, 8:131-7, 1959.
11. PAPPENHEIMER JUN., A. M.; MILLER, P. A. & MASAHICO, Y. — Kinetics of diphtheria toxin formation. *J. Gen. Microbiol.*, 28:531-9, 1962.
12. PUCK, T. T.; GAREN, A. & CLINE, J. — The mechanism of virus attachment to host cells. I. The role of ions in the primary reaction. *J. Exp. Med.*, 93:65-88, 1951.
13. RIBEIRO DO VALLE, L. A.; MELO, P. R.; GOMES, L. F. S. & PROENÇA, L. M. — Methisazone in prevention of variola minor among contacts. *Lancet*, 2:976, 9, 1965.
14. SINGER, B. & FRAENKEL-CONRAT, H. — Effects of light in the presence of iron salts on ribonucleic acid and model compounds. *Biochemistry*, 4:226, 1965.
15. TAKEMOTO, K. K. & FABISCH, P. — Inhibition of herpes virus by natural and synthetic acid polysaccharides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 116:140-4, 1964.
16. VAHERI, A. & CANTELL, C. — The effect of heparin on herpes simplex virus. *Virology*, 21:661-2, 1963.
17. WARREN, J.; NEAL, A. & RENNELS, D. — Adsorption of myxoviruses on magnetic iron oxides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121:1250-3, 1966.
18. WEINBERG, E. D. — Roles of metallic ions in host-parasite interactions. *Bact. Rev.*, 30:136-51, 1966.
19. YONEDA, M. — A new culture method designed for kinetic studies on diphtheria toxin production. *Brit. J. Exp. Path.*, 38:190-3, 1957.

RESÍDUOS DE PESTICIDAS CLORADOS EM CONSERVAS DE CARNE BOVINA ⁽¹⁾

CHLORINATED PESTICIDE RESIDUES IN PRESERVED MEAT

WALKYRIA H. LARA ⁽²⁾
HELOISA H. C. BARRETO ⁽²⁾
MICKIKO Y. TAKAHASHI ⁽²⁾

SUMMARY

A total of 120 samples of preserved meat were analysed for chlorinated pesticide residues by gas chromatographic methods. The alpha, beta and gamma isomers of BHC were found in all samples. The delta isomer was found only in very small amounts in the majority of samples. The amounts of total BHC (on fat) varied from 0.02 to 1.69 ppm with an average of 0.39 ppm. This represents an appreciable degree of contamination. In general it was found that "corned beef" which contains deposit fat shows higher values than the "roast beef" which contains interstitial fat.

INTRODUÇÃO

Durante os últimos trinta anos, o uso de um grande número de substâncias tóxicas na agricultura e pecuária, como os inseticidas, fungicidas, herbicidas e acaricidas, trouxe de um lado, benefícios para a produção e proteção de alimento mas, de outro lado, novos problemas. Estas substâncias tóxicas, acumulando-se em pequenas quantidades no solo, águas, plantas e animais constituem os resíduos de pesticidas.

Com os estudos toxicológicos já realizados, a melhoria dos métodos de detecção de resíduos, a síntese de novos produtos mais específicos e que deixam menos resíduos, foram estabelecidos limites de tolerância para resíduos de pesticidas nos mais variados alimentos e rações para animais.

Na década de 60, inúmeros levantamentos foram feitos em vários países, a fim de determinar resíduos de pesticidas nos mais variados alimentos e rações e em séres humanos ^{1, 4, 5, 6, 7, 8, 9}.

No Brasil, onde o uso de pesticidas clorados somente agora vem sendo substituído por fosforados e onde o controle do uso correto de pesticidas é dificultado por inúmeras razões — falta de conhecimentos por parte dos aplicadores, e a extensão do país — é de grande importância o levantamento de dados a respeito de resíduos de pesticidas em alimentos, a fim de se ter conhecimento da situação existente, ou melhor, do grau de contaminação já alcançado.

ALMEIDA e BARRETO ², em determinações em leite consumido na cidade de São Paulo, verificaram a presença constante de resíduos de BHC em todas as amostras analisadas.

O presente trabalho mostra os resultados do controle de conservas de carne bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 120 amostras de conserva de carne bovina, enlatada, para exportação; 45, de "Corned Beef", 45 de "Roast Beef" e 30, de "Chopped Beef" que, no mercado interno, são vendidas com o nome de

(1) Trabalho realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz. Apresentado na 23.^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Curitiba, Paraná, 1971.

(2) Da Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz.

“Carne Bovina em Conserva” “Carne Assada com Mólho” e “Fiambre de Carne Bovina”. Essas amostras correspondem a uma produção de 3.000 toneladas de conservas, de um frigorífico de São Paulo que recebe gado procedente de vários pontos do estado, da região norte e noroeste.

Os métodos de análise empregados foram, em linhas gerais, os descritos nos “Métodos Oficiais da A.O.A.C.”³.

Compreendem a preparação e homogeneização da amostra, a extração com solventes, da gordura e dos pesticidas dissolvidos na gordura, a separação dos pesticidas por partição em acetronitrila, a cromatografia em coluna de Florisil, a concentração dos eluatos e a determinação em cromatografia em fase gasosa com detector de captura eletrônica.

Na eluição dos resíduos na coluna de Florisil foi empregada uma solução a 6%, e a seguir uma, a 15%, de éter etílico em éter de petróleo 30-60°C. Na primeira, *fração A*, podem ser encontrados os seguintes resíduos: aldrin, BHC, clordana, heptaclor, heptaclor epóxido, DDT; na segunda, *fração B*, endrin, dieldrin e endosulfan.

Para a cromatografia em fase gasosa foi usado um aparelho Varian Aerograph modelo 2100-00, com colunas de vidro em forma de U, de 1/4 de polegada de diâmetro interno, 6 pés de comprimento, uma com 2,5% QF-1 e 2,5% DC-200 em 100/120 Aeropack 30 e outra com OV, 225.

As condições de otimização foram: 210°C para a temperatura do detector, 200°C para o injetor e 190°C para a coluna, e fluxo de nitrogênio igual a 30 ml por minuto. A iden-

tificação dos picos encontrados nos cromatogramas foi feita pela comparação dos tempos de retenção com padrões submetidos às mesmas condições de análise, nas duas colunas. A determinação quantitativa foi feita pelo método de comparação de áreas.

Os resultados são expressos em partes por milhão e calculados para a gordura da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em tôdas as amostras analisadas foram encontrados resíduos de BHC (alfa, beta, gama e delta isômeros, sendo o delta quase sempre abaixo de 0,01 p.p.m.).

Em algumas amostras, o cromatograma da *fração A* mostrou um pico com tempo de retenção próximo ao do aldrin, na coluna de QF-1 e DC-200, mas distinto deste na coluna de OV 225. Este pico não pôde ser identificado e não corresponde a nenhum dos padrões disponíveis.

Nos cromatogramas da *fração B* não foram detectados resíduos de aldrin ou dieldrin. Em algumas amostras, apareceu um pico amplo, após 60 min. e, por ser o único componente, procuramos identificá-lo por meio de espectro de absorção no Infra-vermelho. O espectro obtido da *fração* concentrada leva a crer que seja um glicérideo. Este provavelmente foi eluído na coluna de Florisil juntamente com os resíduos.

Os resultados de tôdas as amostras para o BHC total, isto é, a soma do alfa, beta, gama e delta isômeros encontrados, estão resumidos no quadro:

BHC total na gordura

| Amostras Conserva | N.º | Menor valor encontrado p.p.m. | Maior valor encontrado p.p.m. | Média aritmética de todos os valores p.p.m. | % de amostras acima de 0,3 p.p.m |
|-------------------|-----|-------------------------------|-------------------------------|---|----------------------------------|
| Corned Beef | 45 | 0,02 | 1,20 | 0,40 | 60 |
| Chopped Beef | 30 | 0,02 | 1,30 | 0,37 | 66 |
| Roast Beef | 45 | 0,02 | 1,69 | 0,41 | 46 |

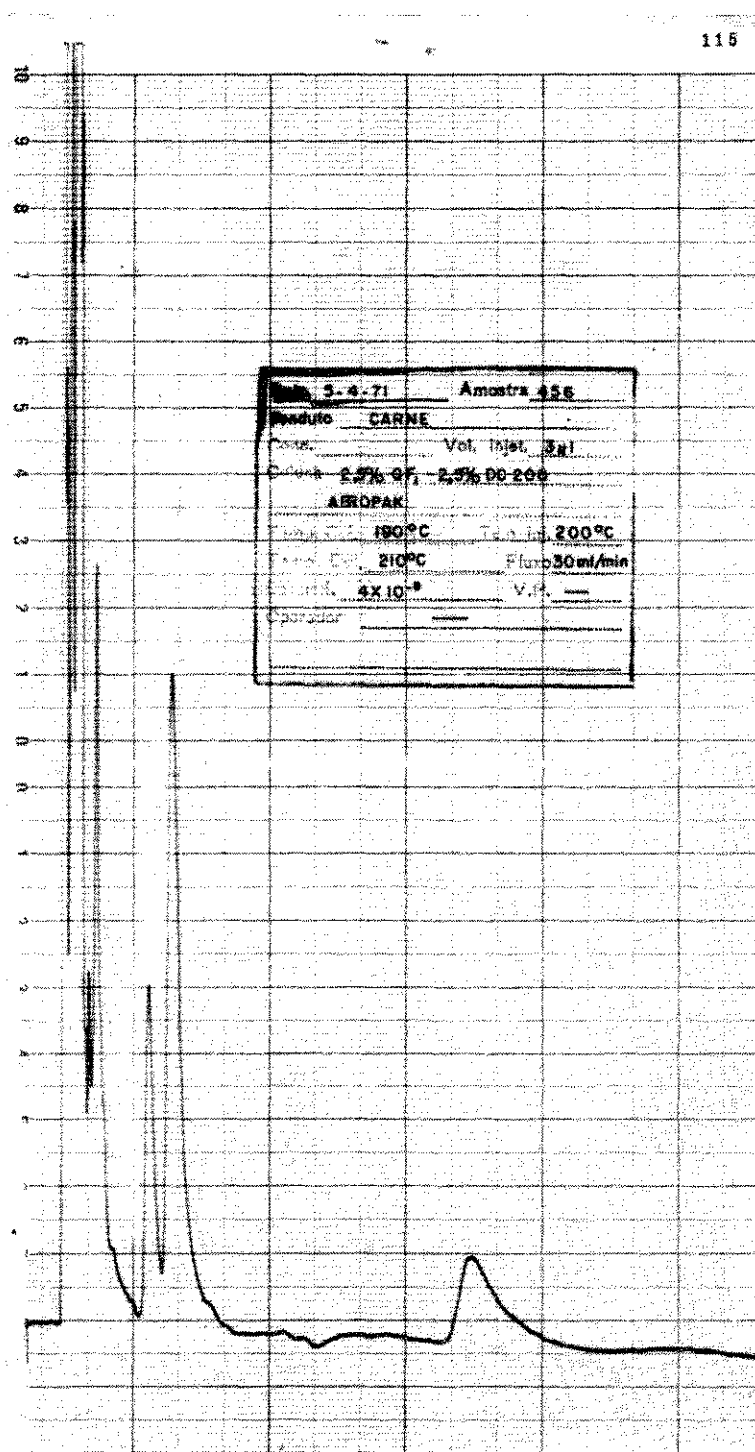


Fig. 1 — Cromatograma de uma fração A com os picos de solventes seguidos do pico de alfa BHC, beta mais gama BHC, e o pico não identificado (QF-1. DC-200).

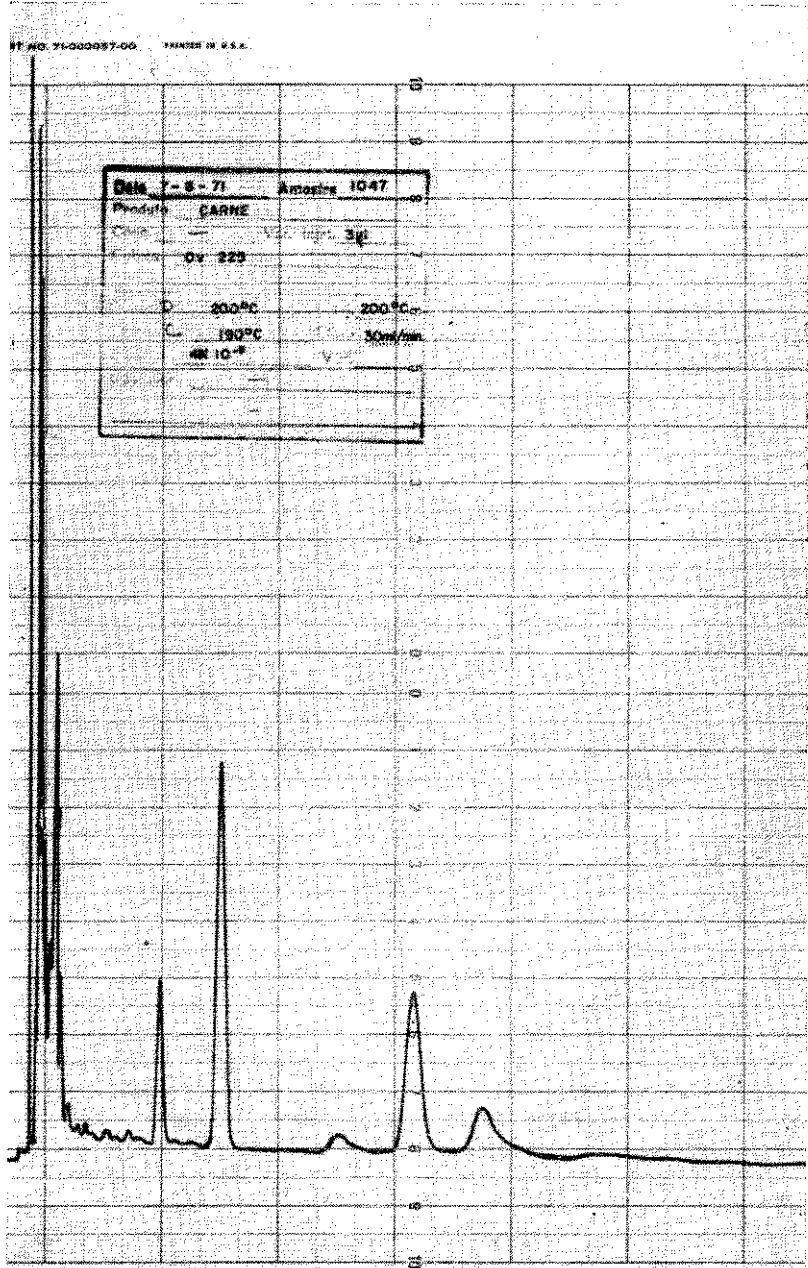


Fig. 2 — Cromatografia de uma *Fração A*, com os picos de solventes seguidos de pico de alfa BHC, gama BHC, picos não identificados, e beta mais delta BHC (coluna OV, 225).

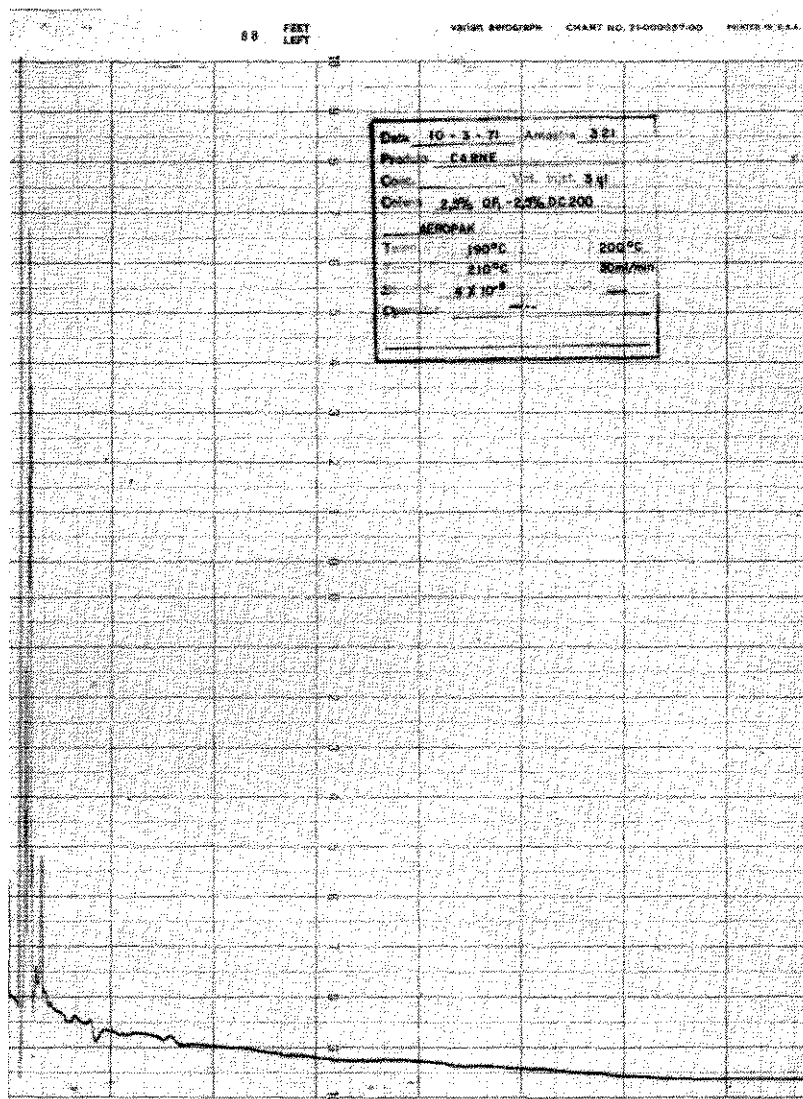


Fig. 3 — Cromatografia de uma *Fração B* com os picos dos solventes.

Os cromatogramas das figuras 1 e 2 mostram os picos correspondentes a uma *fração A* onde aparece o que não pôde ser identificado; e o da fig. 3 corresponde a uma *fração B* onde aparecem apenas os picos dos solventes.

Dos valores obtidos, um dado interessante se refere à diferença no resíduo de BHC, em relação ao tipo de gordura da carne. O "Roast Beef" é obtido de carne magra, apenas com gordura intersticial, branca, enquanto que o "Corned Beef" é obtido de carne

mais gorda, com gordura de depósito, amarela.

Examinando os gráficos, fig. 4, em que se relacionam os valores, em partes por milhão de BHC total, até o valor de 0,95 p.p.m., com o número de amostras, vemos a distribuição dos valores encontrados para as amostras de "Roast Beef" e "Corned Beef" bem distintas. Os gráficos da fig. 5 mostram a distribuição para o isômero alfa nas mesmas amostras e, neste caso, são mais semelhantes e, na maioria, abaixo de 0,3 p.p.m.

GRÁFICO I

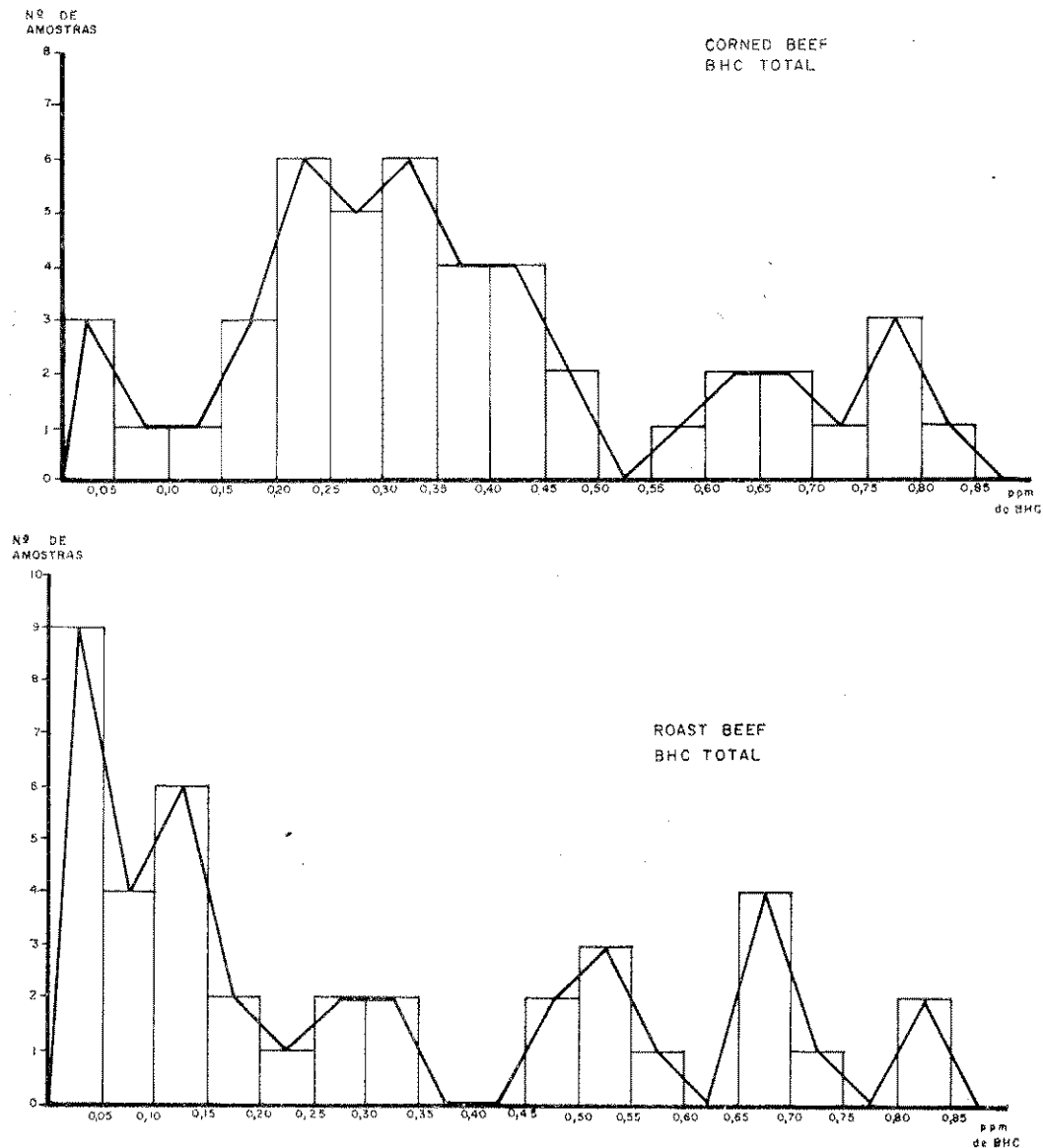


Fig. 4

Os valores para o BHC total variaram desde 0,02 p.p.m. até 1,69 p.p.m. Pelo exame dos gráficos pode-se ver que não há uma distribuição regular dos resíduos, mas em média estão em valores acima de 0,3 p.p.m. que é um limite prático em algumas legislações. Também são mais elevados que alguns referidos em levantamentos feitos em outros países^{5, 9}. Em relação à le-

gislação brasileira, vigente, estão em desacôrdo, pois não é tolerado nenhum limite para resíduos de "hexacloreto de benzeno" (BHC) em carne e derivados (Tabela II de Decreto 55.871 de 26-3-65 modificada pela Resolução n.º 23/66 da C.N.N.P.A.).

É difícil precisar qual seja a origem dos resíduos, pois as informações são contradi-

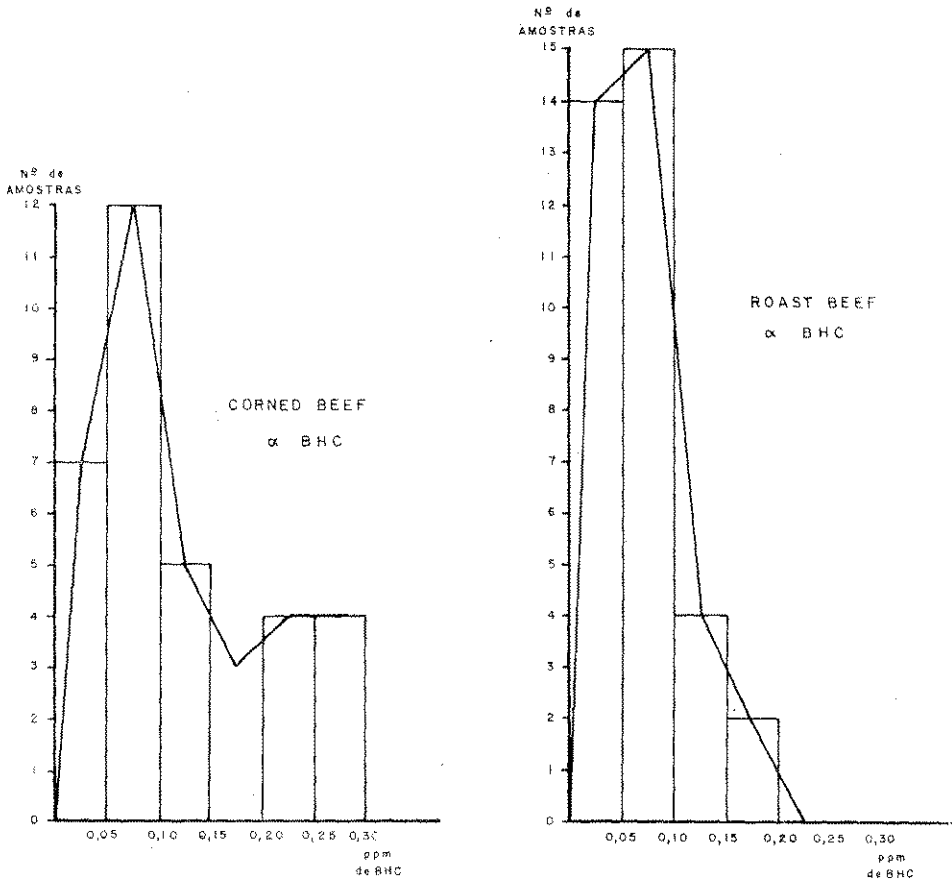


Fig. 5

tórias. Algumas confirmam o uso do BHC em vários produtos pecuários (tratamento de bernes, carrapatos) e outras, que a maioria das atuais pastagens já foi campo de cultivo de algodão onde se empregou largamente BHC no combate à lagarta do algodão.

RESUMO

Usando técnicas cromatográficas, 120 amostras de conservas de carne bovina foram analisadas para determinação de resíduos de pesticidas clorados. Em tôdas foram detectados os isômeros alfa, beta, gama e delta do hexaclorociclohexano (BHC). Os valores variaram de 0,02 a 1,69 p.p.m. para BHC total, na gordura, sendo os valores de delta BHC baixos — menos de 0,01 p.p.m. — na maioria das amostras. A média aritmética dos valores obtidos é de 0,39 p.p.m. para BHC total o que representa um grau de

contaminação bastante apreciável. Os resultados mostram uma relação entre a natureza da gordura da amostra (de depósito em "Corned Beef" e intersticial em "Roast Beef") e o resíduo de BHC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, D. C.; GOULDING, R. & TATTON, J. O'G. — Organochlorine pesticide residues in human fat in Great Britain. *Brit. Med. J.*, 3:146-9, 1968.
2. ALMEIDA, M. E. W. & BARRETO, H. H. C. — Resíduos de pesticidas clorados em leite de consumo em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31, 1971. No prelo.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official Methods of Analysis*. 11.ed. Washington, A.O.A.C., 1970.

LARA, W. H.; BARRETO, H. C. C. & TAKAHASHI, M. Y. — Resíduos de pesticidas clorados em conservas de carne bovina. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:63-70, 1971.

4. DALE, W. E. & QUIMBY, C. E. — Chlorinated insecticides in the body fat of people in the United States — *Science*, 142:593-5, 1963.
5. DICKES, G. J. & NICHOLAS, P. V. — A survey of selected foodstuffs (for certain pesticide residues). *J. Ass. Publ. Anal.*, 14:21, 1969.
6. DUGGAN, R. E. — Residues in food and feed. Chlorinated pesticide residues in fluid milk and other dairy products in the United States. *Pest. Monit. J.*, 1(3):2-8, 1967.
7. EGAN, H.; GOULDING, R.; ROBURN, J. & TATTON, J. O'G. — Orgachlorine pesticide residues in human fat and human milk. *Brit. Med. J.*, 2:66-9, 1965.
8. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION — Evaluations of some pesticide residues in food. Genève, WHO, 1968. [FAO/PL 1968/M/9/; WHO/FOOD/ADD/69.35]
9. RUZICKA, J. H. A.; SIMMONS, J. H. & TATTON, J. O'G. — Pesticide residues in foodstuffs in Great Britain. IV. Organochlorine residues in pesticide welfare foods. *J. Sci. Fd. Agric.* 18:579-82, 1967.

Recebido para publicação em 4 de agosto de 1971

ELETROFORESE SÔBRE ACETATO DE CELULOSE (CAF).
REPRODUTIBILIDADE E VALORES NORMAIS ⁽¹⁾

CELLULOSE-ACETATE ELECTROPHORESIS (CAF). REPRODUCIBILITY
AND RANGE OF NORMALITY

CELIDÉIA A. COPPI VAZ ⁽²⁾
RUBENS GUILMARÃES FERRI ⁽³⁾
NIKOLAUS GEISDHOFEL ⁽⁴⁾
ALCIRA NANCY DE PAULA CAMPOS ⁽⁵⁾

S U M M A R Y

The authors present a study of the reproducibility of the cellulose-acetate electrophoresis and the establishment of the range of normality for each component by statistical analysis.

Comparative analysis were made by paper and cellulose-acetate electrophoresis with the same samples.

Reproducibility of the method was considered excellent when carefully used.

The authors' results were very similar to those obtained by Knedel, and to the Tiselius' free electrophoresis.

INTRODUÇÃO

Acetato de celulose foi introduzido para substituir o papel de filtro como suporte para eletroforese, principalmente por não adsorver proteína como o primeiro. Em virtude disto não se forma, durante a migração, um tapete de Albumina (trailing) sobre o qual migram as frações menos rápidas. Os componentes se localizam em faixas mais definidas e a separação permite uma densitometria mais exata em virtude da excelente transparência e ausência de coloração de fundo (back-ground). No caso do papel, a albumina adsorvida contribui para diminuir o valor deste componente no eletroferograma.

Pelos métodos inicialmente propostos para eletroforese sobre acetato, como os de KOHN⁷, utilizavam-se faixas largas e a densitometria se fazia nos aparelhos convencionais tornan-

do o método dispendioso, razão pela qual vários modelos de aparelhos têm permitido ultimamente a realização de microtécnicas, com grande economia de acetato de celulose e de todos os reagentes.

Mais recentemente KNEDEL⁶ propôs modificações na metodologia de trabalho com acetato de celulose utilizando densitômetro especialmente construído, de modo a permitir leitura de extinção de zero a 1,1, muito embora seja mais aconselhável a utilização da faixa de extinção de zero a 0,8. Em virtude disto, a quantidade de proteína a ser aplicada fica extremamente reduzida em relação aos métodos convencionais; no caso de soro, aplicam-se aproximadamente 0,05 microlitros.

TAUCH⁹ estudou a reprodutibilidade e selecionou corantes verificando que no caso

(1) Realizado no Centro de Pesquisas Imunoquímicas da Fac. Med. Univ. São Paulo.

(2) Do Instituto de Biociências da U.S.P.

(3) Responsável pelo Centro de Pesquisas Imunoquímicas do Depto. Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

(4) Diretor do Depto. de Assistência Técnica da Carl Zeiss Cia. — Óptica e Mecânica.

(5) Do Centro de Pesquisas Imunoquímicas da Fac. Med. Univ. São Paulo.

do amidoschwarz 10 B a relação entre absorção de corante e quantidade de proteína é praticamente linear, seguindo a lei de Lambert e Beer.

Como os valores da literatura se referem a populações de outros países, realizamos no Centro de Pesquisas Imunoquímicas um estudo de reprodutibilidade ao lado do estabelecimento da faixa de normalidade.

Alguns tipos de acetato de celulose com características várias têm sido produzidos e muitos são os trabalhos em que êstes suportes são utilizados para rotina eletroforética ou investigação científica^{2, 3, 4, 5}.

MATERIAL E MÉTODOS

1. 18 amostras de sôro de indivíduos adultos foram analisadas quanto ao teor protéico e frações eletroforéticas.

2. Proteínas totais foram dosadas pelo método de GORNALL *et alii*¹.

3. A corrida eletroforética foi realizada na câmara Mikrophor-Boshcamp utilizando o aplicador de 0,05 microlitros, durante 20 minutos com 2 mA por membrana de acetato (CAF) de 25,5x145 mm, em tampão veronal-acetato, pH 8,6 e força iônica 0,06.

4. Após coloração com amidoschwarz 10 B e diferenciação com metanol-ácido acético (9:1), as fitas foram diafanizadas em dioxana-isobutanol (7:3) durante 2-4 minutos e aquecidas a 70-80°C por 15 minutos.

5. Densitometria e integração foram feitas simultaneamente em registrador de extinção e integrador combinados (Zeiss, modelo EI-3).

6. Reprodutibilidade foi verificada analisando 10 vezes a mesma amostra de sôro.

7. A faixa de normalidade para cada fração, determinada por eletroforese em acetato, foi estabelecida considerando os 95% como intervalo de confiança (1,96 S). Os soros escolhidos para o estabelecimento da faixa foram previamente selecionados por eletroforese sôbre papel de filtro.

RESULTADOS

Reprodutibilidade

Os valores das frações eletroforéticas, reproduzida a análise da mesma amostra 10 vezes, apresentaram-se homogêneos para cada fração (Quadro I).

QUADRO I

Reprodutibilidade do método

| Análise n.º | Pré-Albúmina | Albúmina | Alfa 1 | Alfa 2 | Beta | Gama |
|-------------|--------------|----------|--------|--------|------|------|
| 1 | 1,5 | 62,5 | 3,0 | 5,5 | 9,0 | 18,5 |
| 2 | 1,5 | 62,0 | 3,0 | 5,5 | 9,5 | 18,5 |
| 3 | 1,5 | 62,0 | 3,0 | 5,0 | 10,0 | 18,5 |
| 4 | 1,5 | 62,0 | 2,5 | 5,0 | 10,5 | 18,5 |
| 5 | 1,5 | 62,5 | 2,5 | 5,5 | 10,0 | 18,0 |
| 6 | 1,5 | 63,0 | 2,5 | 6,0 | 11,0 | 16,0 |
| 7 | 1,5 | 62,5 | 2,5 | 6,5 | 11,0 | 16,0 |
| 8 | 1,5 | 62,5 | 2,5 | 6,5 | 10,5 | 16,5 |
| 9 | 1,5 | 63,0 | 2,5 | 6,0 | 10,0 | 17,0 |
| 10 | 1,5 | 62,5 | 2,5 | 6,0 | 10,5 | 17,0 |

Faixa de normalidade

No quadro II são apresentados todos os valores em percentagem relativa e gramas/100 ml, de cada fração, para eletroforese em acetato de celulose e sôbre papel de filtro.

Os componentes reveláveis em CAF são os habituais da eletroforese sôbre papel de filtro, acrescidos de pré-albumina.

Os valores médios e os respectivos desvios padrão (1S) para cada componente, em percentuais e gramas/100 ml de sôro, encontram-se no Quadro III.

A faixa de normalidade para cada fração foi estabelecida, tomando-se como afastamento das médias 1,96 S, isto é, praticamente 2 desvios padrão. Êstes resultados estão resumidos no Quadro IV.

QUADRO II

Resultados da eletroforese sobre papel de filtro e acetato de celulose

| Soro n.º | Porcentagem relativa | | | | | | | | | | | Gramas por 100 ml de soro | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------------------|------|------------|------------|---------|----------|-----------------|------------|------------|---------|----------|---------------------------|---------------------|------|------------|------------|---------|----------|-----------------|------------|------------|---------|----------|
| | Acetato de celulose | | | | | | Papel de filtro | | | | | P.T. | Acetato de celulose | | | | | | Papel de filtro | | | | |
| | Pré A | A | α_1 | α_2 | β | γ | A | α_1 | α_2 | β | γ | | Pré A | A | α_1 | α_2 | β | γ | A | α_1 | α_2 | β | γ |
| 1 | | 71,5 | 1,5 | 5,5 | 8,5 | 14,0 | 44,9 | 7,6 | 9,2 | 16,8 | 21,5 | 6,1 | | 4,36 | 0,09 | 0,33 | 0,52 | 0,85 | 2,74 | 0,46 | 0,56 | 1,02 | 1,32 |
| 2 | | 67,0 | 2,0 | 5,5 | 7,5 | 18,0 | 48,4 | 6,4 | 8,6 | 12,4 | 24,2 | 6,4 | | 4,29 | 0,13 | 0,35 | 0,48 | 1,15 | 3,10 | 0,41 | 0,55 | 0,80 | 1,54 |
| 3 | 1,0 | 65,0 | 2,5 | 6,0 | 11,0 | 14,5 | 44,4 | 6,8 | 8,8 | 16,1 | 23,9 | 7,0 | 0,07 | 4,55 | 0,17 | 0,42 | 0,77 | 1,01 | 3,11 | 0,47 | 0,62 | 1,13 | 1,67 |
| 4 | 1,5 | 69,0 | 1,5 | 5,0 | 10,0 | 18,0 | 48,4 | 8,1 | 9,2 | 14,1 | 20,2 | 7,8 | 0,11 | 5,38 | 0,11 | 0,39 | 0,78 | 1,40 | 3,77 | 0,63 | 0,72 | 1,10 | 1,58 |
| 5 | | 68,0 | 2,0 | 6,0 | 9,0 | 14,5 | 48,1 | 7,7 | 9,4 | 16,0 | 18,8 | 6,2 | | 4,22 | 0,12 | 0,37 | 0,56 | 0,90 | 2,91 | 0,48 | 0,58 | 0,99 | 1,17 |
| 6 | 1,5 | 66,5 | 2,0 | 5,5 | 7,5 | 17,0 | 49,5 | 7,5 | 8,0 | 11,0 | 24,0 | 6,7 | 0,10 | 4,46 | 0,13 | 0,37 | 0,50 | 1,14 | 3,32 | 0,50 | 0,54 | 0,74 | 1,60 |
| 7 | 1,5 | 64,5 | 2,0 | 7,5 | 8,0 | 16,5 | 52,1 | 7,8 | 10,8 | 10,8 | 18,5 | 7,5 | 0,11 | 4,84 | 0,15 | 0,56 | 0,60 | 1,24 | 3,91 | 0,58 | 0,81 | 0,81 | 1,39 |
| 8 | 1,0 | 63,0 | 2,0 | 7,0 | 9,0 | 18,0 | 54,3 | 7,5 | 8,7 | 13,8 | 15,7 | 7,8 | 0,08 | 4,91 | 0,16 | 0,55 | 0,70 | 1,40 | 4,24 | 0,59 | 0,68 | 1,07 | 1,22 |
| 9 | 1,5 | 60,5 | 3,0 | 9,0 | 10,0 | 16,0 | 50,5 | 7,7 | 11,0 | 14,3 | 16,5 | 6,8 | 0,10 | 4,11 | 0,20 | 0,62 | 0,68 | 1,09 | 3,44 | 0,52 | 0,75 | 0,97 | 1,12 |
| 10 | 1,5 | 62,5 | 2,5 | 8,0 | 8,5 | 17,0 | 50,4 | 7,8 | 10,5 | 11,7 | 19,6 | 7,3 | 0,11 | 4,56 | 0,18 | 0,58 | 0,62 | 1,25 | 3,68 | 0,57 | 0,77 | 0,85 | 1,43 |
| 11 | 1,5 | 60,5 | 3,0 | 6,5 | 9,0 | 19,5 | 45,0 | 7,1 | 10,0 | 14,8 | 23,1 | 7,3 | 0,11 | 4,42 | 0,22 | 0,47 | 0,66 | 1,42 | 3,28 | 0,52 | 0,73 | 1,08 | 1,69 |
| 12 | 2,0 | 58,0 | 3,0 | 9,0 | 10,0 | 18,0 | 43,0 | 6,4 | 11,4 | 14,1 | 25,1 | 6,8 | 0,14 | 3,94 | 0,20 | 0,61 | 0,68 | 1,23 | 2,92 | 0,42 | 0,77 | 0,96 | 1,72 |
| 13 | 3,5 | 60,5 | 2,5 | 5,5 | 8,5 | 19,5 | 44,2 | 7,8 | 9,2 | 13,8 | 25,0 | 7,4 | 0,26 | 4,48 | 0,18 | 0,41 | 0,63 | 1,44 | 3,27 | 0,58 | 0,68 | 1,02 | 1,85 |
| 14 | 1,5 | 68,5 | 2,5 | 7,5 | 8,0 | 12,0 | 47,2 | 9,2 | 13,1 | 12,2 | 18,3 | 6,9 | 0,10 | 4,73 | 0,17 | 0,52 | 0,55 | 0,83 | 3,26 | 0,63 | 0,90 | 0,84 | 1,27 |
| 15 | 2,0 | 64,0 | 3,0 | 7,0 | 10,5 | 13,5 | 47,5 | 9,2 | 9,7 | 13,4 | 20,2 | 7,5 | 0,15 | 4,80 | 0,22 | 0,52 | 0,79 | 1,01 | 3,56 | 0,70 | 0,73 | 1,00 | 1,51 |
| 16 | 2,5 | 58,0 | 3,5 | 7,5 | 12,5 | 16,0 | 43,9 | 7,6 | 11,0 | 17,7 | 19,8 | 6,7 | 0,17 | 3,88 | 0,23 | 0,50 | 0,84 | 1,07 | 2,94 | 0,51 | 0,74 | 1,18 | 1,33 |
| 17 | 1,5 | 59,5 | 2,5 | 7,0 | 9,5 | 20,0 | 45,3 | 8,5 | 9,8 | 13,2 | 23,2 | 8,0 | 0,12 | 4,76 | 0,20 | 0,56 | 0,76 | 1,60 | 3,62 | 0,68 | 0,78 | 1,06 | 1,86 |
| 18 | 2,5 | 56,5 | 2,5 | 8,0 | 11,5 | 19,0 | 43,7 | 7,5 | 9,0 | 15,1 | 24,7 | 7,4 | 0,18 | 4,18 | 0,18 | 0,59 | 0,85 | 1,40 | 3,23 | 0,55 | 0,67 | 1,12 | 1,83 |

VAZ, C. A. C.; FERRI, R. G.; GEISHOVET, N. & CAMPOS, A. N. F. — Eletroforese sobre acetato de celulose (CAF). Reprodutibilidade e valores normais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:71-75, 1971.

QUADRO III

Eletroforese comparativa: Acetato-Papel

| | Acetato de Celulose | | | | Papel de Filtro | | | |
|------------------|----------------------|---------------|----------|---------------|----------------------|---------------|----------|---------------|
| | Porcentagem relativa | | g/100 ml | | Porcentagem relativa | | g/100 ml | |
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| Pré Albumina | 1,8 | 0,65 | 0,13 | 0,05 | — | — | — | — |
| Albumina | 63,5 | 4,30 | 4,50 | 0,37 | 47,3 | 3,20 | 3,35 | 0,39 |
| Alfa 1 | 2,4 | 0,55 | 0,17 | 0,04 | 7,7 | 0,80 | 0,55 | 0,08 |
| Alfa 2 | 6,8 | 1,22 | 0,48 | 0,10 | 9,9 | 1,20 | 0,70 | 0,10 |
| Beta | 9,4 | 1,40 | 0,67 | 0,12 | 14,0 | 1,90 | 0,98 | 0,13 |
| Gama | 16,7 | 2,30 | 1,19 | 0,22 | 21,2 | 3,00 | 1,50 | 0,24 |
| Proteínas totais | — | — | — | — | — | — | 7,10 | 0,60 |

QUADRO IV

Faixa de normalidade para eletroforese em acetato de celulose usando 2 desvios padrão (Média ± 1,96 S)

| | Porcentagem relativa | gramas/100 ml |
|--------------|----------------------|---------------|
| Pré-Albumina | 0,53 a 3,07 | 0,032 a 0,228 |
| Albumina | 55,07 a 71,93 | 3,775 a 5,225 |
| Alfa 1 | 1,32 a 3,48 | 0,092 a 0,248 |
| Alfa 2 | 4,41 a 9,19 | 0,284 a 0,676 |
| Beta | 6,66 a 12,14 | 0,435 a 0,905 |
| Gama | 12,20 a 21,20 | 0,760 a 1,620 |

COMENTÁRIOS

Como se pode depreender do quadro I, a reprodutibilidade da eletroforese em acetato de celulose é muito boa, considerando-se que muitas fases estão envolvidas no processo e

que 6 componentes são quantitativamente determinados no decorrer de um único processamento.

Os valores para cada fração eletroforética diferem bastante dos encontrados por eletroforese sobre papel de filtro, em virtude da transparência do suporte e principalmente em consequência da inexistência de adsorção que, no caso do papel de filtro, além de aumentar a leitura de fundo (back-ground) diminui sensivelmente os valores de albumina.

As médias por nós encontradas são praticamente superponíveis às de Knedel, muito embora os valores de globulina gama sejam ligeiramente superiores em nosso meio. Por outro lado, os valores obtidos em acetato de celulose são muito próximos dos encontrados por eletroforese livre de Tiselius, como por exemplo os mencionados por LEVIN & OBERHOLZER⁸. No quadro V apresentamos os dados comparativos de eletroforese livre e sobre acetato de celulose.

QUADRO V

Eletroforese comparativa

| | Pré Albumina | Albumina | Alfa 1 | Alfa 2 | Beta | Gama |
|-------------------------------|--------------|----------|--------|--------|------|------|
| Acetato de Celulose - C.P.I. | 1,8 | 63,5 | 2,4 | 6,8 | 9,4 | 16,7 |
| Acetato de Celulose - KNEDEL | 3,5 | 63,7 | 2,3 | 5,9 | 8,7 | 15,3 |
| Eletroforese Livre - TISELIUS | — | 62,8 | 3,7 | 7,1 | 14,0 | 12,2 |

RESUMO

Os autores estudam a reprodutibilidade do micro método de eletroforese e apresentam os resultados obtidos com soros normais.

Concluem pela excelente reprodutibilidade, e comentam algumas das vantagens do método, especialmente a rapidez de sua realização permitindo em uma só corrida eletroforética, em 20 minutos, analisar 18 amostras.

Agradecimentos — Os autores agradecem ao Prof. Guilherme Rodrigues da Silva e ao Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira pela orientação referente a problemas estatísticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. J. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:571-766, 1949.
2. GRAHAM, J. L. & GRUNBAUM, B. W. — A rapid method for microelectrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate. *Amer. J. Clin. Path.*, 39:567-578, 1963.
3. GRUNBAUM, B. W.; FESSEL, W. J. & PIEL, C. F. — Densitometric evaluation of macroelectrophoretic protein patterns on cellulose acetate membranes. *Anal. Chem.* 33:860-1, 1961.
4. GRUNBAUM, B. W.; ZEC, J. & DURRUM, E. L. — Application of an improved microelectrophoresis technique and immunoelectrophoresis of the serum proteins on cellulose acetate. *Microchem. J.*, 7:41-53, 1963.
5. HEER, E. E.; ALONSO, A. T.; AGEITOS, M. L.; BASSI, J. J.; DIBETTO, J. L.; MERECH, R. S. & WALTHER, J. C. — Proteinuria en Pediatría. Su significación clínica diagnóstica. *Arch. Argent. Pediat.*, 47:1-8, 1969.
6. KNEDEL, M. — Zur Umstellung der serumweisss — Elektrophorese von Papier auf Celluloseacetatfolie (CAF) — Informação especial Carl Zeiss: E 50-610/CAF-d, novembro, 1969.
7. KOHN, J. — A new supporting medium for zone electrophoresis. *Biochem. J.*, 65: 9 p, 1957.
8. LEVIN, B. & OBERHOLZER, V. G. — Paper electrophoresis of serum proteins. *Am. J. Clin. Path.*, 23:205-17, 1953.
9. TAUCH, W. — Direkte photometrische Auswertung von Elektrophoresen auf Cellulose-Acetat-Folien. In "75 Jahre Optische Messinstrument", 1968, S. 71-76, Carl Zeiss, Oberkochen württ.

Recebido para publicação em 6 de agosto de 1971.

PESQUISA RÁPIDA, PRÁTICA E ESPECÍFICA DA PRESENÇA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, NO LEITE "IN NATURA", PELA UTILIZAÇÃO DE TIRAS E FITAS REAGENTES ⁽¹⁾

QUICK, PRACTICAL AND SPECIFIC TEST TO DETECT HYDROGEN PEROXIDE IN MILK "IN NATURA" WITH THE USE OF REAGENT STRIPS AND TEST-TAPE

ALEXANDRE MELLO FILHO ⁽²⁾
LUÍS CELSO DE CASTRO ⁽³⁾

S U M M A R Y

During the investigation concerning new detection method for hydrogen peroxide, the authors attention was called by the possible use of reagent strips in the dairy field, — strips of the "dip and read" type, commonly used in clinical analysis: blood and urine chemistry.

Among these, the Ames Clinistix reagent strips, used to determine glucose in urine, has a reactive area with two enzymes. The gluco-oxidase that catalyzes the oxidation of the glucose realising the hydrogen peroxide wich is decomposed by the second enzyme — peroxidase, releases the oxygen that changes the color of this reactive area.

If the oxidation of the glucose in urina, caused by the gluco-oxidase, releases the hydrogen peroxide, as long as this substance has been added to milk, the chromogen reaction will occur immediately on the reactive area of the Clinistix reagent strip.

The authors obtained the expected result.

Knowing about Lilly test-tape, "Glico-fita", also used to detect glucose in urine, they thought that this one could be employd in the same way. And this really happened. Indeed it determined the presence of hydrogen peroxide added to the milk sample, also by chromogen raction.

Considering the possibility of reagent strips to replace classical methods, which emplov guaiac solutions or vanadium acid, pipettes, samplers and vials, the authors performed comparative researches of these methods in order to determine the sensitivity of the new methods in relation to the old ones.

INTRODUÇÃO

Nesta última década, marcada por grandes progressos científicos no campo da miniaturização, controle remoto e cibernética, a automatização e a eletrônica vêm invadindo os laboratórios de análises e pesquisas em todos os campos de atividade humana.

É natural, pois, que em laticínios surgissem as unidades auto-técnicas, capazes de realizar com perfeição, rapidez e alta precisão

um grande número de dosagens como a verificação em série do ponto de congelamento ou do teor graxo do leite, afastando a sempre presente possibilidade do erro de apreciação individual.

Entretanto, a par desses avanços, defronta-se o técnico em laticínios com o emprego de processos clássicos, como o da pesquisa da presença do peróxido de hidrogênio no leite pelo emprego da solução alcoólica de guaiacol a 1%,^{4,9} baseada no tradicional mé-

- (1) Trabalho realizado na Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Apresentado em caráter de nota preliminar na "22.ª Semana do Laticinista", realizada no Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, Minas Gerais, de 12 a 16 de julho de 1971.
- (2) Da Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Da Clínica Dermato-sifilográfica do Hospital Municipal de São Paulo.
- (3) Da Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

todo de DUPOY⁹, que põe em evidência a oxidação do guaiaicol que, em presença do sistema peróxido-peroxidase, se transforma em guaiacoquinona, comunicando ao leite uma nítida coloração vermelho-salmão.

Tais processos, como muitos outros utilizados em laticínios^{1, 10}, não prescindem do uso de pipetas, tubos de ensaio, etc. -

É, pois, compreensível que, investigando novos métodos de pesquisa, nos Laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, nossa atenção se voltasse para a possível utilização em laticínios do valioso recurso representado pelo emprêgo, em análises clínicas, em medicina, das tiras reagentes do tipo conhecido como *mergulhe e lêia*, utilizadas principalmente na verificação das alterações físico-químicas do sangue e urina.

Dessas tiras, chamou-nos a atenção em especial a Clinistix (Anes Company), destinada à verificação rápida (10 seg.) da presença da glicose na urina e baseada em duas enzimas.

A tira reagente Clinistix consiste em tira de matéria plástica transparente com área reagente rósea em uma das extremidades. Essa área reagente contém duas enzimas, a *glico-oxidase* que, na presença da glicose na urina, catalisa a oxidação desse açúcar para formar ácido glicônico e o peróxido de hidrogênio e a *peroxidase* que, na presença de peróxido de hidrogênio recém-formado, determina a liberação do oxigênio nascente o qual, produzindo mudança de coloração da área reagente, faz passar a cor rosada para a violeta ou azul escuro.

Se a oxidação da glicose contida na urina forma o peróxido de hidrogênio é evidente que, se o mesmo já estiver presente, como no caso da sua colocação no leite, a reação cromogênica se estabelecerá imediatamente.

Aplicando tal dedução, adicionamos o peróxido de hidrogênio ao leite líquido e, mergulhando nele a parte reagente da tira Clinistix, obtivemos de fato a sua rápida e nítida mudança de coloração.

Nessas circunstâncias, sabendo da existência de fita diagnóstica elaborada pela Lilly Company, Glico-fita, também destinada à verificação rápida da presença de glicose na urina, suspeitamos de que a mesma funcionasse por mecanismo semelhante. E, ex-

perimentando-a, obtivemos, no caso da presença do peróxido de hidrogênio adicionado ao leite, resultado positivo pela mudança da coloração da referida fita que, do amarelo, passou a verde claro.

MATERIAL E MÉTODOS

Tiras reagentes Clinistix

No caso da verificação da presença do peróxido de hidrogênio no leite, mergulhamos a área de teste da tira reagente na amostra do leite em questão. A mudança rápida da coloração rósea, que passou à violeta ou azul-escuro, foi indicio da presença positiva do peróxido (Fig. 1, 2, 3).

Nas plataformas de recepção do leite, este exame pode ser feito seriado, mergulhando a parte reagente da tira no leite contido no próprio latão, (num máximo, 10 verificações por tira), pois a mesma é atóxica.

Por media de economia, embora tal fato venha dificultar bastante a leitura colorimétrica do resultado, a tira poderá ser dividida longitudinalmente em duas metades iguais, desde que seja para uso imediato.

Fitas diagnósticas Glico-fita

No momento do exame, na verificação da eventual presença do peróxido de hidrogênio no leite, destacamos cerca de 3 cm de fita e mergulhamos no leite problema. Após 10 a 20 segundos, em caso positivo, a coloração da fita passou do amarelo para a tonalidade nitidamente esverdeada (Fig. 4).

Levando em conta a possibilidade de serem as tiras ou fitas a substituir os métodos correntes que empregam soluções de guaiaicol ou ácido vanádico, tornou-se necessário saber qual a sensibilidade do novo processo em relação àqueles.

Para isso resolvemos adicionar ao leite padrão quantidades conhecidas de peróxido de hidrogênio e estudar o comportamento diagnóstico da tira e da fita reagente em relação ao emprêgo da solução alcoólica de guaiaicol a 1%^{4, 9} e do método de Arnold e Mentzel^{1, 10}.

A duas amostras do mesmo leite, em estado de cru, considerado padrão, veiculando flora bacteriana avaliada em 18 milhões de

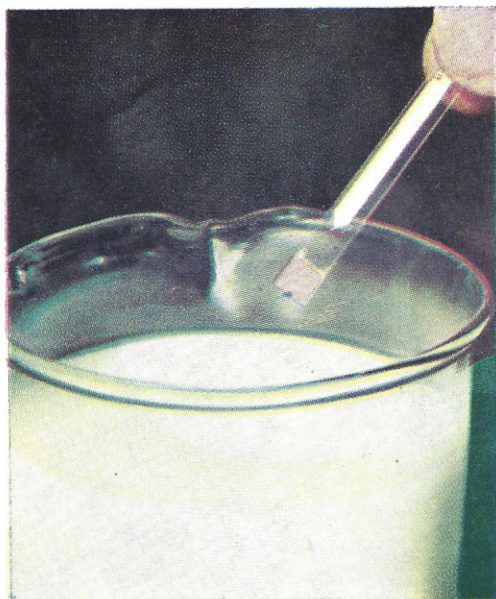


Fig. 1 — Tira "Clinistix" mostrando área reagente rósea, índice da ausência do peróxido de hidrogênio no leite testado.

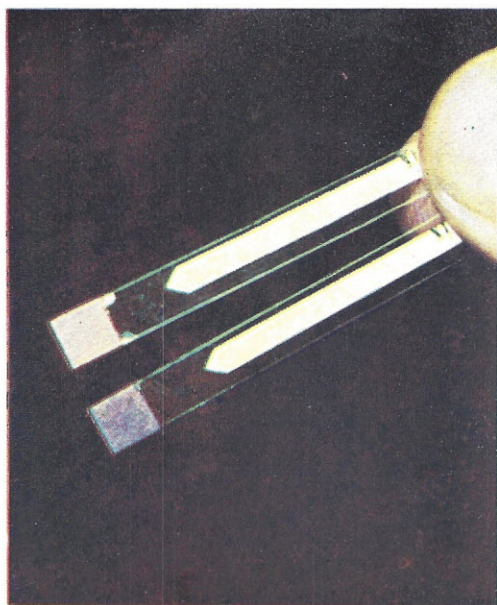


Fig. 3 — Aspecto comparativo das tiras "Clinistix", com área reagente rósea e azul, índices respectivamente, da ausência e presença do peróxido de hiprogênio acrescentado ao leite.



Fig. 2 — Tira "Clinistix" mostrando área reagente azul, índice específico positivo para a presença do peróxido de hidrogênio na amostra de leite examinada.

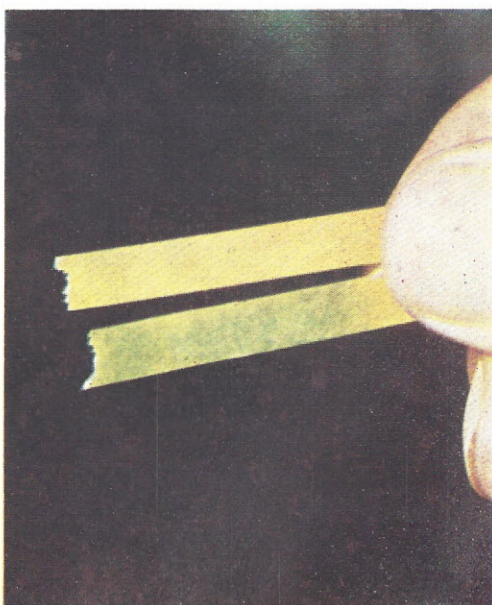


Fig. 4 — Aspecto comparativo entre a fita "Glico-fita", com coloração amarela inicial, inalterada, indicio da ausência do peróxido no leite e com a coloração esverdeada, indicando no presente caso, especificamente, a presença positiva daquele antisséptico conservador.

germes por ml, acrescentamos o peróxido de hidrogênio (30%, 120 vol., U.S.A. Baker), na razão respectivamente de 1 e 2/1.000, sendo as mesmas a seguir divididas em duas porções que foram conservadas frigorificadas (+ 5°C), ou mantidas em meio ambiente.

A cada hora era testada a presença do peróxido de hidrogênio pelos métodos que utilizavam a solução de guaiacol ou ácido vanádico e pelo processo que emprega a tira reagente ou a fita diagnóstica.

Estas verificações foram levadas a efeito até a obtenção de resultados negativos nos dois grupos de amostras, quer para frigorificadas (+ 5°C), como para as conservadas em meio ambiente.

A seguir, fomos ao interior de S. Paulo e, nas plataformas de recepção do leite, passamos ao exame seriado, em grande escala e rápida verificação do produto acondicionado em latões, à medida que os mesmos iam chegando, transportados em grande ou pequeno número, pela mais diversa modalidade, desde os grandes caminhões até as pequenas viaturas de tração animal.

RESULTADOS

Na amostra do leite conservado em ambiente e ao qual se acrescentou 1‰ de peróxido de hidrogênio, foi o referido conservador antisséptico passível de determinação até 4 horas da sua colocação, quer pelos métodos que empregaram as soluções de guaiacol e ácido vanádico, quer pelos que se utilizaram da tira e da fita.

Para a mesma amostra frigorificada (+ 5°C), a presença determinável do peróxido foi um pouco mais longa, alcançando até 5 horas da sua colocação e acusada igualmente pelos dois grupos de processos analíticos postos em confronto.

Com o leite padrão veiculando 2‰ de peróxido de hidrogênio, o resultado foi semelhante, apenas o tempo de permanência determinável do peróxido aumentou, passando respectivamente para 5 horas na amostra em ambiente e 6 horas na frigorificada.

Ainda neste caso houve identidade na capacidade determinadora das soluções e da tira e fita reagentes, isto é, após o período de positividade máxima de 5 e 6 horas, tanto os métodos clássicos como os propostos fa-

lharam na evidenciação da presença decrescente do peróxido de hidrogênio que passou a ser sub-determinável incógnita.

No interior de São Paulo, nas plataformas de recepção dos entrepostos-usinas, em dias diversos e em regiões diferentes, foram submetidos a testes da eventual presença do peróxido de hidrogênio 600 amostras de leite coletadas em tubos de ensaio para a realização das provas que se utilizaram da solução de guaiacol ou ácido vanádico, ou examinadas diretamente nos latões, à medida que chegavam, quando da utilização das tiras ou fitas diagnósticas.

Tôdas essas amostras apresentam negatividade para a presença do peróxido de hidrogênio, para ambos os tipos de exames executados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As pesquisas comparativas efetuadas no laboratório, visando estabelecer a sensibilidade da tira reagente e da fita diagnóstica em relação às provas que empregam o guaiacol e o ácido vanádico, na determinação da presença do peróxido de hidrogênio colocado no leite, vieram demonstrar que êsses métodos se equivaleram.

A tira e a fita, por possuírem a enzima peroxidase, foram capazes, em igualdade de condições com o reativo de Arnold e Mentzel^{1,10}, de evidenciar a presença do peróxido de hidrogênio quando adicionado ao leite fervido, o que obviamente não aconteceu com o método do guaiacol^{3,9}, por se basear a sua reação na presença da peroxidase do leite.

Conforme ficou demonstrado, as tiras reagentes e as fitas foram capazes de, com boa especificidade, substituir aqueles métodos de uso tradicional, com a vantagem de serem portáteis, utilizáveis para exame do produto no próprio latão e no caso da tira em especial, reutilizável quando do emprêgo imediato seriado, por ser uma haste rígida, o que constitui considerável economia do material empregado.

Nessas condições, tivemos a oportunidade de apresentar o achado, que acreditamos seja pela primeira vez de âmbito mundial.

E como consideração final, queremos acentuar que o fato de, no interior, nas plata-

formas de recepção do leite, em 600 verificações não termos, quer pelos métodos clássicos ou pelos propostos, evidenciado a presença do peróxido de hidrogênio, o sucedido não indica a real ausência do peróxido e apenas que essa substância não foi passível de determinação caso estivesse presente e colocada há mais de 5 ou 6 horas da chegada do leite àquêles entrepostos-usinas.

Após êsse período de tempo, o peróxido de hidrogênio só pode ser evidenciado por processos especiais de investigação^{4, 5}.

RESUMO

Investigando novos métodos de pesquisa, a atenção dos autores se voltou para a possível utilização, em laticínios, das tiras reagentes do tipo *mergulhe e lêia*, utilizadas, em análises clínicas, para as verificações das alterações físico-químicas do sangue e urina.

Dessas, a tira reagente Clinistix, utilizada na determinação da presença de glicose na urina, mostrou ter área reagente contendo dois enzimas. A glico-oxidase que catalisa a oxidação da glicose com liberação do peróxido de hidrogênio que, descomposto pela segunda enzima, a peroxidase, libera o oxigênio que faz mudar a cor dessa área reagente, dando noção colorimétrica do processo.

Se a oxidação da glicose na urina, produzida pela glico-oxidase, libera o peróxido de hidrogênio, no caso de o mesmo ter sido adicionado ao leite, a reação cromógena da área reativa da fita poderá se processar imediatamente.

E foi o que aconteceu.

Sabendo da existência da Glico-fita, também para a pesquisa da glicose na urina, julgamos que a mesma pudesse funcionar em base semelhante ao já visto, e de fato a mesma acusou a presença do peróxido de hidrogênio acrescentando ao leite de prova, também por mudança colorimétrica.

Levando em conta a possibilidade de viem as tiras reagentes e as fitas diagnósticas a substituir os métodos clássicos que empregam soluções de guaiacol ou ácido vanádico, e além disso pipetas, tubos de ensaio e frascos acondicionadores, fizeram os autores pesquisas comparativas entre esses métodos, para

saber a sensibilidade dos novos processos em relação àquêles.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — *Standard methods for the examination of dairy products*. 12 ed. New York, A.P.A.H., 1967.
2. BRASIL. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. (Aprovado pelo Decreto 30.691 de março de 1952). Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1952.
3. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — *Normas de qualidade para alimentos*. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1967. v. 1. (Mimlogr.).
4. MELLO FILHO, A.; CASTRO, L. C. — Conservação do leite "in natura" por meios físicos, químicos e bioquímicos. Peróxido de hidrogênio como conservador. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:85-103, 1969/70.
5. MELLO FILHO, A. — Utilização da água oxigenada no tratamento do leite cru destinado ao consumo. [Apresentada à 22.ª Semana do Laticinista, Juiz de Fora, jul. 1970.]
6. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R. & XIMENES, J. — Inibidores bacterianos no leite em consumo da Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 25/27:69-94, 1965/67.
7. ORGANISATION MONDIALE DE LA SALUD — Higiene de la leche. Higiene de la producción, la elaboración de la leche. FAO/OMS, Ginebra, 1966. Sér. monogr. 48.
8. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE — Comité mixte FAO/OMS d'ex perts de l'hygiène du lait. Premier rapport. Genève, O.M.S., 196). Sér. Rapp. Techn. 197.
9. PIEN, J.; DESIRENT, J. & LAFONTAINE, D. — Le recherche de l'eau oxygénée dans le lait. *Le lait*, 34:133-45, 1954.
10. ROSSEL, J. M.; SANTOS, I. — *Métodos analíticos de laboratorio lactológico y microbiológico de las industrias lacteas*. Barcelona, Labor, 1952. v. 1.
11. SELTZER, H. S. & LOVEALL, M. J. — Improved accuracy of test-tape in estimating concentrations of urinary glucose. *J. Amer. Med. Ass.*, 167(15):1826-30, 1958.

PESQUISA RÁPIDA, PRÁTICA E ESPECÍFICA DA EVENTUAL PRESENÇA DE URINA NO LEITE "IN NATURA", PELA UTILIZAÇÃO DE TIRAS REAGENTES ⁽¹⁾

QUICK PRACTICAL AND SPECIFIC TEST TO DETECT URINE IN MILK "IN NATURA" USING REAGENT STRIPS

ALEXANDRE MELLO FILHO ⁽²⁾
LUIZ CELSO DE CASTRO ⁽³⁾

SUMMARY

It is known that part of the people use to say that, under certain circumstances, cattle urine is added to milk in order to increase its volume.

Is is obvious that such popular belief has no foundation and in order to definitely demonstrate that this is wrong, the authors decided to evidence this supposed presence using Nessler reaction or reaction with hydrochloric and nitric acids and alcohol. So, impelled by investigation spirit, they decided to use the Azostix reagent strips. Ames Azostix are reagent strips, of the "dip and read" type, employed in blood chemistry analysis to quickly determine the urea nitrogen content, in blood.

This reagent strip has on its yellow reactive area one specific enzyme — urease, that converts the urea present in blood into ammonium hydroxide which, by its turn, changes the color of the reactive area into green.

By adding urine to the milk sample and then dipping the Azostix reagent strip in it, a clear change of color on the reaction area was obtained, at a minimum rate of 10 ml urine/1,000 ml milk.

Then, to test the sensitivity of this rapid and practical process, an analytical comparison with dairy classical methods was performed.

The authors travelled to the interior in the places where milk is produced and performed 300 tests locally for urine detection.

INTRODUÇÃO

É noção difundida em certas camadas da nossa população que o leite de consumo "in natura" possa veicular, em determinadas circunstâncias, urina do próprio gado vacum a êle adicionada em caráter fraudulento.

Alega-se então que a urina acrescentada aumentaria o volume do leite, sem o inconveniente da baixa da sua densidade, como acontece na aguçagem.

É evidente e clamoroso que tal noção leiga é completamente destituída de fundamento. O que na verdade acontece, e que é erroneamente interpretado, é o fato de que determinados leites, originários de fontes espúrias, onde os mais elementares preceitos higiênicos de ordenha e colheita são desdenhados, absorvem os odores locais, que são devolvidos ao consumidor na ocasião do aquecimento domiciliar.

- (1) Trabalho realizado na Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Apresentado, em caráter de nota prévia, na 22.^a "Semana do Laticinista", realizada no Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, Minas Gerais, de 12 a 16 de julho de 1971.
- (2) Da Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo; Da Clínica Dermatossifilográfica do Hospital Municipal de São Paulo.
- (3) Da Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

Nos laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, buscando técnicas para uma eventual determinação de urina adicionada ao leite, verificamos que a que nos parecia mais indicada — a do emprêgo do reativo de Nessler — mesmo assim muitas vezes falhava. Resolvemos então tentar empregar a tira Azostix, elaborada pela Ames Company e utilizada em análises clínicas para a determinação rápida do teor de nitrogênio urêico sanguíneo.

As referidas tiras são constituídas por haste plástica contendo numa das extremidades área reativa de coloração amarela; mergulhada no sangue, filtra-o, absorvendo porém a sua parte fluida. A enzima urease, contida nessa parte reativa converte a uréia em gás carbônico e hidróxido de amônio, produzindo êste mudança da cor da área reativa — do amarelo para o verde — estando a intensidade dessa variação cromática diretamente na dependência do teor de uréia presente.

Acrescentando a urina ao leite de prova, na quantidade mínima de 10/1000 ml, e mergulhando a área reagente da fita no mesmo, obtivemos de fato, após um período de 60 segundos, mudança da coloração da fita para uma tonalidade esverdeada. Com o adicionamento ao leite de uma maior quantidade de urina obtivemos uma nítida viragem do amarelo para o verde intenso.

Apenas para confirmar a nossa afirmativa inicial de que é evidente que a noção leiga popular é destituída de fundamento, propuzemo-nos, usando tal técnica, investigar nas fontes de produção a eventual presença de urina no leite, testando antes a sensibilidade do método proposto, pela comparação com os resultados obtidos, em iguais circunstâncias, pelo emprêgo do método do reativo de Nessler, adaptado, e também pela utilização da mistura ácido-alcoólica.

MATERIAL E MÉTODOS

Método do reativo de Nessler, modificado

Conforme noção clássica, o reativo de Nessler é utilizado para indicar a presença e a quantidade de íons amônio, NH_4^+ ,².

Entretanto, não existe citação do seu emprêgo, em laticínios, para a determinação da presença de urina no leite, sendo pois tal utilização por nós testada com resultados satisfatórios.

O reativo empregado foi o produzido pela Tennant Química S/A (QUEEL). Pelo nosso método tomávamos, em um tubo de ensaio, 10 ml do leite padrão e, em outro igual quantidade de leite, porém acrescentado de urina. Aos mesmos tubos adicionávamos 3 a 5 gotas de hidróxido de sódio a 10% e logo a seguir 2 ml do reativo de Nessler. As amostras do leite eram então continuamente agitadas por piparotes obtidos pelo choque da parte média dos tubos de ensaio contra a superfície palmar da mão esquerda; após 30 segundos, uma cor cinza ia aparecendo, e muito mais nítida no leite ao qual se acrescentou urina.

Êstes resultados têm que ser consignados imediatamente após o aparecimento da cor cinza pois, passada essa fase, as amostras se uniformizarão, tomando igualmente a cor cinza-chumbo.

Para melhor destaque colorimétrico dos resultados obtidos, a prova deve ser executada com amostra de leite isenta de urina — contra-prova negativa; uma amostra contendo urina na quantidade mínima de 10/1000 ml — contra-prova positiva, e o leite problema, que será comparado com os demais.

Método que emprega a mistura ácido-alcool

Utilizada segundo indicações de "Normas de qualidade para alimentos"¹.

Método com as tiras reagentes Azostix

Como recomendação fundamental para a utilização das tiras reagentes, o leite a ser testado deverá estar em temperatura superior a 20°C.

As respostas colorimétricas obtidas variam de acôrdo com a quantidade de urina presente, conforme as fig. 1, 2 e 3.

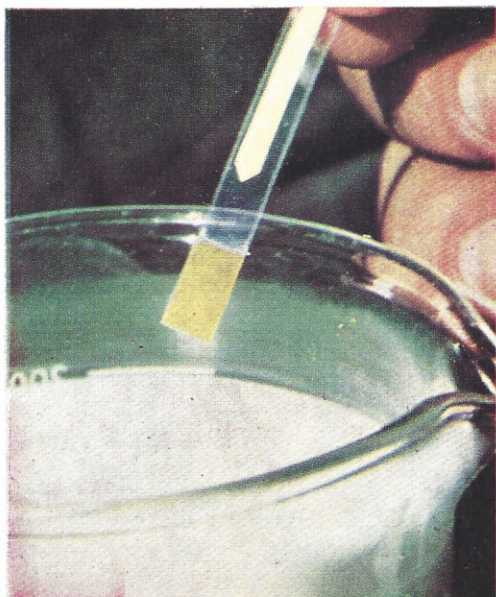


Fig. 1 — Tira Azostix mostrando área reagente amarela, índice específico da ausência de urina no leite testado.

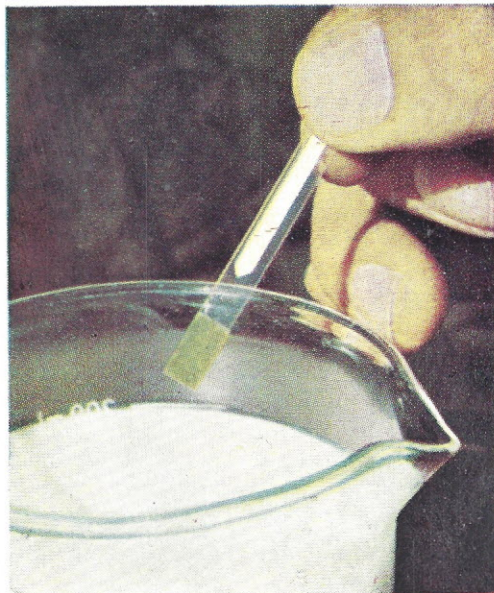


Fig. 2 — Tira Azostix mostrando área reagente de coloração verde, índice específico positivo de presença de urina no leite examinado.

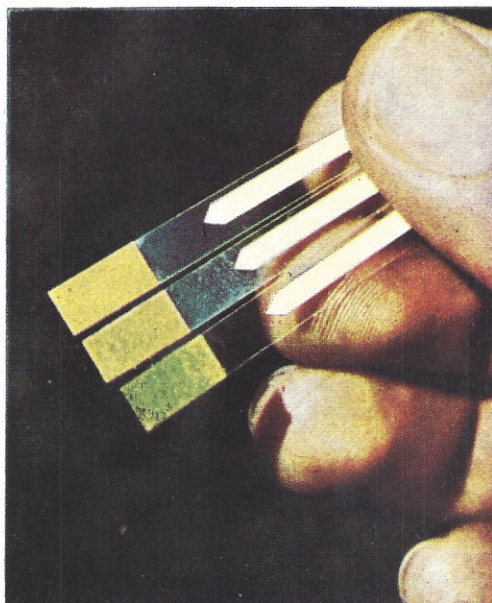


Fig. 3 — Aspecto comparativo das tiras: área amarela, índice de ausência, e área verde clara, e verde, índices de presença de urina nos leites submetidos a testes de laboratório.

Para avaliar a sensibilidade do método das tiras reagentes, em comparação com os métodos já citados, adicionávamos ao leite

padrão quantidades crescentes de urina vacum — 5, 10 e 20/1000 ml. A seguir, procurávamos determinar a presença mínima des-

sa substância entre aqueles valores, pela utilização dos três diferentes processos de investigação, repetindo a pesquisa 24 horas após, com o mesmo leite já examinado.

Realizada essa etapa no laboratório, conhecida a sensibilidade de cada método, fomos ao interior de São Paulo, aos centros produtores de leite e às plataformas de recepção do produto e realizamos sistemática investigação, visando determinar a eventual presença de urina no leite.

As amostras eram colhidas em tubos de ensaio, empregando-se o método que utiliza o ácido clorídrico ou o reativo de Nessler, mas as verificações levadas a efeito com as tiras foram realizadas diretamente nos latões, mergulhando a área reagente das tiras na superfície do leite.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em laboratório, ao adicionar-se a urina ao leite de prova, mostraram sensibilidade semelhante com o emprêgo do reativo de Nessler ou da tira reagente, isto é, um mínimo de determinação de 10 ml de urina por 1000 de leite. Já o método que utiliza o ácido clorídrico mostrou menor sensibilidade, acusando presença de urina apenas quando na quantidade de 20 ml/1000 ml leite. Entretanto, pelos três métodos, a urina acrescentada era ainda determinável mesmo 24 horas após sua coloração no leite.

Quanto aos resultados obtidos pelos exames do leite nas plataformas de recepção do interior de São Paulo, realizados em dias diferentes e em locais diversos, abrangendo 300 verificações, foram negativos para a presença de urina.

A ausência de urina em 300 amostras de leite cru, colhidas dos latões de diferentes produtores e em regiões diversas de produção veio fortalecer a nossa afirmação inicial de que a noção popular que afirma o contrário é destituída de fundamento.

Porém, as verificações levadas a efeito tiveram mais o mérito de apresentar um mé-

todo inédito em laticínios — o do emprêgo prático, rápido e específico da tira reagente — do que prôpriamente refutar uma acusação que na verdade procede, mas fundamentada em origem bem diversa da suspeitada.

RESUMO

É conceito difundido em certas camadas da população que ao leite se adiciona, em determinadas circunstâncias, urina do próprio gado, no intuito fraudulento de aumentar o seu volume. É evidente que tal noção leiga é destituída de fundamento. Entretanto, para definitivamente comprovar essa afirmação, resolveram os autores, utilizando-se do reativo de Nessler ou da reação com o ácido clorídrico, nítrico e álcool, evidenciar essa suposta presença. Levados pelo espírito de investigação, resolveram tentar o emprêgo diagnóstico da tira reagente Azostix, do tipo conhecido como *mergulhe e lêia*, utilizada em análises clínicas para a determinação rápida do teor do nitrogênio urêico sanguíneo.

Esta tira tem na área reagente, de cor amarela, enzima — urease — que converte a uréia existente no sôro sanguíneo em hidróxido de amônio que, por sua vez, determina a mudança colorimétrica dessa área que passa a cor verde.

Acrescentando urina ao leite de prova e nele mergulhando a parte reagente da tira Azostix, obtiveram nítida viragem colorimétrica da área reagente, no teor mínimo de 10 ml urina por 1000 ml de leite. A seguir, para testar a sensibilidade deste rápido e prático processo, fizeram a comparação analítica com métodos mais usados para laticínios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — *Normas de qualidade para alimentos*. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1967. V. 1. [Mimiogr.].
2. VOGEL, A. I. — *Química analítica cualitativa*. 4ed. Buenos Aires, Kapeluzz, 1964.

LEPTOSPIROSES NO BRASIL

Levantamento bibliográfico de 1917 a 1970

LEPTOSPIROSIS IN BRAZIL. Bibliographical survey, 1917-1970

MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA (*)
ALDERICA BARBOSA MEARIM (*)

Dentre as zoonoses que apresentam especial interesse em patologia humana avultam, ao lado da toxoplasmose, as leptospiroses cuja importância tem sido demonstrada entre nós por uma série de pesquisadores desde 1917 — logo após a identificação do agente etiológico da então denominada Moléstia de Weil, por Inada e Ido, no Japão — até os dias atuais.

Com efeito, as primeiras publicações sobre o assunto cabem a Bentes, Aragão e Mc Dowell em 1917, seguindo-se muitos outros autores incentivados pelo interesse despertado em nosso meio médico pelos trabalhos pioneiros dos pesquisadores japoneses. Veio depois um período em que as leptospiroses foram olvidadas, passando a ser publicados casos clínicos isolados, como curiosidade científica; assim é que até 1947 haviam sido relatados 5 casos em São Paulo. Nesse ano, Corrêa e colaboradores, no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, iniciaram a pesquisa sistemática das leptospiroses humanas entre pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e do Hospital Emílio Ribas, apresentando 12 casos após 3 meses de experiência diagnóstica. Na mesma época, Guida no Instituto Biológico, investigava as leptospiroses animais em nosso meio, possibilitando assim o levantamento dos diferentes vetores animais como possíveis fontes de infecção, e a avaliação de sua importância em patologia humana.

Em 1950, Gomes, Corrêa & Jordão apresentaram ao 5.º Congresso Internacional de Microbiologia, efetuado no Rio de Janeiro, 45 casos de leptospiroses humanas com isolamento da *L. icterohaemorrhagiae* em 2 casos. A partir de então intensificaram-se os estudos sobre essa zoonose em nosso país, particularmente depois de 1960.

Para avaliar do significado das leptospiroses no quadro nosológico nacional basta referir que nada menos de oito teses sobre leptospiroses humanas e animais foram defendidas na década de 1960-1970.

Em 1969, no 5.º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado em São Paulo, um dos temas oficiais apresentados em simpósio foi o das leptospiroses humanas e animais, quando oito relatores de diferentes pontos do país trouxeram depoimento pessoal sobre sua experiência no assunto. Nessa ocasião, segundo relato de Corrêa, no Instituto Adolfo Lutz haviam sido diagnosticados nada menos que 1349 casos de leptospiroses humanas, causadas, em 1202 casos, pela *L. icterohaemorrhagiae*, e em 147, por outras leptospiroses. Santa Rosa, um dos maiores pesquisadores dessa moléstia em nosso meio, relatou a experiência do Instituto Biológico de São Paulo onde, de 1960 a 1968, haviam sido examinados 21.263 soros animais com taxa de positividade de 22,4%.

* Do Instituto Adolfo Lutz.

A necessidade de reunir tôdas as referências nacionais sôbre leptospirose humanas e animais, com o fim de possibilitar aos estudiosos conhecer os numerosos trabalhos e teses publicados em nosso país é que motivou o levantamento bibliográfico que ora apresentamos, elaborado de maneira a mais completa possível, pelos meios ao nosso alcance. Parece-nos inútil insistir na singular importância dêste trabalho, coletânea que é das publicações nacionais de 1917 a agosto de 1971.

- 1917
- ARAGAO, H. B. — Sôbre a presença do Spirochaeta icterohemorrhagiae nos ratos no Rio de Janeiro. *Brasil Méd.* 31(39):329-330, set. 1917. 1
- BENTES, J. A. — Da leptospirose de Inada ou Icterus hemorrhagiae. *Estudo clínico e experimental*. Rio de Janeiro, 1917. 83p. [Tese — Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro]. 2
- MAC DOWELL, A. — Do "icterus epidemicus". *Arg. Bras. Med.* 7:635-645, 1917. 3
- 1918
- CARINI, A. — Espirochaetose icterohemorrágica nos ratos em São Paulo. *An. Paul. Med. Cir.* 9(3):70, mar. 1918. [Resumo]. 4
- 1919
- MATTA, A. da — Injeções intravenosas de urotropina no tratamento da espiroquetose hepatorenal. *Brasil Méd.* 33(28):218-220, jul. 1919. 5
- MATTA, A. da — Sur la spirochétose hépato-renal (spirochétose ictero-hémorragique) et son traitement. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 12(3):128-132, mar. 1919. 6
- MIYAJIMA, M. — Demonstração do Spirochaeta da moléstia de Weil e do da febre da mordedura do rato. *Bol. Soc. Med. Cir. São Paulo*, 2(1):5-9, mar. 1919. 7
- 1920
- MAGALHÃES, A. — Contribuição ao estudo da spirochetose icterohemorrágica. Rio de Janeiro, 1920. 64p. [Tese — Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro]. 8
- 1921
- SMILLIE, W. — O predomínio da Leptospira icterohemorrágica nos ratos de São Paulo. *An. Paul. Med. Cir.* 12(11/12):182-185, nov./dez. 1921. 9
- 1924
- TORRES, O. — O isolamento da Leptospira icteroides "Noguchi", na Bahia. I. *Ciênc. Méd.* 2(5):219-241, maio, 1924. 10
- TORRES, O. — O isolamento da "Leptospira icteroides" Noguchi, na Bahia. II. *Ciênc. Méd.* 2(7):313-330, jul. 1924. 11
- TORRES, O. — O isolamento da "Leptospira icteroides" Noguchi, na Bahia. III. *Ciênc. Méd.* 2(8):394-418, ago. 1924. 12
- 1925
- LINS, A. — Novas observações da Leptospira icterohemorrhagiae nos ratos do Rio de Janeiro. *Brasil Méd.* 39(18):243-246, out. 1925. 13
- MAC DOWELL, A. — Dois casos de spirochetose. *Brasil Méd.* 39(12):169-171, set. 1925. 14
- 1926
- SOARES NETO, F. P. — *Diagnóstico da espiroquetose icterohemorrágica*. Curitiba, 1926. [Tese]. 15
- VIANA JR. & VIANA, G. — A febre amarela. O isolamento da Leptospira icteroides de Noguchi na Bahia. Observação clínica e dados anatomo-patológicos. *J. Clin.* 7(22):337-346, nov. 1926. 16
- 1928
- ARAÚJO, E. de — Da existência de Leptospira icterohemorrágica (Inada e Ido) Noguchi em ratos da Bahia. Considerações gerais. *Ciênc. Méd.* 6(2):64-78, fev. 1928. 17
- ARAÚJO, E. de — O problema da etiologia da febre amarela. (Estudo analítico). *Brasil Méd.* 42(29):781-790, jul. 1928. 18
- VIANA JR. — Considerações sôbre a etiologia e profilaxia da febre amarela. *Brasil Méd.* 42(20):562-568, jan. 1928. 19
- 1930
- ARAÚJO, E. de — Sôbre amostras de leptospira insuladas de água na Bahia. *Brasil Méd.* 44(50):1386-1389, dez. 1930. 20
- ARAÚJO, E. de — Verificações experimentais com amostras de leptospira saprophytas. *Brasil Méd.* 44(51):1407-1411, dez. 1930. 21
- FORTUNA, F. — Novos espirochetos patogênicos. *Trib. Méd.* 34(11):101-104, jun. 1930. 22
- MAC DOWELL, A., CARVALHO, B. de & TRAVASSOS, G. — Spirochétoses humanas observadas no Brasil. *Rev. Sud. Am. Med. Cir.* 1(2):143-151, fev. 1930. 23

- PIZA, J. T. & GOMES, L. S. — Moléstia de Weil em São Paulo. *An. Paul. Med. Cir.* 21(2): 23-32, fev. 1930. [Nota prévia]. 24
- 1932
- FONSECA, F. & PRADO, A. — Algumas verificações parasitológicas em ratos de São Paulo. *Rev. Med. Cir. Brasil*, 40(1):65-70, jan. 1932. 25
- 1933
- GOMES, L. S. — Leptospira ictero-haemorrhagiae (Inada e Ido) isolada de um caso de moléstia de Weil. *Brasil Méd.*, 47(16):280-281, abr. 1933. 26
- 1935
- MUHLENS, P. — Espirochetoses. *Folha Méd.*, 16(13):243-246, maio, 1935. 27
- 1936
- FIALHO, A. — Estudos sobre a espirochetose ictero-hemorrágica no Rio de Janeiro. *Arg. Hig.*, 6(2):29-35, agô. 1936. 28
- 1938
- FIALHO, A. — Sobre dois casos de doença de Weil no Rio de Janeiro. Contribuição ao seu diagnóstico diferencial. *Arg. Hig.*, 8(1):37-57, fev. 1938. 29
- SEFTON, B. — Leptospirose ictero-hemorrágica. Subsídio aos estudos feitos no Brasil. *Brasil Méd.*, 52(16):379-384, abr. 1938. *Rev. Méd. Bahia*, 6(4):63-74, abr. 1938. 30
- 1939
- ALMEIDA, G. de — Um caso de espiroquetose ictero-hemorrágica. *Hospital*, Rio de Janeiro, 16(4):657-663, out. 1939. 31
- BARBOSA, L. T. — Formes cliniques de l'infection à "Spirochaeta icterohaemorrhagiae" chez l'enfant. *Med. Cir. Farm.* n.º 37:163-222, abr. 1939. 32
- 1940
- DACORSO FILHO, P. — Leptospirose canina. *Hospital*, Rio de Janeiro, 18(5):797-809, nov. 1940. 33
- PRADO, A. de A. — Icterícia spirochética benigna. Diagnóstico patogênico e etiológico. *Rev. Med.* 24(84):15-32, 1940. 34
- 1941
- LOUZADA, A. — Diagnóstico clínico e laboratorial da doença de Weil. *Med. Cir.* 3(1):92-94, jan./abr. 1941. 35
- MACHADO, L. S. — A epidemia de espiroquetose na cidade de Pôrto Alegre, em 1941. *Arg. Rio Grand. Méd.* 20(11):353-356, nov. 1941. 36
- 1942
- CLAUSELL, D. T. — Espiroquetose ictero-hemorrágica. Diagnóstico clínico e laboratorial. *Brasil Méd.*, 56(14):190-195, abr. 1942. 37
- COSTA, B., FAILLACE, J. M., CUNHA, C. V. da, SILVA, N. N. da, CLAUSELL, D. T., CHAVES, A. & MEDINA, H. — Estudo de uma epidemia de espiroquetose ictero-hemorrágica em Pôrto Alegre. *Arg. Dep. Est. Saúde Rio Grande do Sul*, 3:7-35, 1942. 38
- CUNHA, C. V. da — Diagnóstico da leptospirose. *Impr. Méd.* 18(338):41-44, fev. 1942. 39
- 1943
- BARBOSA, L. T. — Espiroquetose ictero-hemorrágica em lactente de um mês. *J. Pediatr.* 9(1):1-14, jan. 1943. 40
- MELO, S. T. P. de — A febre amarela e a Leptospira icteroides. *Rev. Med. Militar*, 32(3):311-313, jul./set. 1943. 41
- 1944
- SANTOS, C. — Leptospirose ictero-hemorrágica. Forma ambulatória. *Brasil Méd.* 58(10/11):75-76, mar. 1944. 42
- 1945
- DACORSO FILHO, P. — Contribuição à anatomia patológica da Leptospirose icterohemorrágica no cão. Rio de Janeiro, 1945. [Tese — Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro]. 43
- LOMBARDI, F. — Considerações sobre alguns casos de icterícia leptospiral na infância. *Rev. Bras. Med.* 2(8):633-636, agô. 1945. 44
- SANTOS, M. — Dosagem do complemento na doença de Weil experimental. *Brasil Méd.* 59(44/45):375, nov. 1945. [Nota prévia]. 45
- VARELA FUENTES, B. — El estado funcional del hígado en la espiroquetosis ictero-hemorrágica. *Rev. Med. Bras.* 19(1):39-62, jul. 1945. 46
- 1946
- MIRANDA, R. N. — Doença de Weil no Paraná. *Rev. Med. Paraná*, 15(6):229-234, nov./dez. 1946. [Nota prévia]. 47
- 1947
- CORREIA, M. O. A., PINHEIRO, D., PATRICIO, L. D. & MEIRA, J. A. — Moléstia de Weil em São Paulo. *Rev. Paul. Med.* 30(6):359-361, jun. 1947. [Nota preliminar]. 48
- DEANE, M. P. — Verificação da infecção natural de ratos por Leptospira icterohaemorrhagiae na cidade de Belém, Pará. *Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.* 1(2):261-271, jul. 1947. 49
- FORATTINI, O. P. — Presença de leptospiroses nos ratos da cidade de São Paulo. *An. Fac. Med. Univ. São Paulo*, 23:5-27, 1947. 50

CORRÊA, M. O. A. & MEARIM, A. B. — Leptospiroses no Brasil. Levantamento bibliográfico de 1917 a 1970. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:87-101, 1971.

- MONTENEGRO, J., FORATTINI, O. P. & FARACO, A. — Pesquisa de espiroquetas no fígado humano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 7:41-54, 1947. 51
- NOBREGA, P. — Sobre a incidência da *Leptospira ictero-haemorrhagiae* em ratos na cidade de São Paulo. *Bol. Soc. Paul. Med. Vet.* 8(1):31-36, jun. 1947. 52
- SANTOS, M. — A ocorrência de *Leptospira ictero-haemorrhagiae* nos ratos no Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med.* 4(6):424-426, jun. 1947. 53
- 1948
- CARINI, A. — Como fazer o diagnóstico experimental em casos suspeitos de leptospiroses. *Arq. Biol.* 32(287):144-146, set./out. 1948. 54
- CARINI, A. — Leptospiroses. *Arq. Biol.* 32(287):97-100, set./out. 1948. 55
- GUIDA, V. O. — Estudos sobre leptospirose canina. I. Primeiros resultados de pesquisa em cães normais. *Bol. Soc. Paul. Med. Vet.* 8(2):65-69, jun. 1948. 56
- GUIDA, V. O. — Estudos sobre a leptospirose canina. II. Isolamento e identificação de amostras de "leptospira". *Rev. Bras. Biol.* 8(4):541-543, dez. 1948. 57
- GUIDA, V. O. — Leptospirose canina. *Bol. Soc. Paul. Med. Vet.* 8(2):61-64, jun. 1948. 58
- GUIDA, V. O. — Sobre a presença de leptospira em suínos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 18:285-287, jan. 1947/48. 59
- LOUZADA, A. — Espiroquetose ictero-hemorrágica. *Rev. Med. Rio Grande do Sul*, 4(23):212-225, maio/jun. 1948. 60
- 1949
- CORRÊA, M. O. A. & MEIRA, J. A. — Sobre um caso de febre canícola no homem. *Rev. Med. Cir. São Paulo*, 9(4):185-202, abr. 1949. 61
- GUIDA, V. O. — Estudo comparativo de meios de cultura para isolamento de leptospira. *Bol. Soc. Paul. Med. Vet.* 8(3):129-132, jun. 1949. 62
- GUIDA, V. O. — Estudo sobre a leptospirose canina. III. Presença de aglutininas e lisinas em soro de cães da cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Biol.* 9(1):35-37, mar. 1949. 63
- GUIDA, V. O. — Estudos sobre a leptospirose canina. IV. Pesquisas sobre os caracteres antigênicos de uma cepa isolada de cão. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 19:149-152, nov. 1949. 64
- GUIDA, V. O. — Identificação sorológica de leptospiroses e pesquisa de anticorpos em ratos (*R. norvegicus*) capturados na cidade de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 19:85-92, out. 1949. 65
- GUIDA, V. O. & MONICI, N. — Estudo comparativo de métodos de pesquisa de leptospira em ratos. *Bol. Soc. Paul. Med. Vet.* 8(3):133-139, jun. 1949. 66
- GUIDA, V. O. & MONICI, N. — Incidência de leptospiroses em diversas espécies de animais. I. Frequência no rato (*Rattus norvegicus*). *Rev. Paul. Med.* 35(2):121-124, ago. 1949. 67
- GUIDA, V. O. & MONICI, N. — Incidência de leptospiroses em diversas espécies de animais. II. Frequência no cão (*Canis familiaris*). *Rev. Paul. Med.* 35(6):425-428, dez. 1949. 68
- SANTOS, M. — Algumas observações sobre a leptospirose experimental. *Rev. Bras. Biol.* 9(4):523, dez. 1949. [Resumo]. 69
- 1950
- GOMES, L. S., CORRÊA, M. O. A. & JORDÃO, F. M. — Incidência das leptospiroses humanas em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 10:93-109, 1950. 70
- GOMES, L. S., RIBAS, J. C., CORRÊA, M. O. A. & JORDÃO, F. M. — Incidência da leptospira em ratos nas cidades de São Paulo e Santos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 10:111-115, 1950. 71
- 1951
- MEIRA, J. A. & BLOISE, W. — Aureomicina no tratamento da moléstia de Weil. (a propósito de um caso). *Rev. Med. Cir. São Paulo*, 11(5):233-248, maio, 1951. 72
- BARBOZA, M. & HIPOLITO, O. — *Leptospira ictero-haemorrhagiae* em ratos (*Rattus norvegicus*) em Belo Horizonte. *Arq. Esc. Sup. Vet. Univ. Rur. Minas Gerais*, 5:12-15, 1952. 73
- BITENCOURT, J. M. T., CORRÊA, M. O. A., FUJIOKA, T., TRANCHESI, B. & BEDRIKOW, B. — O líquido cefalorraquidiano na moléstia de Weil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 12:145-161, 1952. 74
- CORRÊA, M. O. A. — Diagnóstico de laboratório das leptospiroses humanas. *Pinheiros Terap.* 4(13):1-2, jan./mar. 1952. 75
- GUIDA, V. O. — Ocorrência de leptospiroses em animais domésticos em São Paulo, Brasil. *Arq. Biol. Tecnol.* 7:9-20, 1952. 76
- GUIDA, V. O. — Pesquisas sorológicas de uma amostra de leptospira isolada de porcos. *Arq. Biol. Tecnol.* 7:21-22, 1952. 77
- MEDINA, H. — Aplicação do meio de Korthoff no preparo de suspensões de leptospiroses para fins de soro-aglutinação na doença de Weil. *Arq. Biol. Tecnol.* 7:29-32, 1952. 78

CORRÊA, M. O. A. & MEARIM, A. B. — Leptospiroses no Brasil. Levantamento bibliográfico de 1917 a 1970. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:87-101, 1971.

1953

MEIRA, J. A., VERONESI, R., TARTARI, J. T. de A. — Moléstia de Weil. A propósito de um caso tratado com Terramicina. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 8(1):1-9, jan. 1953. 79

TARTARI, J. T. de A., WAJCHENBERG, B. L., VERONESI, R., BOEHMER, O., MEIRA, J. A. & ULHOA CINTRA, A. B. de — Pancreatite aguda na leptospirose ictero-hemorrágica. (Moléstia de Weil). *Rev. Med. Cir. S. Paulo*, 13(6):297-314, jun. 1953. 80

1954

ANDRADE, Z. A. & OLIVEIRA, J. C. — Estudos sobre a leptospirose na Bahia. *Bol. Fund. Gonçalo Moniz*, n.º 3:1-28, 1954. 81

CORRÊA, M. O. A., AMATO NETO, V., VERONESI, R. & BRANDÃO, C. H. — Inquérito sorológico para o diagnóstico de leptospiroses entre lavradores de arrozais do vale do Rio Paraíba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 14:33-37, 1954. 82

ENRIETTI, M. A. — Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospiroses em murídeos, caninos e suínos no Paraná. *Arq. Biol. Tecnol.* 9:21-72, 1954. 83

VERONESI, R. — Leptospiroses. *Fich. Med. Terap. Labofarma*, 16(65):2-8, maio/jun. 1954. 84

VERONESI, R., AMATO NETO, V., & CORRÊA, M. O. A. — Considerações em torno de um caso humano de febre canícola. *Hospital*, Rio de Janeiro, 46(6):571-579, dez. 1954. 85

1955

CASTRO, R. M., AMATO NETO, V., FERREIRA, J. M. — Leptospirose determinada por *Leptospira grippo-typhosa*. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 10(3):204-208, maio/jun. 1955. 86

CORRÊA, M. O. A., AMATO NETO, V., VERONESI, R. & FABBRI, O. S. — Leptospiroses em eqüinos: Inquérito sorológico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 15:186-193, 1955. 87

FERREIRA, J. M. & ROCHA, H. — Tetraciclina no tratamento da moléstia de Weil. (a propósito de um caso) *Rev. Bras. Med.* 12(5):285-287, maio, 1955. 88

SANTOS, M. & MUTH, H. — Alguns aspectos citológicos da *Leptospira icterohaemorrhagiae* em microscópio eletrônico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 53(2/4):601-607, jun./dez., 1955. 89

1956

VERONESI, R., AMATO NETO, V. & CORRÊA, M. O. A. — Leptospiroses em cães da cidade de São Paulo. Inquérito sorológico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 16:78-84, 1956. 90

1957

CASTRO, R. M. — Tratamento das leptospiroses. *Pinheiros Terap.*, 10(40):1-2, nov./dez. 1957. 91

FREITAS, D. C. de, VEIGA, J. S., LACERDA JR., P. M. G. & LACERDA, J. P. — Identificação da leptospirose bovina no Brasil. (Bovine leptospirosis in Brazil). *Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo*, 6(1):81-83, dez. 1957. 92

1958

ELKIS, H., ROZENBOJN, J., AMATO NETO, V., KURBAN, S. T. & MEIRA, J. A. — Valor da determinação da mucoproteína sérica no diagnóstico diferencial entre leptospirose e hepatite por vírus. *Hospital*, Rio de Janeiro, 54(4):555-559, out. 1958. 93

GUIDA, V. O. — Identificação sorológica de amostras de leptospira (*L. hyos*) isoladas de suínos. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 25:73-75, nov. 1958. 94

GUIDA, V. O. & BARROS, W. M. — Pesquisa de aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos aparentemente normais, sacrificados em matadouro. *Biológico*, 24(2):26-27, fev. 1958. 95

MONTENEGRO, M. R., GALVAO, P. A. A. & BASTOS, C. de O. — Aspectos histopatológicos do fígado na moléstia de Weil. Estudo comparativo das lesões observadas em necropsias e biopsias. In: *Congresso Brasileiro de Gastroenterologia*, 10.º, Belo Horizonte, 1958, p. 39. [Resumo]. 96

PRATA, A. & TEIXEIRA, R. — Leptospirose na Bahia. *Hospital*, Rio de Janeiro, 53(6):827-837, jun. 1958. 97

1959

ALBUQUERQUE, F. J. M., MEIRA, J. A. & AMATO NETO, V. — Leptospirose por *Leptospira grippo-typhosa*: sobre um novo caso humano diagnosticado em São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1(3):214-218, set./out. 1959. 98

ALBUQUERQUE, F. J. M., MEIRA, J. A. & AMATO NETO, V. — Leptospirose por *Leptospira grippo-typhosa*: sobre um novo caso humano observado em nosso meio. *Rev. Paul. Med.* 54(1):57, jan. 1959. [Resumo] 99

CASTRO, R. M. — Leptospiroses. *Rev. Roche*, 19(5):150-159, maio, 1959, 19(6):182-191, jun. 1959; 19(7):217-222, jul. 1959. 100

GUIDA, V. O. — Leptospiroses. *Biológico*, 23(6):115-120, jun. 1959. 101

GUIDA, V. O., CINTRA, M. L., SANTA ROSA, C. A., CALDAS, A. D., CORRÊA, M. O. A. & NATALE, V. — Leptospirose suína provocada por *L. canícola*, em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 26:49-59, dez. 1959. 102

- GUIDA, V. O., SANTA ROSA, C. A., D'APICE, M., CORRÊA, M. O. A. & NATALE, V. — Pesquisa de aglutininas anti-leptospira no sôro de bovinos do Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 26:109-117, dez. 1959. 163
- VERONESI, R. & CORRÊA, M. O. A. — Leptospiroses. Atualização do assunto, particularmente das recentes pesquisas realizadas em São Paulo. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, São Paulo, 14(1):11-24, jan./fev. 1959. 104
- 1960
- CORDEIRO, F. — Leptospiras aisladas de rãton *Mus musculus brevirostris* en el Rio de Janeiro, Brasil. *Zoonosis*, 12(2):99-100, jun. 1960. [Resumo]. 105
- DEL NEGRO, G. & YABUTA, D. — Emprêgo de um nôvo antibiótico (Demetilclortetraciclina) na moléstia de Weil. Resultados preliminares. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 2(3):140-146, maio/jun. 1960. 106
- FREITAS, D. C. de, LACERDA, J. P. G. de, GOMES, C. E. de S. & LIMA, F. P. — Notas sôbre leptospirose eqüina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 27:93-98, dez. 1960. 107
- LACERDA Jr., P. M. G., FREITAS, D. C. de & LACERDA, J. P. G. de — Notas sôbre leptospirose bovina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 27:87-91, dez. 1960. 108
- 1961
- CASTRO, A. F. P. de, SANTA ROSA, C. A. & TROISE, C. — Preás (*Cavia aperae azarae*, Lich.) (Rodentia: cavidae) como reservatório de leptospira em São Paulo. Isolamento da *Leptospira ictero-haemorrhagiae*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 28:219-223, nov. 1961. 109
- EDELWEISS, E. L. — Sôbre um caso de febre canicola. *Rev. Med. Rio Grande do Sul*, 17(95/96):205, jul./dez. 1961. [Nota prévia]. 110
- SANTA ROSA, C. A., CASTRO, A. F. P. de & TROISE, C. — Isolamento de *Leptospira ictero-haemorrhagiae* de bovino em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 28:113-118, out. 1961. 111
- SANTA ROSA, C. A., CASTRO, A. F. P. de & TROISE, C. — Leptospirose bovina. Inquérito sorológico na região de Campinas. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 28:169-173, out. 1961. 112
- SCHMIDT, B. J., MACHADO, C. G. & GEBARA, A. J. — Valor da desidrogenase isocítrica no diagnóstico diferencial entre hepatites por vírus e moléstia de Weil. *Rev. Paul. Med.* 59(4):266-269, out. 1961. 113
- BABUDIERI, B. — Studio di due ceppi di leptospire acquicole isolate in Argentina ed in Brasile. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 12:93-96, 1962. 114
- BARBOZA, M. — Aglutininas e lisinas anti-leptospira em sôro de bovinos, eqüinos e suínos em Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. Minas Gerais*, 14:1-26, 1962. 115
- CASTRO, A. F. P. de, SANTA ROSA, C. A. & CALDAS, A. D. — Isolamento de *L. canicola* de suínos abatidos em matadouro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 29:193-197, set. 1962. 116
- CASTRO, A. F. P. de, SANTA ROSA, C. A., TROISE, C. & CALDAS, A. D. — Leptospirose canina em São Paulo: inquérito sorológico e isolamento da *L. icterohaemorrhagiae*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 29:199-205, set. 1962. 117
- EDELWEISS, E. L. — *Leptospiroses humanas*. (Contribuição ao seu estudo) Pôrto Alegre, 1962. 257p. [Tese Livre-Doc. — Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre]. 118
- MAGALDI, C. — *Contribuição à epidemiologia das leptospiroses. Investigação em trabalhadores da Rede de Esgotos da cidade de São Paulo*. São Paulo, 1962. 114p. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]. 119
- SANTA ROSA, C. A., CASTRO, A. F. P. de & CALDAS, A. D. — Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* e *Leptospira hyos* de suínos abatidos em matadouro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 29:285-292, out. 1962. 120
- SANTA ROSA, C. A., CASTRO, A. F. P. de & TROISE, C. — Isolamento de *Leptospira pomona* de suíno em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 29:165-174, jun. 1962. 121
- SANTA ROSA, C. A., CASTRO, A. F. P. de, TROISE, C. & RODRIGUES, F. M. — Leptospirose suína: tratamento com terramicina. *Biológico*, 28:(12):343-345, dez. 1962. 122
- VERONESI, R., ZERATI, A., COSTA, J. F., DEL NEGRO, G. & CORRÊA, M. O. A. — Leptospirose canicola. A propósito de um caso com icterícia e manifestações meníngeas. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 17(4):271-274, jul./agô. 1962. 123
- 1963
- AMATO NETO, V., MAGALDI, C., CORRÊA, M. O. A., GOMES, M. C. de O. & GALIZA, I. — Leptospirose canicola: verificação em tórno de um surto ocorrido em localidade próxima a São Paulo (capital). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5(6):265-270, nov./dez. 1963. 124

- BRITO, T. de, PENNA, D., ALMEIDA, S., GALVÃO, P. A. A. & PUPO, A. A. — Biópsia renal na leptospirose humana. In: *Congressos Internacionais de Medicina Tropical e Malária*, 7.º, Rio de Janeiro, 1963. Resumo de Trabalhos. p.253. 125
- CASTRO, R. M., CORRÊA, M. O. A. et alii — Inquérito sorológico sobre leptospiroses realizado no Vale do Cariri, Estado do Ceará, pela III Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Rev. Med.* 47:190-192, 1963. 126
- ELKIS, H., AMATO NETO, V. & MEIRA, J. A. — Transaminase glutâmico-oxalacética no soro de pacientes com leptospirose. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 4(4):217-219, jul./ago. 1963. 127
- GALVÃO, P. A. A., PEREIRA, V. G., ALBANO, A., BRITO, T. de, MARTIRANI, I., PUPO, A. A., PENNA, D. O. & BASTOS, C. de O. — Alguns aspectos do comprometimento renal nas leptospiroses. In: *Congressos Internacionais de Medicina Tropical e Malária*, 7.º, Rio de Janeiro, 1963. Resumo de Trabalhos. p.242. 128
- LOUZADA, A. & EDELWEISS, E. L. — Pesquisa de aglutininas no liquor de pacientes com leptospirose. In: *Congressos Internacionais de Medicina Tropical e Malária*, 7.º, Rio de Janeiro, 1963. Resumo de Trabalhos. p. 245-246. 129
- MAGALDI, C. — Incidência, prevalência e distribuição das leptospiroses no Brasil. *Arq. Hig. Saúde Públ.* 28(97):187-197, set. 1963. 130
- MEIRA, D. A. & SANTA ROSA, C. A. — Incidência de leptospirose na penitenciária do Estado. Estudo epidemiológico e clínico. In: *Congressos Internacionais de Medicina Tropical e Malária*, 7.º, Rio de Janeiro, 1963. Resumo de Trabalhos. p. 244-245. 131
- PENNA, D. O., BRITO, T. de, PUPO, A. A., MACHADO, M. M., GALVÃO, P. A. A. & ALMEIDA, S. S. de — Kidney biopsy in human leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12(6):896-901, nov. 1963. 132
- ROMANHOLI, J. A. — *Leptospirose na capital paranaense: contribuição à sua epidemiologia*. Curitiba, 1963. [Tese — Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Católica do Paraná]. 133
- SANTA ROSA, C. A. & CASTRO, A. F. P. de — Presença de aglutininas anti-leptospira em soros de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. *Arg. Inst. Biol.*, São Paulo, 30:93-98, fev. 1963. 134
- 1964
- CORRÊA, M. O. A., HYAKUTAKE, S., NATALE, V., TIRIBA, A. da C., GALVÃO, P. A. A. — Leptospiroses humanas ainda não assinaladas no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6(2):71-74, mar./abr. 1964. 135
- ELKIS, H., AMATO NETO, V., HUTZLER, R. U. & GOMES, M. C. de O. — Dosagem do ferro sérico e do fibrinogênio plasmático em casos de leptospiroses. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6(6):283-286, nov./dez. 1964. 133
- MEIRA, D. A. & SANTA ROSA, C. A. — Estudo epidemiológico e clínico da leptospirose em detentos de São Paulo. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 19(4):163-172, jul./ago. 1964. 137
- NOHMI, N. — Contribuição à epidemiologia das leptospiroses. Investigação em trabalhadores da Rede de Águas e Esgotos, armazens, restaurantes e feiras livres da cidade de Belo Horizonte, MG. *Hospital*, Rio de Janeiro, 65(3):617-629, mar. 1964. 138
- 1965
- AMATO NETO, V., MAGALDI, C. & CORRÊA, M. O. A. — Diagnóstico de leptospiroses através de reação de aglutinação efetuada com líquidos de serosas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7(5):267-269, set./out. 1965. 139
- BRITO, T. de — *Lesões renais e hepáticas na leptospirose experimental do cobaio*. Ribeirão Preto, 1965. 40p. [Tese Livre-Doc. — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto]. 140
- BRITO, T. de, FREYMULLER, E., PENNA, D. O., SANTOS, H. S., ALMEIDA, S. S. de, GALVÃO, P. A. A. & PEREIRA, V. G. — Electron microscopy of the biopsied kidney in human leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14(3):397-403, mar. 1965. 141
- MEIRA, D. A., WAINMAN, J. T., PILEGGI, P., SALLES, J. C. E., MEIRA, J. A. & DECOURT, L. V. — Comprometimento miocárdico na leptospirose. Estudo eletrocardiográfico e anatomo-patológico. *Arq. Bras. Cardiol.* 18(1):177-194, fev. 1965. 142
- SAN JUAN, F., TREIGER, M. & ABRAHÃO, L. — Doença de Weil. Apresentação de um caso. *Hospital*, Rio de Janeiro, 63(2):291-299, ago. 1965. 143
- SANTA ROSA, C. A., GALTON, M. M., SULZER, C. R. — Evaluation of a Polyvalent leptospiral vaccine in guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.* 26(113):979-983, 1965. 144
- 1966
- ALTERIO, D. L. & CUNHA, J. C. P. da — Leptospirose por *Leptospira* sentot: considerações a respeito do terceiro caso humano verificado no Brasil. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo* 21(4):199-201, jul./ago. 1966. 145
- BRITO, T. de, FREYMULLER, E., HOSHINO, S. & PENNA, D. O. — Pathology of the kidney and liver in the experimental leptospirosis of the guinea pig: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 341(1):64-68, apr. 1966. 146

- CASTRO, A. F. P. de, SANTA ROSA, C. A., ALMEIDA, W. F. & TROISE, C. — Pesquisa de aglutininas anti-leptospira entre magarefes em alguns municípios do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8(6):287-290, nov./dez. 1966. 147
- CORRÊA, M. O. A., AMATO NETO, V. & MAGALDI, C. — Leptospirose por *Leptospira bataviae*. Apresentação de um caso diagnosticado em São Paulo. *Rev. Paul. Med.* 69(7):103, agô. 1966. [Resumo]. 148
- CORRÊA, M. O. A., HYAKUTAKE, S., NATALE, V., GALVAO, P. A. A. & AGUIAR, H. de A. — Preliminary note about occurrence of *Leptospira wolfil* in São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8(1):53-54; jan./fev. 1966. 149
- COSTA, E. A. — *Investigação epidemiológica de leptospiroses em trabalhadores do Departamento Municipal de Água e Esgotos (D.M.A.E.) de Pôrto Alegre, Pôrto Alegre, 1966. 83p.* [Tese — Faculdade Católica de Medicina de Pôrto Alegre]. 150
- MACHADO, R., PONDE, A., VIANA, Y. C. & OLIVEIRA, G. — Alterações cardíacas na doença de Weil. Estudo clínico e eletrocardiográfico de 6 casos. *Hospital*, Rio de Janeiro, 69(4):727-735, abr. 1966. 151
- RESENDE, M., COSTA, C. A., LOBÃO, A. & MELO, G. B. — Primeiros casos de leptospiroses diagnosticados sorologicamente em Belém (Pará - Brasil). *An. Inst. Med. Trop. Lisboa*, 23(1/2):245-247, jan./jun. 1966. 152
- SILVA, R. M. da — *Estudo clínico e laboratorial da leptospirose icterohaemorrhagiae (Doença de Weil)*. Bahia, 1966. 85p. [Tese Livre-Doc. — Faculdade de Medicina da Bahia]. 153
- SILVA, R. M. da — *Estudo clínico e laboratorial da leptospirose ictero-hemorrhagiae (Doença de Weil)*. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* 18(2):281-368, abr./jun. 1966. 154
- 1967
- AZEVEDO, R. & CORRÊA, M. O. A. — Considerações em torno de surto de leptospirose na cidade de Recife (1966). *Arq. Hig.* 23(1):83-101, set. 1967. 155
- BRITO, T. de, MACHADO, M. M., MONTANES, S. D., HOSHINO, S. & FREYMULLER, E. — Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 342(1):61-69, apr. 1967. 156
- BRITO, T. de, PENNA, D. O., PEREIRA, V. G. & HOSHINO, S. — Kidney biopsies in human leptospirosis: a biochemical and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 343:124-135, 1967. 157
- CORRÊA, M. O. A., HYAKUTAKE, S., NATALE, V., GALVAO, P. A. A. & AGUIAR, H. de A. — Estudos sobre a *Leptospira wolfil* em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 25/27:11-25, 1965/1967. 158
- CORRÊA, M. O. A., HYAKUTAKE, S., OLIVEIRA, L. de, MARTINS, J. E. C. & AMATO NETO, V. — Inquérito sorológico para leptospirose entre trabalhadores da limpeza pública na cidade de São Paulo. *Rev. Paul. Med.* 70(2):102, fev. 1967. [Resumo]. 159
- GONÇALVES, A. J. R. & OLIVEIRA, S. M. R. de — Doença de Weil simulando obstrução do colédoco. Relato de um caso. *Bol. Cent. Est. Hosp. Serv. Est.* 19(7/9):127-133, jul./set. 1967. 160
- GONÇALVES, A. J. R., SANTINO FILHO, F. & DUARTE, F. — Doença de Weil. Aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e anatomo-patológicos de 14 casos. *Bol. Cent. Est. Hosp. Serv. Est.* 19(10/12):147-166, out./dez. 1967. 161
- GUIMARAES, S. J., RAUCCI NETO, J. & VIEIRA, M. E. P. — Leptospirose. Considerações gerais. Apresentação de 2 casos. *Arg. Bras. Med.* 54(2):128-138, abr./jun. 1967. 162
- HYAKUTAKE, S., CORRÊA, M. O. A., NATALE, V., COUTO, M. da C., NAZARI, R. & PACHECO, A. — Inquérito sorológico para o diagnóstico de leptospiroses entre cortadores de cana de açúcar de alguns municípios do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 25/27:111-114, 1965/1967. 163
- KAPLAN, S. & BARROSO, A. O. — Leptospirose por *L. canicola*. *Hospital*, Rio de Janeiro, 72(1):215-219, jul. 1967. 164
- LOUZADA, J. L. — Três casos benignos de doença de Weil. *Hospital*, Rio de Janeiro, 71(1):237-249, jan. 1967. 165
- MEIRA, D. A. — *Alterações cardíacas na leptospirose experimental do cão. Estudo eletrocardiográfico, anatomopatológico e sua importância na interpretação da patogenia da doença*. São Paulo, 1967. 104p. [Tese Livre-Doc. — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]. 166
- MELLO, M. T. de & SILVA, D. I. O. da — Prova de microdiluição para o diagnóstico sorológico de leptospirose usando antígenos comerciais. *Hospital*, Rio de Janeiro, 72(6):1877-1883, dez. 1967. 167
- 1968
- AGUAS inundam Recife de epidemia leptospirótica. Resultados recentemente divulgados indicam que enchentes provocaram quase duzentos casos. *AM*, 4(7):18-23, out. 1968. 168

- AZEVEDO, R. & CORRÊA, M. O. A. — Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade de Recife em 1966. Aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:85-111, 1968. 169
- BRITO, T. de — On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10(4):238-241, jul./agô. 1968. 170
- GALVÃO, P. A. A., SCHEINBERG, M., PEREIRA JR., W., FUCS, M., SONNEWEND, J. P. A. S., FAHRAT, C. K. & CORRÊA, M. O. A. — Leptospirose na infância. *Pediatr. Prat.* 39(3):155-160, mar. 1968. 171
- GOMES, M. C. de O., HYAKUTAKE, S. & CORRÊA, M. O. A. — Investigação sobre a ocorrência de leptospirose em trabalhadores de diversas profissões no distrito sede do município de Sorocaba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:19-26, 1968. 172
- SAN JUAN, F., DUARTE, F., TREIGER, M. & GONÇALVES, A. J. R. — Aspectos histológicos e funcionais do fígado na leptospirose icterohemorrágica. *Hospital*, Rio de Janeiro, 74(4):1125-1148, out. 1968. 173
- SANTA ROSA, C. A., CASTRO, A. F. P. de, CAMPEDELLI FILHO, O. & MELLO, D. de — Leptospirose em equinos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 35(2):61-65, abr./jun. 1968. 174
- SILVA, J. J. P., PAIVA, L. M., SOUZA NETO, B. A. de, SILVA, J. B. G. & COURA, J. R. — Estudo preliminar das leptospiroses no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2(6):317-337, nov./dez. 1968. 175
- 1969**
- ALY, J., HUTZLER, R. U., & AMATO NETO, V. — Aspectos laboratoriais relativos à leptospirose, decorrentes da observação de 41 pacientes internados no serviço de doenças transmissíveis do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(1):32, jan./fev. 1969. [Resumo] 176
- CORRÊA, M. O. A., NATALE, V., TIRIBA, A. da C., PEREIRA JR., W., SCHEINBERG, M., FAHRAT, C. K. & GALVÃO, P. A. A. — Leptospirose humana produzida por sorotipos pouco frequentes em nosso meio. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(1):44, jan./fev. 1969. [Resumo] 177
- CRUZ, J. — Alguns aspectos da prevenção de acidentes de moléstias profissionais no Departamento de Águas e Esgotos de São Paulo. *Rev. D.A.E.*, 29(71):25-29, mar. 1969. 178
- CRUZ, J., TREVISAN, S., MUNIZ, J. da C., LITIERI, P. & CÂMARA, R. U. F. — Leptospirose em trabalhadores da rede de esgotos da cidade de São Paulo. *Rev. D.A.E.* 29(74):77-80, dez. 1969. 179
- FAHRAT, C. K., CORRÊA, M. O. A., PEREIRA JR., W., SCHEINBERG, M., FRANCO, A. S. & GALVÃO, P. A. A. — Leptospirose humana por *Leptospira canicola*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(1):44, jan./fev. 1969. [Resumo] 180
- GALVÃO, P. A. A., FAHRAT, C. K., SCHULTE, G., TSUJI, H., PEREIRA, V. G. & BASTOS, C. de O. — Meningite por leptospirosas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(1):45, jan./fev. 1969. [Resumo]. 181
- GONÇALVES, A. J. R., SANTINO FILHO, F., QUAGLIATO JR., R. & SUZUKI, L. E. — Formas graves do síndrome de Weil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(2):95-100, mar./abr. 1969. 182
- NEVES, J., TONELLI, E., MARTINS, N. R. da L. L. & LISBOA, W. — Casos humanos de leptospirose infecção, diagnosticados em Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(1):16, jan./fev. 1969. [Resumo]. 183
- NOHMI, N., HYAKUTAKE, S. & SADATSUNE, T. — Inquérito sobre a incidência da toxoplasmose e das leptospiroses entre contribuintes do Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais. I. Amostra colhida ao acaso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(1):39, jan./fev. 1969. [Resumo]. 184
- SAN JUAN, F. — A leptospirose humana no Brasil. *Trib. Méd.* n.º 355:22-26, out. 1969. 185
- SANTA ROSA, C. A., KIPNIS, J., OSELKA, G. W., TCHERNIACOVSKI, I. & AMATO NETO, V. — Verificação de reações de soro-aglutinação para o diagnóstico de leptospirose positiva entre doadores do Banco de Sangue de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(1):31, jan./fev. 1969. [Resumo]. 186
- SANTA ROSA, C. A., SILVA, A. S. da & CASTRO, A. F. P. de — Leptospirose em morcegos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 36(4):175-178, out./dez. 1969. 187
- SILVA, J. B. G., PAIVA, L. M., SILVA, J. J. P., BARRETO NETO, M. & COURA, J. R. — A biopsia muscular no diagnóstico das leptospiroses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3(6):305-316, nov./dez. 1969. 188
- 1970**
- BASTOS, C. de O. & CORRÊA, M. O. A. — Leptospiroses: problema da Saúde Pública em São Paulo. In: *Programa do 18.º Congresso Brasileiro de Higiene*, São Paulo, 1970. p. 50 [Resumo]. 189
- BRITO, T. de, PENNA, D. O., HOSHINO, S., PEREIRA, V. G., CALDAS, A. C. P. G. & ROTHSTEIN, W. — Cholestasis in human leptospirosis: a clinical, histochemical, biochemical and electron microscopy study based on liver biopsies. *Beitr. Pathol. Anat.* 140(3):345-361, jun. 1970. 190
- CORRÊA, M. O. A. — Leptospiroses em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:29-37, 1969/70. 191

- CORRÊA, M. O. A., BASTOS, C. de O. & GALVÃO, P. A. A. — Leptospiroses: diagnóstico clínico e laboratorial (causal e funcional). In: *Programa do 18.º Congresso Brasileiro de Higiene*, São Paulo, 1970. p.50-51. [Resumo]. 192
- CORRÊA, M. O. A., NATALE, V., SADATSUNE, T. & FLEURY, G. C. — Valor prático do uso da *Leptospira semaranga patoc I* no diagnóstico das leptospiroses humanas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12(4):284-287, jul./agô. 1970. 193
- COSTA, C. A., REZENDE, M. & LINS, Z. — Leptospiroses no Estado do Pará e território Federal do Amapá. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30: 1-4, 1969/70. 194
- COSTA, E. A. et alii — Aspectos epidemiológicos da leptospirose em Salvador, Bahia. *Bol. Epidemiol.* 2(8):57,61, 64-68, abr. 1970. 195
- COSTA, E. A., CORRÊA, M. O. A., NATALE, V. & SADATSUNE, T. — Leptospirose com sêro-aglutinação positiva para *Leptospira javânica* em Boca do Acre, Amazonas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:13-18, 1969/70. 196
- EDELWEISS, E. L. — Leptospiroses no Rio Grande do Sul. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:5-11, 1969/70. 197
- GONÇALVES, A. J. R., DUARTE, F., RUBENS, J., HENRIQUE, S., BRASIL, M. H. & SALDANHA, L. F. — Doença de Weil com morte súbita por miocardite. *Hospital*, Rio de Janeiro, 77(1):83-93, jan. 1970. 198
- GONÇALVES, A. J. R., QUAGLIATO JR., R., FERREIRA, M., ABREU, T. de J. & HOETTE, M. — Leptospiroses no HSE. Janeiro a outubro de 1969. *Bol. Cent. Est. Hosp. Serv. Est.* 22(1): 27-36, jan./mar. 1970. 199
- MAGALHÃES, M. & VERÁS, A. — Aspectos sorológicos da leptospirose no Recife. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12(2):112-114, mar./abr. 1970. 200
- SANTA ROSA, C. A. — Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.* 1(2):97-109, out./dez. 1970. 201
- SANTA ROSA, C. A. — *Leptospirose em animais silvestres. Isolamento de um novo sorotipo, Brasiliensis no sorogrupo Bataviae*. São Paulo, 1970. 55p. [Tese — Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu] 202
- SANTA ROSA, C. A., CAMPEDELLI FILHO, O. & CASTRO, A. F. P. de — Isolamento de *Leptospira* sorotipos pomona e guidae de suínos aparentemente normais. In: *Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, 22.º, Salvador, 1970. Resumos. p.413. 203
- SANTA ROSA, C. A., CASTRO, A. F. P. de, SILVA, A. S. da & TERUYA, J. M. — Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:19-27, 1969/70. 204
- SANTA ROSA, C. A., COSCINA, A. L., CASTRO, A. F. P. de, SILVA, A. S. da & QUEIROZ, J. C. — Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em soros de trabalhadores de diversas profissões. *Rev. Microbiol.* 1(1):19-24, jul./set. 1970. 205
- SANTA ROSA, C. A., GIORGI, W., SILVA, A. S. da & TERUYA, J. M. — Aborto em suíno: isolamento conjunto de *Leptospira*, sorotipo icterohaemorrhagiae e *Brucella suis*. *Arg. Inst. Biol. São Paulo*, 37(1):9-13, jan./mar. 1970. 206
- SANTA ROSA, C. A., SILVA, A. S. da, & GIORGI, W. Aborto em suínos: isolamento de *Leptospira* sorotipo pomona e *Brucella suis*. In: *Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, 22.º, Salvador, 1970. Resumos. p.412. 207
- SANTINO FILHO, F., GONÇALVES, A. J. R., QUAGLIATO JR., R., HOETTE, M. & SUZUKI, L. E. — Doença de Weil com uremia prolongada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 4(3):189-194, maio/jun. 1970. 208
- TIRIBA, A. da C., PALHANO, D. P., DE FILIPPI, J., PESSOA, M. C., CALY, M. L. & LONGO, J. C. — Leptospirose ictero-hemorrágica: relato de um caso verificado com provável período de incubação menor de 24 horas. In: *Programa do 18.º Congresso Brasileiro de Higiene*, São Paulo, 1970. p.50. [Resumo]. 209
- 1971
- CORRÊA, M. O. A., AMATO NETO, V., PEDRO, R. de J., KONICHI, S. R. & FLEURY, G. C. — Considerações sobre caso humano de leptospirose canicosa com isolamento e identificação do agente etiológico, pela primeira vez no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 5(1):55-58, jan./fev. 1971. 210
- CORRÊA, M. O. A., HYAKUTAKE, S., NATALE, V., TIRIBA, A. da C., MARTIRANI, I., GALVÃO, P. A. A., ALBANO, A., DE FILIPPI, J., FAHRAT, C. K. & AMATO NETO, V. — Leptospirose humana por *Leptospira andamana*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 13(2):137-143, mar./abr. 1971. 211
- GALVÃO, P. A. A. — Leptospiroses humanas. *Arv Curandã*, n.º 5:82-89, jul. 1971. 212
- GONÇALVES, A. J. R., LINS, D. O., SUZUKI, L. E., DUARTE, F., FERREIRA, M. & ANDRADE, J. — O fígado nas leptospiroses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 5(2):67-98, mar./abr. 1971. 213

ABREVIATURAS DOS TÍTULOS DOS PERIÓDICOS INDEXADOS

- AM
AM: revista de Atualidades Médicas São Paulo, SP.
- Am. J. Trop. Med. Hyg.
AMERICAN JOURNAL of TROPICAL MEDICINE and HYGIENE, Baltimore, Md.
- Am. J. Vet. Res.
AMERICAN JOURNAL of VETERINARY RESEARCH, Chicago, Ill.
- An. Fac. Med. Univ. São Paulo
ANAIS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo, SP.
- An. Inst. Med. Trop., Lisboa
ANAIS DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL, Lisboa
- An. Paul. Med. Cir.
ANAIS PAULISTAS DE MEDICINA E CIRURGIA, São Paulo, SP.
- Arq. Biol.
ARQUIVOS DE BIOLOGIA, São Paulo, SP.
- Arq. Biol. Tecnol.
ARQUIVOS de BIOLOGIA e TECNOLOGIA, Curitiba, PR.
- Arq. Bras. Cardiol.
ARQUIVOS BRASILEIROS de CARDIOLOGIA, São Paulo, SP.
- Arq. Bras. Med.
ARQUIVOS BRASILEIROS DE MEDICINA, Rio de Janeiro, GB.
- Arq. Dep. Est. Saúde Rio Grande do Sul
ARQUIVOS DO DEPARTAMENTO ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, RS.
- Arq. Esc. Sup. Vet. Univ. Rur. Minas Gerais
ARQUIVOS DA ESCOLA SUPERIOR DE VETERINARIA DA UNIVERSIDADE RURAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, MG.
- Arq. Esc. Vet. Minas Gerais
ARQUIVOS DA ESCOLA DE VETERINARIA DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, MG.
- Arq. Hig.
ARQUIVOS DE HIGIENE, Rio de Janeiro, GB.
- Arq. Hig. Saúde Públ.
ARQUIVOS DE HIGIENE E SAÚDE PÚBLICA, São Paulo, SP.
- Arq. Inst. Biol.
ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO, São Paulo, SP.
- Arq. Rio Grand. Med.
ARQUIVOS RIOGRANDENSES DE MEDICINA Porto Alegre, RS.
- Beitr. Pathol. Anat.
BEITRAGE ZUR PATHOLOGISCHEN ANATOMIE UND ZUR ALLGEMEINEN PATHOLOGIE, Stuttgart
- Biológico
BIOLÓGICO, São Paulo, SP.
- Bol. Cent. Est. Hosp. Serv. Est.
BOLETIM DO CENTRO DE ESTUDOS DO HOSPITAL DOS SERVIDORES DO ESTADO, Rio de Janeiro, GB
- Bol. Fund. Gonçalo Moniz
BOLETIM DA FUNDAÇÃO GONÇALO MONIZ, Salvador, BA
- Bol. Soc. Med. Cir. São Paulo
BOLETIM DA SOCIEDADE DE MEDICINA E CIRURGIA DE SÃO PAULO, São Paulo, SP.
- Bol. Soc. Paul. Med. Vet.
BOLETIM DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINARIA, São Paulo, SP.
- Brasil Méd.
BRASIL MÉDICO, Rio de Janeiro, GB.
- Bull. Soc. Pathol. Exot.
BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE EXOTIQUE ET DE SES FILIALES, Paris
- Ciê. Méd.
CIENCIA MÉDICA, Rio de Janeiro, GB
- Fich. Med. Terap. Labofarma
FICHARIO MÉDICO TERAPÊUTICO LABOFARMA, São Paulo, SP
- Folha Méd.
FOLHA MÉDICA, Rio de Janeiro, GB
- Hospital, Rio de Janeiro
HOSPITAL, Rio de Janeiro, GB
- Impr. Méd.
IMPRENSA MÉDICA, Rio de Janeiro, GB
- J. Clín.
JORNAL DOS CLINICOS, Rio de Janeiro, GB

- J. Pediatr.
JORNAL DE PEDIATRIA, Rio de Janeiro, GB
- Med. Cir.
MEDICINA E CIRURGIA, Pôrto Alegre, RS.
- Med. Cir. Farm.
MEDICINA, CIRURGIA É FARMÁCIA, Rio de Janeiro, GB
- Mem. Inst. Oswaldo Cruz
MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, Rio de Janeiro, GB
- Pediatr. Prat.
PEDIATRIA PRÁTICA, São Paulo, SP
- Pinheiros Terap.
PINHEIROS TERAPÊUTICO, São Paulo, SP
- Rev. Bras. Biol.
REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.
REVISTA BRASILEIRA DE MALARIOLOGIA E DOENÇAS TROPICAIS, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Bras. Med.
REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA, Rio de Janeiro, GB
- Rev. D.A.E.
REVISTA DO D.A.E., São Paulo, SP
- Rev. Fac. Med. Vet., São Paulo
REVISTA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA, São Paulo, SP
- Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo
REVISTA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS, FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo, SP
- Rev. Inst. Adolfo Lutz
REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, São Paulo, SP
- Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo
REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO, São Paulo, SP
- Rev. Méd.
REVISTA DE MEDICINA, São Paulo, SP
- Rev. Méd. Bahia
REVISTA MÉDICA DA BAHIA, Salvador, BA
- Rev. Méd. Bras.
REVISTA MÉDICA BRASILEIRA, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Méd.-Cir. Brasil
REVISTA MÉDICO-CIRÚRGICA DO BRASIL, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Med. Cir. São Paulo
REVISTA DE MEDICINA E CIRURGIA DE SÃO PAULO, São Paulo, SP.
- Rev. Med. Militar
REVISTA DE MEDICINA MILITAR, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Méd. Paraná
REVISTA MÉDICA DO PARANÁ, Curitiba, PR
- Rev. Med. Rio Grande do Sul
REVISTA DE MEDICINA DO RIO GRANDE DO SUL, Pôrto Alegre, RS
- Rev. Microbiol.
REVISTA DE MICROBIOLOGIA, São Paulo, SP
- Rev. Paul. Med.
REVISTA PAULISTA DE MEDICINA, São Paulo, SP
- Rev. Roche
REVISTA ROCHE, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.
REVISTA DO SERVIÇO ESPECIAL DE SAÚDE PÚBLICA, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Soc. Bras. Med. Trop.
REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, Rio de Janeiro, GB
- Rev. Sud. Am. Med. Cir.
REVUE SUD-AMERICAINE DE MEDICINE ET CHIRURGIE, Paris
- Trib. Méd.
TRIBUNA MÉDICA, Rio de Janeiro, GB
- Virchows Arch. Pathol. Anat.
VIRCHOWS ARCHIV FÜR PATHOLOGISCHE ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE UND FÜR KLINISCHE MEDIZIN, Berlin
- Zoonosis
ZOONOSIS, Buenos Aires

ÍNDICE DE AUTORES

— A —

ABRAHAO, L. — 143
ABREU, T. de J. — 199
AGUAS inunda Recife de epidemia leptospirótica — 168
AGUIAR, H. de A. — 149, 158
ALBANO, A. — 128, 211
ALBUQUERQUE, F. J. M. — 98, 99
ALMEIDA, G. de — 31
ALMEIDA, S. — 125
ALMEIDA, S. S. de — 132, 141
ALMEIDA, W. F. — 147
ALTERIO, D. L. — 145
ALY, J. — 176
AMATO NETO, V. — 82, 85, 86, 87, 90, 93, 98, 99, 124, 127, 136, 139, 148, 159, 176, 186, 210, 211
ANDRADE, J. — 213
ANDRADE, Z. A. — 81
ARAGÃO, H. B. — 1
ARAÚJO, E. de — 17, 18, 20, 21
AZEVEDO, R. — 155, 169

— B —

BABUDIERI, B. — 114
BARBOZA, L. T. — 32, 40
BARBOZA, M. — 73, 115
BARRETO NETO, M. — 188
BARROS, W. M. — 95
BARROSO, A. O. — 164
BASTOS, C. de O. — 96, 128, 181, 189, 192
BEDRIKOW, B. — 74
BENTES, J. A. — 2
BITTENCOURT, J. M. T. — 74
BLOISE, W. — 72
BOEHMER, O. — 80
BRANDÃO, C. H. — 82
BRASIL, M. H. — 198
BRITO, T. de — 125, 128, 132, 140, 141, 146, 156, 157, 170, 190.

— C —

CALDAS, A. C. P. G. — 190
CALDAS, A. D. — 102, 116, 117, 120
CALY, M. L. — 209
CÂMARA, R. U. F. — 179
CAMPEDELLI FILHO, O. — 174, 203
CARINI, A. — 4, 54, 55
CARVALHO, B. de — 23
CASTRO, A. F. P. de — 109, 111, 112, 116, 117, 120, 121, 122, 134, 147, 174, 187, 203, 204, 205
CASTRO, R. M. — 86, 91, 100, 126
CHAVES, A. — 38
CINTRA, M. L. — 102
CLAUSELL, D. T. — 37, 38
CORDEIRO, F. — 105
CORRÊA, M. O. A. — 48, 61, 70, 71, 74, 75, 82, 85, 87, 90, 102, 103, 104, 123, 124, 126, 135, 139, 148, 149, 155, 158, 159, 163, 169, 171, 172, 177, 180, 189, 191, 192, 193, 196, 210, 211
COSCINA, A. L. — 205
COSTA, B. — 38

COSTA, C. A. — 152, 194
COSTA, E. A. — 150, 195, 196
COSTA, J. F. — 123
COURA, J. R. — 175, 188
COUTO, M. da C. — 163
CRUZ, J. — 178, 179
CUNHA, C. V. da — 38, 39
CUNHA, J. C. P. da — 145

— D —

DACORSO FILHO, P. — 33, 43
D'APICE, M. — 103
DEANE, M. P. — 49
DECOURT, L. V. — 142
DE FILIPPI, J. — 209, 211
DEL NEGRO, G. — 106, 123
DUARTE, F. — 161, 173, 198, 213

— E —

EDELWEIS, E. L. — 110, 118, 129, 197
ELKIS, H. — 93, 127, 136
ENRIETTI, M. A. — 83

— F —

FABBRI, O. S. — 87
FAHRAT, C. K. — 171, 177, 180, 181, 211
FAILLACE, J. M. — 38
FARACO, A. — 51
FERREIRA, J. M. — 86, 88
FERREIRA, M. — 199, 213
FIALHO, A. — 28, 29
FLEURY, G. C. — 193, 210
FONSECA, F. — 25
FORATTINI, O. P. — 50, 51
FORTUNA, F. — 22
FRANCO, A. S. — 180
FREITAS, D. C. de — 92, 107, 108
FREYMULLER, E. — 141, 146, 156
FUCS, M. — 171
FUJIOKA, T. — 74

— G —

GALIZA, I. — 124
GALTON, M. M. — 144
GALVAO, P. A. A. — 96, 125, 128, 132, 135, 141, 149, 158, 171, 177, 180, 181, 192, 211, 212
GEBARA, A. J. — 113
GIORGI, W. — 206, 207
GOMES, C. E. de S. — 107
GOMES, L.S. — 24, 26, 70, 71
GOMES, M. C. de O. — 124, 136, 172
GONCALVES, A. J. R. — 160, 161, 173, 182, 198, 199, 208, 213
GUIDA, V. O. — 56, 57, 58, 59, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 76, 77, 94, 95, 101, 102, 103
GUIMARÃES, S. J. — 162

- H ---
HENRIQUE, S. --- 198
HIPOLITO, O. --- 73
HOETTE, M. --- 199, 208
HOSHINO, S. --- 146, 156, 157, 190
HUTZLER, R. U. --- 136, 176
HYAKUTAKE, S. --- 135, 149, 158, 159, 163, 172, 184, 211
- J ---
JORDAO, F. M. --- 70, 71
- K ---
KAPLAN, S. --- 164
KIPNIS, J. --- 186
KONICHI, S. R. --- 210
KURBAN, S. T. --- 93
- L ---
LACERDA, J. P. --- vide LACERDA, J. P. G. de
LACERDA, J. P. G. de --- 92, 107, 108
LACERDA JR., P. M. G. --- 92, 108
LIMA, F. P. --- 107
LINS, A. --- 13
LINS, D. O. --- 213
LINS, Z. --- 194
LISBOA, W. --- 183
LITIERI, P. --- 179
LOBAO, A. --- 152
LOMBARDI, F. --- 44
LONGO, J. C. --- 209
LOUZADA, A. --- 35, 60, 129
LOUZADA, J. L. --- 165
- M ---
MAC DOWELL, A. --- 3, 14, 23
MACHADO, C. G. --- 113
MACHADO, L. S. --- 36
MACHADO, M. M. --- 132, 156
MACHADO, R. --- 151
MAGALDI, C. --- 119, 124, 130, 139, 148
MAGALHÃES, A. --- 8
MAGALHÃES, M. --- 200
MARTINS, J. E. C. --- 159
MARTINS, N. R. da L. L. --- 183
MARTIRANI, I. --- 128, 211
MATTA, A. da --- 5, 6
MAZZARI, R. --- 163
MEDINA, H. --- 38, 78
MEIRA, D. A. --- 131, 137, 142, 166
MEIRA, J. A. --- 48, 61, 72, 79, 80, 93, 98, 99, 127, 142
MELLO, D. de --- 174
MELLO, M. T. de --- 167
MELO, G. B. --- 152
MELO, S. T. P. de --- 41
MIRANDA, R. N. --- 47
MIYAJIMA, M. --- 7
MONICI, N. --- 66, 67, 68
MONTANES, S. D. --- 156
MONTENEGRO, J. --- 51
MONTENEGRO, M. R. --- 96
- MUHLENS, P. --- 27
MUNIZ, J. da C. --- 179
MUTH, H. --- 89
- N ---
NATALE, V. --- 102, 103, 135, 149, 158, 163, 177, 193, 196, 211
NEVES, J. --- 183
NOBREGA, P. --- 52
NOHMI, N. --- 138, 184
- O ---
OLIVEIRA, G. --- 151
OLIVEIRA, J. C. --- 81
OLIVEIRA, L. de --- 159
OLIVEIRA, S. M. R. de --- 160
OSELKA, G. W. --- 186
- P ---
PACHECO, A. --- 163
PAIVA, L. M. --- 175, 188
PALHANO, D. P. --- 209
PATRICIO, L. D. --- 48
PEDRO, R. de J. --- 210
PENNA, D. O. --- 125, 128, 132, 141, 146, 157, 190
PEREIRA, V. G. --- 128, 141, 157, 181, 190
PEREIRA JR., W. --- 171, 177, 180
PESSOA, M. C. --- 209
PILEGI, F. --- 142
PINHEIRO, D. --- 48
PIZA, J. T. --- 24
PONDE, A. --- 151
PRADO, A. --- 25
PRADO, A. de A. --- 34
PRATA, A. --- 97
PUPO, A. A. --- 125, 128, 132
- Q ---
QUAGLIATO JR., R. --- 182, 199, 208
QUEIROZ, J. C. --- 205
- R ---
RAUCCI NETO, J. --- 162
REZENDE, M. --- 152, 194
RIBAS, J. C. --- 71
ROCHA, H. --- 88
RODRIGUES, F. M. --- 122
ROMANHOLI, J. A. --- 133
ROTHSTEIN, W. --- 190
ROZENBOJN, J. --- 93
RUBENS, J. --- 198
- S ---
SADATSUNE, T. --- 184, 193, 196
SALDANHA, L. F. --- 198
SALLES, J. C. E. --- 142
SAN JUAN, F. --- 143, 173, 185
SANTA ROSA, C. A. --- 102, 103, 109, 111, 112, 116, 117, 120, 121, 122, 131, 134, 137, 144, 147, 174, 186, 187, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207

- SANTINO FILHO, F. — 161, 182, 208
SANTOS, C. — 42
SANTOS, H. S. — 141
SANTOS, M. — 45, 53, 69, 89
SCHEINBERG, M. — 171, 177, 180
SCHMIDT, B. J. — 113
SCHULTE, G. — 181
SEFTON, B. — 30
SILVA, A. S. da — 187, 204, 205, 206, 207
SILVA, D. I. O. — 167
SILVA, J. B. G. — 175, 188
SILVA, J. J. P. — 175, 188
SILVA, N. N. da — 38
SILVA, R. M. da — 153, 154
SMILLIE, W. — 9
SOARES NETO, F. P. — 15
SONNEWEND, J. P. A. S. — 171
SOUZA NETO, B. A. de — 175
SULZER, C. R. — 144
SUZUKI, L. E. — 182, 208, 213
- T —
- TARTARI, T. de A. — 79, 80
TCHERNIACOVISKI, I. — 186
TEIXEIRA, R. — 97
TERUYA, J. M. — 204, 206
TIRIBA, A. da C. — 135, 177, 209, 211
TONELLI, E. — 183
TORRES, O. — 10, 11, 12
- TRANCHESI, B. — 74
TRAVASSOS, G. — 23
TREIGER, M. — 143, 173
TREVISAN, S. — 179
TROISE, C. — 109, 111, 112, 117, 121, 122, 147
TSUJI, H. — 181
- U —
- ULHOA CINTRA, A. B. de — 80
- V —
- VARELA FUENTES, B. — 46
VEIGA, J. S. — 92
VERAS, A. — 200
VERONESI, R. — 79, 80, 82, 84, 85, 87, 90, 104, 123
VLANA, G. — 16
VIANA, Y. C. — 151
VIANA JR. — 16, 19
VIEIRA, M. E. P. — 162
- Y — W — Z —
- YABUTA, D. — 106
WAINMAN, J. T. — 142
WAJCHENBERG, B. L. — 80
ZERATI, A. — 123

Recebido para publicação em 11 de agosto de 1971.

ESTUDO HISTOQUÍMICO DA FIXAÇÃO DO GLICOGÊNIO
HEPÁTICO NO COELHO⁽¹⁾
HISTOCHEMICAL STUDY OF THE GLYCOGEN FIXATION IN RABBIT LIVER

LEONEL COSTACURTA⁽²⁾

S U M M A R Y

The author analyses the action of the picric acid, the Potassium bichromate, the acetic acid, the mercuric chlorid in aqueous solutions and the alcohol 95° in glycogen fixation of the rabbit liver, which has received intravenous injections of glucosic solutions. Sixty three different fixative solutions and the McManus method were used. It was possible to observe that the Potassium bichromate, as the picric acid, is an important ingredient in the fixative solutions of the glycogen liver.

I N T R O D U Ç Ã O

A preservação correta do glicogênio no interior das células de diferentes tipos de tecidos orgânicos ainda continua sendo motivo de novos e seguidos estudos. Em alguns tecidos (cartilagem hialina, epitélios estratificados escamosos) a fixação do glicogênio é relativamente fácil; entretanto, em outros (tecido muscular cardíaco, rim, placenta), isto é realmente difícil. No fígado, a preservação do glicogênio é moderadamente difícil e os resultados obtidos com as soluções fixadoras, recomendadas em histoquímica, não são concordantes nem convincentes. Esta é a razão porque propuzemos estudar a ação de diversas substâncias químicas sobre o glicogênio hepático, quer empregadas isoladamente, quer formando soluções compostas de dois, três ou quatro elementos.

As substâncias químicas utilizadas nesta pesquisa foram o ácido pícrico, o formol, o álcool, o ácido acético, o bricromato de potássio e o sublimado corrosivo, tendo-se em vista que as quatro primeiras são geralmente integrantes de soluções fixadoras comumente usadas em histoquímica, na preser-

vação do glicogênio dos tecidos orgânicos em geral. Com isto, esperamos trazer mais uma contribuição para o estudo da fixação do glicogênio das células hepáticas.

M A T E R I A L E M E T O D O S

Foram utilizados na presente pesquisa fragmentos de fígado de coelho que recebeu previamente a dose diária de 10 ml de soluto glicosado a 10%. O animal foi sacrificado no segundo dia e fragmentos de fígado foram mergulhados imediatamente em 63 soluções fixadoras geladas a 4°C; estas soluções eram combinações das seguintes substâncias químicas: ácido pícrico, formol, álcool, ácido acético, bricromato de potássio e sublimado corrosivo. Estas combinações encontram-se no quadro I.

Os fragmentos de fígado, após fixações, foram incluídos em parafina e, em seguida obtidos cortes com 9 microns de espessura, os quais foram distribuídos em uma série de oito lâminas, contendo cada uma um número de oito cortes conforme o quadro da pág. seguinte; foi obedecida a mesma ordem, em

(1) Realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da U.S.P. e na Faculdade de Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. Apresentado ao 5.º Congresso da Sociedade Brasileira de Anatomia, realizado na Fac. Med. U.F.R., Recife, em junho de 1970.

(2) Do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

| | | | | | | | | |
|-----|------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|---------|
| 1 - | P; | CP; | FP; | FCP; | AP; | ACP; | AFP; | AFCP; |
| 2 - | S; | CS; | FS; | FCS; | AS; | ACS; | AFS; | AFCS; |
| 3 - | SP; | CSP; | FSP; | FCSP; | ASP; | ACSP; | AFSP; | AFCSP; |
| 4 - | B; | CB; | FB; | FCB; | AB; | ACB; | AFB; | AFCB; |
| 5 - | BP; | CBP; | FBP; | FCBP; | ABP; | ACBP; | AFBP; | AFCBP; |
| 6 - | BS; | SBS; | FBS; | FCBS; | ABS; | ACBS; | AFBS; | AFCBS; |
| 7 - | BSP; | CBSP; | FBSP; | FCBSP; | ABSP; | ACBSP; | AFBSP; | AFCBSP; |
| 8 - | C; | F; | FC; | A; | AC; | AF; | AFC; | — |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |

A = Alcool 95°
 B = Bicromato de potássio
 C = Acido acético

F = Formol
 P = Acido pícrico
 S = Sublimado

bora a última lâmina tivesse um número de cortes inferior a oito. Para a identificação do glicogênio foi utilizado o processo de coloração de McMANUS² (1946).

RESULTADOS

O exame do material utilizado na presente pesquisa permitiu observar inicialmente que o ácido pícrico, o sublimado corrosivo, o bicromato de potássio, o formol e o ácido acético, quando empregados isoladamente em soluções aquosas e também o álcool a 95°, não preservam satisfatoriamente o glicogênio no interior das células hepática, tanto da superfície como da zona central dos cortes histológicos. O álcool a 95° fixa o glicogênio sob a forma de pequenas massas irregulares intracelulares na periferia do corte como um fenômeno de superfixação; o fenômeno de fuga "Alkoholflucht" é acentuado (Fig. 1).

Nas preparações em que os fragmentos de fígado de coelho foram submetidos à ação

de fixadores constituídos de duas das substâncias químicas em estudo, observa-se que:

- Quando se acrescenta na solução aquosa de ácido pícrico o sublimado corrosivo, formol, ácido acético ou o álcool 95°, a preservação do glicogênio no interior das células hepáticas é melhor (Fig. 2). Quando a solução aquosa de ácido pícrico se adiciona o bicromato de potássio, o glicogênio se torna mais evidente, embora sob a forma de grânulos irregulares, tanto nas células da periferia como nas da zona central dos cortes (Fig. 3).
- Quando, às soluções aquosas de sublimado corrosivo, se adiciona o ácido acético, formol ou bicromato de potássio, o glicogênio das células hepáticas é mal preservado; porém, a solução de sublimado corrosivo em álcool 95°, faz com que o glicogênio se evidencie intra e extracelularmente sob a forma de grânulos de tamanhos variados, especialmente na periferia dos cortes. O fenômeno de fuga é acentuado.
- A solução aquosa de bicromato de potássio

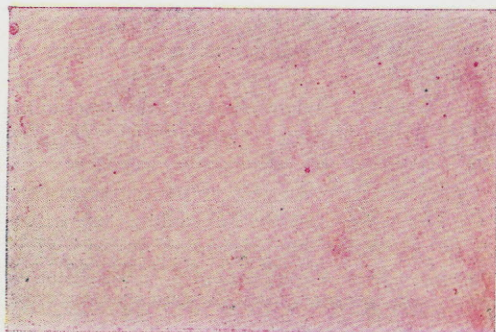


Fig. 1 — Fixação do glicogênio hepático de coelho em álcool 95°. Observar o fenômeno de fuga, uma característica do efeito do fixador sobre o glicogênio intracelular.

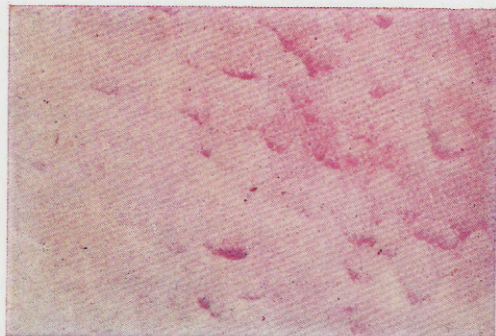


Fig. 4 — Com a solução de bicromato de potássio em álcool 95°, a fixação do glicogênio é feita em pequenas massas. O fenômeno da fuga sempre está presente.



Fig. 2 — Nas combinações binárias a fixação do glicogênio é melhor.

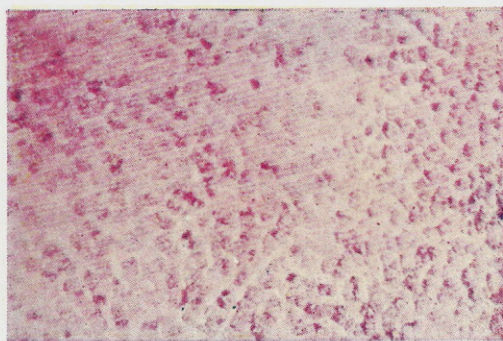


Fig. 5 — Fixação do glicogênio hepático em formol, ácido acético, bicromato de potássio e ácido pícrico em solução aquosa.



Fig. 3 — Na combinação ácido pícrico e bicromato de potássio em solução aquosa, o glicogênio hepático aparece sob a forma de grânulos irregulares, tanto na parte periférica como na zona central do corte.

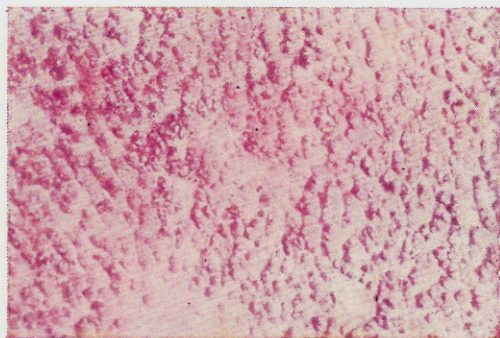


Fig. 6 — Fixação do glicogênio hepático em ácido pícrico, bicromato de potássio e formol em solução alcoólica a 95°.

à qual se adiciona o formol ou ácido acético e a solução de bicromato de potássio em álcool 95°, preservam o glicogênio hepático sob a forma de massas irregulares na periferia do corte histológico (Fig. 4). d) Com a adição de ácido acético glacial à solução aquosa de formol a 10%, a preservação do glicogênio é má; quando se adiciona álcool 95° à solução de formol a 10%, a fixação do glicogênio é semelhante àquela em que é usado somente o álcool 95°.

Entre as soluções compostas de três das substâncias químicas em estudo na fixação do glicogênio hepático, merecem ser destacadas aquelas nas quais participaram o ácido pícrico, o bicromato de potássio e o ácido acético em solução aquosa e a formada de bicromato de potássio, ácido pícrico e formol. Em ambas as soluções, o glicogênio hepático apareceu sob a forma de grânulos intracelulares e em áreas limitadas da superfície do corte histológico.

Das soluções compostas de quatro das substâncias químicas em estudo, destacaram-se aquelas formadas de: a) formol, ácido acético glacial, bicromato de potássio e ácido pícrico, em solução aquosa; b) ácido pícrico, formol, bicromato de potássio e álcool. Em a, o glicogênio foi preservado sob a forma de grânulos irregulares bem corados e dispersos regularmente no citoplasma das células hepáticas tanto da periferia como da zona central dos cortes histológicos (Fig. 5). Em b, o glicogênio apareceu bem corado sob a forma de massas irregulares nas células hepáticas de toda a superfície do corte, menos da sua zona central (Fig. 6); o fenômeno de fuga pode ser observado na superfície do corte.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu verificar que, embora PASTEELS & LÉONARD¹¹ (1935) tenham demonstrado que o ácido pícrico é o fator indispensável na solução de Bouin-Allen, o referido ácido, assim como o ácido acético glacial, o formol, o bicromato de potássio e o sublimado corrosivo, quando utilizados separadamente em solução aquosa, não se mostraram eficientes na fixação do glicogênio existente no interior das células hepáticas do coelho.

Na fixação em fase líquida constatou-se, nas combinações de duas, três e quatro substâncias químicas estudadas, a existência de interdependência de algumas destas substâncias, além da obrigatoriedade da participação do ácido pícrico na composição de soluções fixadoras do glicogênio hepático. Os artefatos de fixação, tais como o parecimento do glicogênio dentro das células sob a forma de grânulos ou pequenas massas irregulares, a fuga do glicogênio "Alkohlfucht" para o polo oposto ao de penetração dos fixadores, a superfixação e a presença de grânulos de glicogênio nos espaços intercelulares, foram relacionados a determinadas substâncias. Assim o fenômeno foi característico do efeito do álcool, formol e ácido acético; a presença de glicogênio sob a forma de finas granulações é característica do efeito do bicromato de potássio e do sublimado corrosivo. O ácido pícrico fixa o glicogênio em pequenas massas irregulares. Todos estes fatos nos levaram a considerar a escolha das diferentes substâncias químicas em estudo, na composição de uma solução fixadora do glicogênio hepático do coelho. Embora indicando a presença do glicogênio nas células hepáticas, deve ser lembrado que o ácido pícrico não age precipitando o glicogênio, mas sim imobilizando o substrato, provavelmente uma proteína (complexo glicogênio-proteína), ao qual o glicogênio está ligado (PASTEELS e LÉONARD, 1935). Então, a razão pela qual este ácido se torna indispensável na fixação do glicogênio, é que ele melhora a fixação do substrato.

Devido a existência dos diversos artefatos da fixação em fase líquida do glicogênio, é que vários autores procuraram outros meios de fixação do glicogênio, tais como a criodissecação e a congelação-dissolução (MANCINI⁶, 1947 e 1948; LISON⁵, 1949; BONDA-REFF², 1957).

Na fixação em fase líquida em que participaram quatro das substâncias químicas estudadas, observou-se que, na maioria das combinações quaternárias, a preservação do glicogênio hepático não foi satisfatória, mesmo com aquelas em que o ácido pícrico estava presente; em outras, embora com os artefatos apontados, o glicogênio foi evidente e bem identificado pelo processo de coloração de McManus. Entre estas, destacaram-se as constituídas por: a) ácido pícrico, formol, bicromato de potássio e ácido acético em

solução aquosa; b) ácido pícrico, bicromato de potássio e formol em solução alcoólica. Estas soluções apresentam composição química semelhante à daquela proposta por Gendre para a fixação do glicogênio. Porém nelas, observa-se a presença do bicromato de potássio e na primeira, a solução é aquosa. Isto vem confirmar as observações de BAUER¹ (1933), DEANE³ (1946), LILLIE⁴ (1947), MORGAN & MOWRY⁹ (1951) e MORRIONE & MAMELOK¹⁰ (1952) que, em soluções aquosas, se pode obter bons fixadores do glicogênio. Assim, em ambas as soluções fixadoras quaternárias, os resultados foram igualmente satisfatórios na preservação do glicogênio das células hepáticas, principalmente quando usadas a temperatura de 4°C, como foi observado em uma experimentação preliminar.

RESUMO

O autor analisa a ação do ácido pícrico, bicromato de potássio, ácido acético, formol e do sublimado corrosivo, em soluções aquosas e do álcool 95° no processo de fixação do glicogênio hepático de coelho que recebeu previamente injeções endovenosas de solução glicosada. Usando 63 combinações das substâncias químicas acima referidas e o processo de identificação do glicogênio dos tecidos orgânicos de McManus, ficou constatada a importância do bicromato de potássio, além do ácido pícrico, na composição de soluções fixadoras do glicogênio hepático de coelho, tanto em meio aquoso como alcoólico.

Agradecimento — Ao Dr. Evandro Pimenta de Campos, Chefe da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, que nos possibilitou a obtenção da documentação do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, H. — Mikroskopisch-chemischer Nachweis von Glykogen und einigen anderen Polysacchariden. *Z. mikr.-anat. Forsch.*, 33:143-160, 1933.
2. BONDAREFF, W. — Morphology of particulate glycogen in guinea pig liver revealed by electron microscopy after freezing and drying and selective staining in bloc. *Anat. Rec.*, 129:97-108, 1957.
3. DEANE, H. W. B. — Nasbett and Hastings, B. — Improved fixation for histological demonstration of glycogen and comparison with chemical determination in liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 63: 401, 1946.
4. LILLIE, R. D. — Reticulum staining with Schiff reagent after oxidation by acidified sodium periodate. *J. Lab. Clin. Med.*, 32:910-12, 1947.
5. LISON, L. — Sur la fixation histochimique du glycogène. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 143:115-6, 1949.
6. MANCINI, R. E. — Nueva reacción del yodo para la investigación del glucógeno en tejidos. *Soc. Anat. Nor. y Pat.*, 6:628-1947.
7. MANCINI, R. E. — Histochemical study of glycogen in tissue. *Anat. Rec.*, 101: 149-60, 1948.
8. McMANUS, J. F. A. — Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature (Lond.)*, 158:202, 1946.
9. MORGAN, C. and MOWRY, R. M. — Demonstration of glycogen in the human liver by the electron microscope. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76:850-2, 1951.
10. MORRIONE, T. G. and MAMELOK, H. L. — Observations on the persistence of hepatic glycogen after death. *Amer. J. Path.*, 28:497-502, 1952.
11. PASTEELS, J. et LÉONARD, M. G. — Sur la détection du glycogène dans les coupes histologiques *Bull. Histol. Appl.* 12: 293-317, 1935.

Recebido para publicação em 31 de agosto de 1971.

SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA BETAÍNA E COLINA EM MISTURA, POR CROMATOGRAFIA EM PAPEL ⁽¹⁾

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF BETAINE AND CHOLINE IN MIXTURE BY PAPER CHROMATOGRAPHY

WALDOMIRO PREGNOLATTO ⁽²⁾

MYRNA SABINO ⁽²⁾

CECY CHAHIN ⁽²⁾

It was described in this work a simple method for separation and identification of choline chloride and Betaine hydrochloride, when mixed in pharmaceutical preparation, using chromatography technique in ascendent paper.

The Rf of both substances have been established, whether when mixed with pharmaceutical products whether separated in a simple water solution.

Satisfactory results are got in separation and identification of Betaine and Choline in above conditions.

INTRODUÇÃO

Identificar a betaína, quando pura, não constitui problema. A literatura já registra para isso alguns métodos ^{1, 10}. Constitui, porém, uma problema a identificação da Betaína em presença de Colina, principalmente em produtos farmacêuticos.

Valendo-se do método estabelecido por APPLETON *et alii* ² para determinação de Colina, WALL *et alii* ¹¹ determinaram espectrofotometricamente Betaína e outros compostos quaternários nitrogenados.

Outros métodos para separar Betaína de Colina têm sido indicados mas, além de trabalhosos, são demorados pois utilizam-se da técnica de cromatografia em coluna ^{4, 5, 6}, camada delgada bi-dimensional, ou eletroforese ⁹.

A Cromatografia em papel para separar bases quaternárias de amônia já foi anteriormente usada por BREGOFF *et alii* ³.

SANDI ⁸ descreve um reagente (ácido bromotálico) para a identificação de bases orgânicas como a Betaína, Colina e Nicotinamida e, especialmente, para diferenciá-las das

bases púricas como Cafeína, Teobromina e Teofilina.

Neste trabalho procuramos estabelecer um método rápido e prático, usando a técnica da cromatografia em papel ascendente pois, além de simples, pode ser executado num laboratório modesto. Para a identificação tanto da Betaína como da Colina usamos o reagente de Dragendorff modificado ⁶.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Material*

Papel Whatmann n.º 1

Cuba cromatográfica

Micropipetas

Cloreto de Colina E Merck AG

Cloridrato de Betaína E Merck AG

Hidróxido de Amônio

Subnitrato de Bismuto

Solvente — n-Butanol-Ácido Acético-Água (10:5:2)

Reagente de Dragendorff modificado com referências.

Preparar as soluções como segue:

(1) Trabalho realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

a) *Solução 1*

| | |
|-----------------------|---------|
| Subnitrato de Bismuto | 0.850 g |
| Ácido Acético Glacial | 10 ml |
| Água | 40 ml |

Solução 2

| | |
|--------------------|-------|
| Iodeto de Potássio | 8 g |
| Água | 20 ml |

Solução 3

Misture as soluções 1 e 2 e guarde na geladeira em frasco escuro.

b) *Reagente*

Prepare no momento de ser usado, o reagente de trabalho, da seguinte maneira:

| | |
|-----------------------|-------|
| Solução 3 | 10 ml |
| Ácido Acético Glacial | 20 ml |
| Água | 50 ml |

2. *Método*

Separação e identificação de Betaína e Colina

a) *Preparo da amostra*

Transfira para um balão volumétrico de 50 ml uma quantidade de amostra do produto a ser analisado de maneira que cada 10 microlitros da solução contenham de 50 a 100 microgramas de Betaína e 50 a 100 microgramas de Cloreto de Colina.

Adicione cerca de 25 ml de água e algumas gotas de NH_4OH N até acertar a um pH entre 8 e 9. Complete o volume com água, Homogenize.

b) *Cromatografia*

Transfira para tiras de papel Whatman n.º 1, de 3x13 cm, com linha de partida a 2 cm da base e o fronte a 1 cm da altura, 10 microlitros da solução obtida em a. Seque ao ar.

Desenvolva a cromatograma de maneira ascendente, usando como solvente a solução n-Butanol-ácido acético-água (10:5:2). O solvente deverá atingir o fronte depois de 2h30m a 3 horas, após o início do desenvolvimento do cromatograma.

Seque o papel em corrente de ar e revele com o reagente de Dragendorff.

A mancha vermelha que aparece imediatamente a um Rf de 0,72 a 0,84 corresponde à Cloreto Colina e a mancha amarelo-laranja que aparece após alguns minutos e a um Rf de 0,36 a 0,50, corresponde à Betaína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se cromatografa separadamente Betaína e Colina nas condições descritas, obtém-se para Betaína um Rf de 0,54 e, para Colina, o Rf de 0,84.

Ao se revelar o cromatograma da Betaína sem Colina, a mancha amarelo-laranja aparece mais rapidamente.

Para seleção do solvente, foram testadas as seguintes misturas:

- Butanol — Etanol (1:1)
- Etanol — Ácido Acético (1:1)
- Etanol — Butanol — Amônia (10:4:2) e (9:5:2)
- Etanol a 60 — Acetona a 38% — Ácido Acético a 2% (10:5:2)
- Metanol — Acetona (1:1)
- Etanol — Acetona — Amônia (10:5:2)
- Etanol — Butanol — Ácido Acético (10:5:2) e (10:10:2)
- Butanol — Ácido Acético (100 ml Butanol — 30 ml Ácido Acético para 80 a 90 ml água)
- Acetona — Ácido Acético (2:1)
- Etanol — Isopropanol (3:1) e (2:2)
- Etanol — Isopropanol — Amônia (3:1:1)
- Etanol — Isopropanol — Ácido Acético (3:1:1)
- Etanol a 95% — Amônia (95:5)
- Isobutanol — Ácido Acético — Água (3:1:1)
- Acetato de Etila — Ácido Acético — Água (3:1:1)
- Benzeno — Clorofórmio — Butanol (1:1:1) e (2:1:1)
- Benzeno — Clorofórmio (1:1)
- Butanol — Clorofórmio — Água (10:5:2)
- Butanol — Ácido Acético — Água (4:1:5); (4:4:1); (10:10:0,6) e (4:8:1).

De todos os solventes testados, conseguiu-se separação precária com os seguintes:

- Etanol — Isopropanol — Ácido Acético (3:1:1)
- Isobutanol — Ácido Acético — Água (3:1:1).

Com todos os outros, Betaína e Cloreto de Colina sempre caminhavam juntos.

Variações de pH foram testadas, e a separação da Colina da Betaína só foi possível quando a solução inicial se apresentava com pH entre 8 e 9.

Com este método conseguimos separar e identificar satisfatoriamente Cloreto de Colina, e Cloridrato de Betaína, constantes da formulação de diversos preparados farmacêuticos xaroposos, que continham, além destas substâncias, vitaminas do Complexo B, Lisina, alguns, também, citrato de ferro amoniacal.

Em xaropes contendo vitaminas do Complexo B e sais de ferro e aos quais adicionávamos Cloreto de Colina e Cloridrato de Betaína, na quantidade de 0,05 g/15 ml, sempre conseguimos separar e identificar aquelas substâncias.

CONCLUSÃO

Cloreto de Colina e Cloridrato de Betaína podem ser perfeitamente separados e identificados por cromatografia em papel, desde que respeitadas as condições de pH, tempo, e solvente descritas.

RESUMO

É descrito um método simples para separação e identificação de cloreto de Colina, e de Cloridrato de Betaína, quando em mistura em produtos farmacêuticos, usando a técnica da cromatografia em papel ascendente.

Foram estabelecidos os Rf de ambas as substâncias, quer quando em mistura em produtos farmacêuticos, quer separadas, em simples solução aquosa.

Conseguiram-se resultados satisfatórios na separação e identificação da Betaína e Colina nas condições e descritas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION FOUNDATION — Qualitative and quantitative tests for chloral betaine. *J. Pharm. Sci.*, 53:1385-6, 1964.
2. APPLETON, H. D.; LA DUE JR., B. N.; LEVY, B. B.; STEELE, J. M. & BRODIE, B. B. — A chemical method for the determination of free choline in plasma. *J. Biol. Chem.*, 205:803-13, 1953.
3. BREGOFF, H. M.; ROBERTS, E. & DELWICHE, C. C. — Paper chromatography of quaternary ammonium bases and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 205:565-74, 1953.
4. CHRISTIANSON, D. D.; WALL, J. S.; CAVINS, J. F. & DIMLER, R. J. — Chromatography of quaternary nitrogen compounds on buffered cation-exchange resins. *J. Chromatogr.*, 10:432-8, 1963.
5. HIRDY, O. & LOCHMANOVÁ, S. — Determination of choline and betaine in the presence of each other. *Ceskosl. Farm.*, 9(7):335-9, 1960, apud *Analyt. Abstr.*, 8:1164, 1961.
6. JANOT, M. M. & LEHIR, A. — *Chromatographie sur papier*. In LEDERER, E. — *Chromatographie en chimie organique et biologique*. Paris, Masson, 1959. v. 1, p.511.
7. NIEMANN, A. — Zur Trennung von Betain und Cholin an Ionenaustauschern. *J. Chromatogr.*, 9:117-8, 1962.
8. SANDRI, G. — Bromathallic acid as a new reagent for the identification of organic bases. *Mikrochem. Acta*, 2:253-8, 1958.
9. SPEED, D. & RICHARDSON, M. — Chromatographic methods for the isolation and identification of the products of choline oxidation. *J. Chromatogr.*, 35:497-505, 1968.
10. WALKER JR., H. G. & ERLANDSEN, R. — Rapid method for determination of betaine. *Analyt. Chem.*, 23(9):1309-11, 1951.
11. WALL, J. S.; CHRISTIANSON, D. D.; DIMLER, R. J. & SENTI, F. R. — Spectrophotometric determination of betaines and other quaternary nitrogen compounds as their periodides. *Analyt. Chem.*, 32(7):870-4, 1960.

INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO. PROVÁVEL DISSEMINAÇÃO POR VIA AÉREA

ENTEROBACTERIACEAE INFECTIONS IN SÃO PAULO, BRAZIL. PROBABLE DISSEMINATION BY RESPIRATORY ROUTE

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY⁽¹⁾
JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAES⁽¹⁾
GIL VITAL ÁLVARES PESSÓA⁽¹⁾

SUMMARY

The authors described an outbreak of enteritis caused by *Salmonella typhimurium* in three hospitals. *S. typhimurium* became established in three hospitals and always recovered from dust in the wards but not from the hospital staff. In 1969 the number of cases was 457 and the only reason for a so high incidence was the possibility of airborne infection.

INTRODUÇÃO

Não sendo as gastroenterites infecciosas moléstias de notificação compulsória e também nem sempre sendo fácil a obtenção de exames para o isolamento de enterobactérias, torna-se difícil avaliar a extensão do problema entre nós.

Sendo doenças que ocorrem quase sempre por contaminação fecal dos alimentos e da água, boas condições de saneamento devem promover o desaparecimento ou diminuição desse tipo de infecção. No entanto, em se tratando de salmonelas, tôdas medidas higiênicas postas em prática não determinaram diminuição de sua incidência, principalmente nos países onde existem melhores condições higiênicas e maiores facilidades de diagnóstico de laboratório^{1, 2, 5}.

No caso particular das salmonelas, assim como dos bacilos *coli* do grupo de gastroenterites infantis, vem sendo dada grande importância a uma via de infecção que até há pouco tempo não era levada em consideração

— a via respiratória. Já foi demonstrada a possibilidade da utilização dessa via de infecção em animais (CLEMMER *et alii*³, 1960, DARLOW, BALE & CARTER⁴, 1961), ficando evidenciado ser necessário, nesse caso, um número muito menor de germes do que aquele necessário para infectar por via digestiva. VAN OYE *et alii*⁶, em trabalho sôbre infecção gastrentérica em hospitais, dão grande importância a essa maneira de disseminação da doença em ambiente hospitalar.

RESULTADOS

No período de 1963-1969, a Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz realizou 14.517 coproculturas em fezes de adultos e crianças, provenientes dos vários distritos da cidade de São Paulo, assim como de hospitais gerais onde são atendidas crianças portadoras de infecções entéricas.

Nos quadros I e II estão condensados os resultados obtidos:

(1) Do Instituto Adolfo Lutz.

QUADRO I

Resultados das coproculturas realizadas de 1963 a 1969

| Resultados | N.º exames | % |
|-----------------------|------------|-------|
| Positivos | | |
| <i>Shigella</i> sp. | 539 | 3,70 |
| <i>Salmonella</i> sp. | 780 | 5,35 |
| <i>E. coli</i> G.E.I. | 418 | 2,01 |
| Negativos | 12 826 | 88,09 |
| Total | 14 563 | 99,95 |

QUADRO II

Distribuição dos resultados das coproculturas realizadas de 1963 a 1969

| Ano | N.º exames | Positivos | | N.º Negativos |
|-------|------------|-----------|------|---------------|
| | | N.º | % | |
| 1963 | 2923 | 207 | 7,0 | 2716 |
| 1964 | 2028 | 116 | 5,2 | 1912 |
| 1965 | 1922 | 98 | 4,8 | 1829 |
| 1966 | 1947 | 72 | 5,0 | 1425 |
| 1967 | 1528 | 95 | 6,2 | 1433 |
| 1968 | 1506 | 211 | 14,0 | 1295 |
| 1969 | 3113 | 897 | 29,8 | 2216 |
| Total | 14 517 | 1 691 | — | 12 826 |

O quadro III mostra a distribuição por espécie de enterobactérias patogênicas identificadas, onde não estão computados os casos positivos para *E. coli* G.E.I., porquanto só entraram na rotina do laboratório nos dois últimos anos de observação:

QUADRO III

Porcentagem de *Salmonella* e *Shigella* sp. isoladas de 1963 a 1969

| Ano | N.º exames | <i>Salmonella</i> sp. | | <i>Shigella</i> sp. | |
|------|------------|-----------------------|------|---------------------|-----|
| | | N.º | % | N.º | % |
| 1963 | 2923 | 50 | 1,7 | 157 | 5,0 |
| 1964 | 2028 | 53 | 2,6 | 63 | 3,1 |
| 1965 | 1922 | 41 | 2,1 | 52 | 2,7 |
| 1966 | 1497 | 26 | 1,8 | 40 | 2,7 |
| 1967 | 1528 | 25 | 1,6 | 51 | 3,3 |
| 1968 | 1506 | 62 | 4,1 | 58 | 3,8 |
| 1969 | 3113 | 523 | 16,8 | 118 | 3,7 |

A análise do quadro III indica que, a partir do ano de 1968, houve um nítido aumento do isolamento de salmonelas, ao passo que não se verificou o mesmo com relação aos bacilos disentericos.

Se verificarmos os sorotipos de salmonelas que foram encontrados, constatamos ter havido um número muito grande de casos pertencentes a salmonelas do grupo B, principalmente nos anos de 1968 e 1969, a maioria delas identificadas como *S. typhimurium*.

QUADRO IV

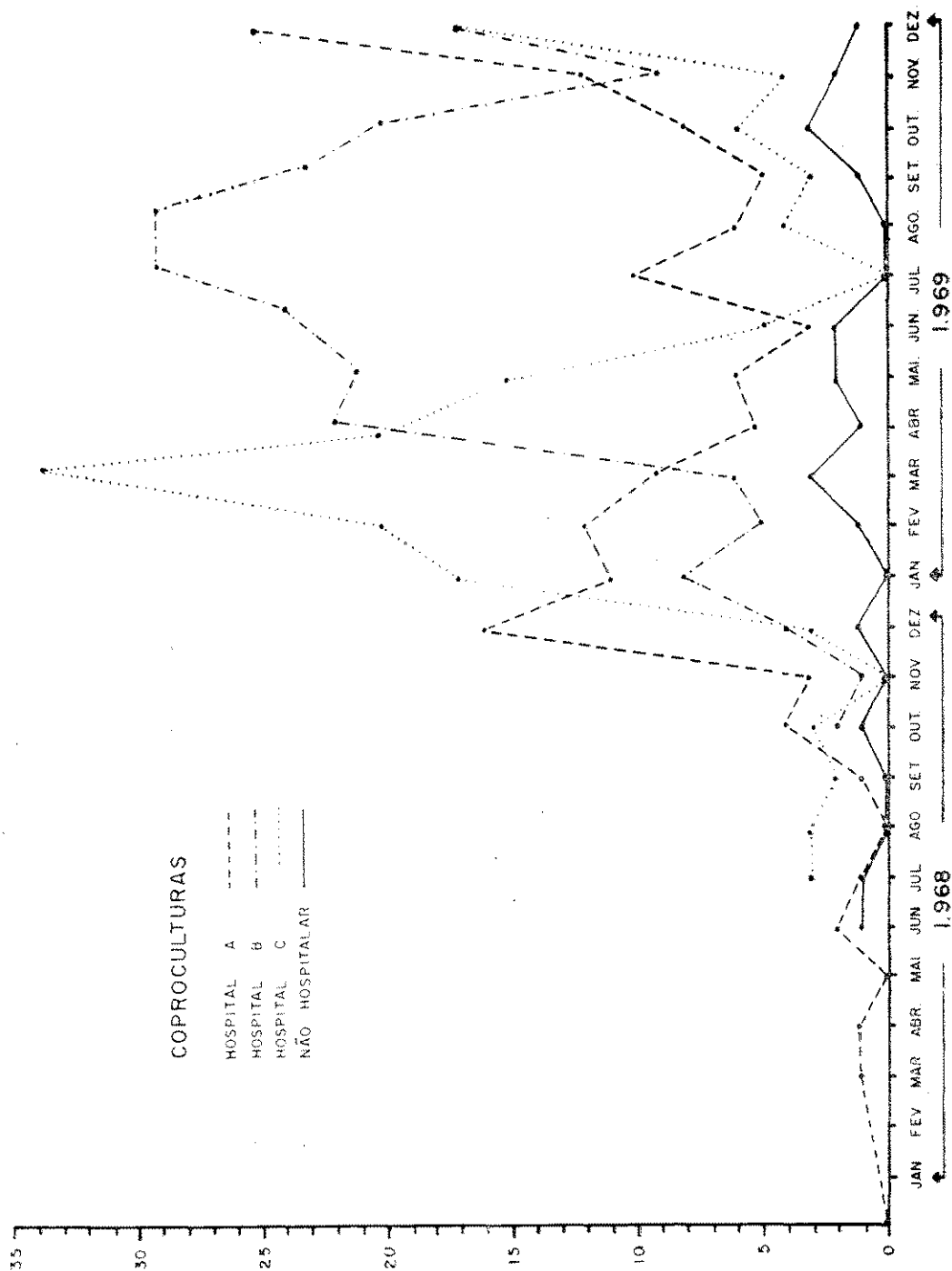
Comparação entre o número de isolamentos de *S. typhimurium* e de outras salmonelas, de 1963 a 1969.

| Grupo Ano | Grupo | | | | | | | <i>Salm.</i> sp. | Total | <i>S. typhimurium</i> |
|--------------|-------|-----|----|----|----|----|---|------------------|-------|-----------------------|
| | A | B | C1 | C2 | D | E1 | G | | | |
| 1963 | 2 | 12 | 9 | — | 12 | 15 | — | — | 50 | 10 |
| 1964 | — | 34 | 2 | 5 | 5 | 4 | — | 3 | 53 | 13 |
| 1965 | 1 | 20 | 3 | 4 | 11 | 1 | 1 | — | 41 | 4 |
| 1966 | 1 | 17 | — | 3 | 2 | 2 | — | 1 | 26 | 5 |
| 1967 | 1 | 8 | 3 | 1 | 9 | 3 | — | — | 25 | 3 |
| 1968 | 1 | 50 | 1 | 3 | 4 | 2 | — | 1 | 62 | 30 |
| 1969 | — | 487 | 8 | 3 | 14 | 7 | — | 4 | 532 | 457 |
| Total | 6 | 628 | 26 | 19 | 57 | 34 | 1 | 9 | 780 | 522 |

A quase totalidade desses exames foi realizada em material enviado por três hospitais que dão atendimento a crianças portadoras de infecções gastroentéricas agudas. O agente infeccioso foi pesquisado no ambiente hos-

pitalar e isolado da amostra de pó de três enfermarias dos hospitais suspeitos.

No gráfico está representado o número de casos provenientes dos hospitais que enviaram exames, assim como do material de pro-



cedência não hospitalar, nos anos de 1968 a 1969.

Pelo gráfico podemos ver que a epidemia iniciou-se em fins de 1968, permanecendo por todo o ano de 1969, quase sem respeitar os meses de inverno, como é regra em infecções dessa natureza. Paralelamente, em material não hospitalar, o isolamento da *S. typhimurium* revelou-se uniforme.

Como o germe foi introduzido nos três diferentes hospitais não podemos esclarecer. O exame do pessoal de enfermagem revelou, em um deles, a existência de dois ajudantes de enfermagem eliminando *S. typhimurium* nas fezes. Um grande número dessas crianças havia sido internado por motivos outros que não infecções gastrentéricas e foi contaminado em ambiente hospitalar. Parece-nos provável que seja a via aérea a responsável pela disseminação da infecção.

RESUMO

Os autores estudaram uma epidemia de *Salmonella typhimurium* ocorrida em três hospitais gerais nos anos 1968-1969, onde eram atendidas crianças portadoras de infecções entéricas. O agente infeccioso foi isolado do pó da varredura das enfermarias e, como muitos dos casos foram contaminados no pró-

prio hospital, atribuiu-se ser responsável a via aérea como ponto de entrada, única explicação para o elevado número de casos que foram registrados, 457 somente no ano de 1969.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION — The Salmonella problem. *J. Amer. Med. Assoc.*, 142(14):1073, 1950. Editorial.
2. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION — Salmonella control. *J. Amer. Med. Assoc.*, 189(9):691, 1964. Editorial.
3. CLEMMER, D. I.; HICKEY, J. L. S.; BRIDGES, J. F.; SCHLISSMANN, D. J. & SHAFFER, M. F. — Bacteriologic studies of experimental air-born salmonellosis in chicks. *J. Infect. dis.*, 106(1):197-210, 1960.
4. DARLOW, H. M.; BALE, W. R. & CARTER, G. B. — Infection of mice by the respiratory route with *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg., Camb.*, 59:303-8, 1961.
5. EDWARDS, P. R. — Salmonellosis: observations on incidence and control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 70:598-613, 1958.
6. VAN OYE, E.; RICHARD, J.; MOINET, J. & VAN GOETHEM, H. — Role probable des poussières dans une épidémie hospitalière par enterobactéries (*Salmonella* et *Escherichia coli* pathogènes). *Presse Méd.*, 71:2241-3, 1963.

Recebido para publicação em 11 de agosto de 1971.

ALCOOIS SUPERIORES EM AGUARDENTE DE CANA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (1)

HIGHER ALCOHOLS IN SUGAR CANE POTABLE SPIRITS BY DIRECT GAS CHROMATOGRAPHY

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA (2)
HELOISA HELENA CORBE BARRETTO (2)

SUMMARY

Direct gas chromatography with flame ionization detector was applied for the determination of higher alcohols in sugar cane potable spirits.

All the 60 samples analysed contained n-propanol, isobutanol and isoamyl alcohol. Peak areas and responses relative to 2-pentanol as an internal standard were used to calculate concentrations of the individual alcohols.

The concentration of n-propanol, isobutanol and isoamyl alcohol varied from 7.00, 6.40 and 19.60 to 65.20, 36.60 and 98.50 mg/100 ml of the sample, respectively.

A large amount of n-propanol and n-butanol occurred in inferior quality spirits; in some of them 2-butanol and probably 2-methyl-2-butanol also occurred.

INTRODUÇÃO

O consumo de aguardente de cana é hábito amplamente difundido no país, principalmente entre a população de menor poder aquisitivo, visto ser a bebida de preço relativamente baixo.

Nos tempos coloniais, a aguardente era produzida nas fazendas, em pequenos engenhos; hoje em dia, entretanto, as destilarias se acham espalhadas por toda a parte, produzindo mais de mil litros de aguardente por hora.

As bebidas alcoólicas fermento-destiladas distinguem-se umas das outras pela presença de componentes secundários que formam um "bouquet" característico de cada tipo de bebida. Estes componentes secundários

se formam juntamente com álcool etílico durante o processo de fermentação do mosto, mudam de caráter e proporção durante a destilação e posterior maturação do produto. Assim, durante o processo de envelhecimento de bebidas fortemente alcoólicas, os aldeídos reagem com álcool etílico formando acetais, suavizando, dessa maneira, o odor pungente dos aldeídos.

Os compostos aromáticos responsáveis pelo flavor, isto é, pelo aroma e sabor das bebidas, são constituídos principalmente por álcoois, aldeídos, ácidos graxos e ésteres.

É prática normal entre os analistas de bebidas alcoólicas, e o mesmo consta de legislações específicas, avaliar somente grupo de componentes e não componentes individuais,

(1) Trabalho apresentado à 23.ª Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada em Curitiba, Paraná, de 4 a 10 de julho de 1971.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

devido à dificuldade de separação e ao tempo exigido para a execução de métodos clássicos.

Assim, os aldeídos são determinados em conjunto e expressos em aldeído acético; ácidos, em ácido acético; ésteres, em acetato de etila, e alcoois superiores, em isobutanol. Somente o furfural é comumente determinado individualmente.

Com o advento da técnica de cromatografia em fase gasosa, um novo e amplo campo surgiu na química analítica; entretanto, muitos anos decorreram desde a publicação dos trabalhos iniciais de MARTIN e JAMES¹ até o aparecimento dos primeiros trabalhos visando a determinação de componentes individuais constituintes de diferentes bebidas alcoólicas^{2, 4, 5, 6}.

MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de identificar e dosar os alcoois superiores, analisamos 60 amostras de aguardente de cana de marcas diferentes, provenientes de várias regiões do país, principalmente do Estado de São Paulo e do Estado do Rio de Janeiro.

A maioria das amostras foi adquirida no comércio e algumas colhidas nas próprias destilarias.

O aparelho usado para as análises foi um cromatógrafo a gás da marca Varian, modelo 2100, com detector de ionização de chama. Foi utilizada uma coluna de 15 pés de comprimento e 1/8 de polegada de diâmetro interno tendo como fase estacionária Halcomid M18, em Chromosorb W. As condições de operação foram as seguintes: temperatura da coluna, 100°C; temperatura do injetor, 130°C; temperatura do detector, 150°C; gás de arraste, nitrogênio; fluxo, 30 ml/min.; sensibilidade 4×10^{-10} .

Identificação dos componentes

5 μ l foram injetados diretamente no cromatógrafo e os alcoois foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de padrões

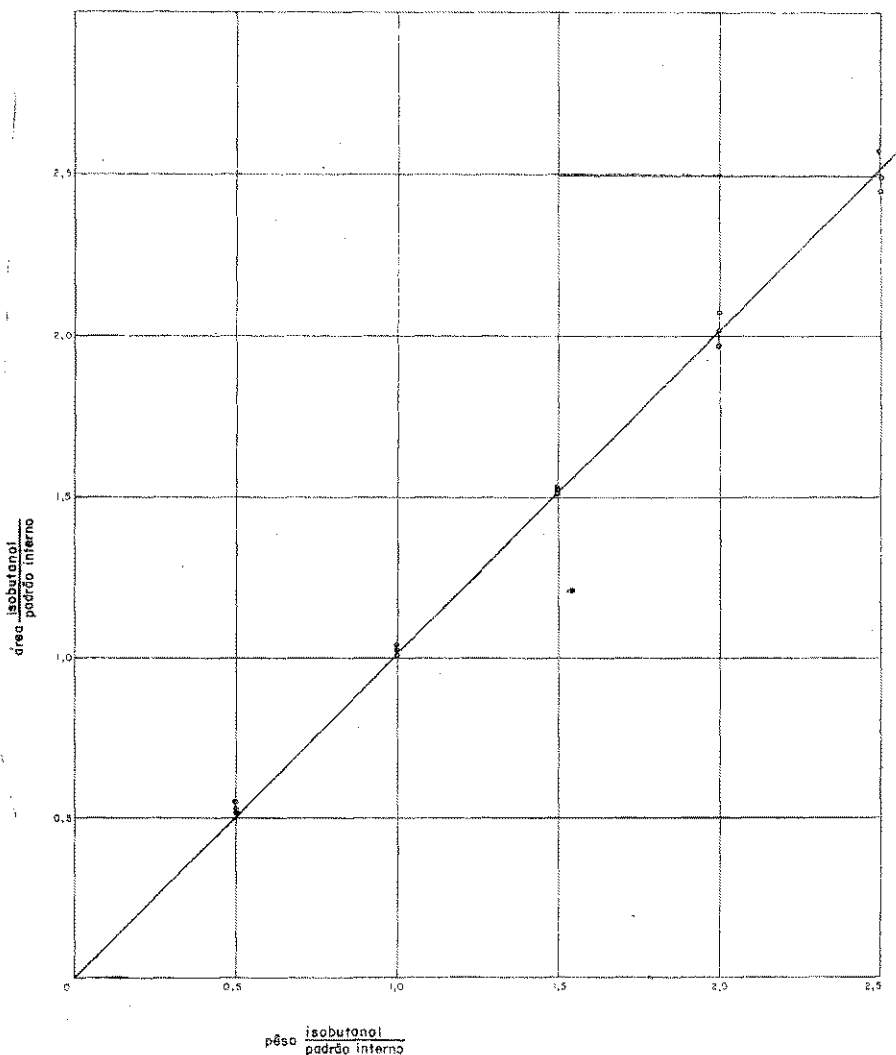
injetados e, ainda, pela adição às amostras de padrões do álcool suposto. A identificação dos alcoois também foi efetuada e confirmada pelo emprêgo de duas colunas diferentes: Carbowax 20M e F.F.A.P.

Dosagem dos componentes

Para a determinação quantitativa dos alcoois superiores o método empregado foi o da padronização interna². A escolha deste processo de calibração indireta foi baseada no fato de que os resultados obtidos não dependem da sensibilidade do detector, isto é, a resposta do detector pode variar sem alterar os resultados pois, na avaliação dos mesmos, trabalha-se com a relação da área do componente e do padrão interno e não com a área absoluta do pico do componente. Isto evita que se preparem curvas padrões diariamente ou constantemente, como é necessário quando se trabalha com o processo de calibração absoluta. Outra vantagem do emprêgo do método de padronização interna é que a quantidade da amostra injetada não precisa ser exatamente medida ou conhecida e, ainda, o método pode ser aplicado dentro de limites grandes de concentração. A dificuldade maior do processo consiste na escolha do padrão interno, que não deve interferir com qualquer componente da amostra; o padrão deve, no cromatograma, ficar separado dos outros picos, mas emergir próximo dos picos de interesse e, ainda, ter similaridade estrutural com os componentes que se deseja calcular.

SINGER⁷ usou n-pentanol como padrão interno na determinação de alcoois de C₃ a C₅ em whiskies e conhaques; entretanto, não achamos conveniente o emprêgo deste padrão porque ele emerge depois do álcool isoamílico, com um tempo de retenção muito grande e sob a forma de um pico de base larga, característico de substâncias com tempo de retenção elevado.

MARTIN³ na determinação de alcoois superiores em óleo de "fusel" e whiskies usou n-butanol como padrão interno; entretanto, várias amostras por nós analisadas continham n-butanol, o que impossibilitou o emprêgo desse padrão.



I. A. L. - 5 Dez. - 1971 - YARA L. 2004-1971

Fig. 1 — Curva de calibração para Isobutanol.

Selecionamos, finalmente, 2-pentanol como padrão interno, por apresentar as condições ideais. Tanto o padrão interno como os álcoois usados no preparo da curva padrão foram fornecidos por "PolyScience Corporation-Analytical Standards".

Para o emprêgo do processo por meio de um padrão interno, deve-se previamente construir uma curva com soluções de concentrações conhecidas dos componentes, contendo sempre uma quantidade constante do padrão interno. No preparo da mistura dos componentes deve-se levar em consideração que

suas concentrações precisam abranger toda a faixa de concentração do componente que se espera encontrar nas amostras a serem analisadas.

Preparadas as misturas, elas são cromatografadas e as áreas dos picos são calculadas. Constroi-se um gráfico colocando-se a relação entre os pesos do componente e do padrão interno contra a relação entre a área do pico do componente e a área do padrão.

Na prática, operamos da seguinte maneira; Foram preparadas misturas de diferentes

concentrações dos componentes n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico usando como solvente álcool etílico a 43 por cento, em água, v/v. A escolha do álcool a 43% para o preparo das soluções foi baseada na determinação do grau alcoólico de aguardentes de cana, efetuada em análises de rotina no Instituto Adolfo Lutz, que demonstrou ser 43 o grau alcoólico encontrado com maior frequência. Trabalhando sempre com êsse teor alcoólico, procuramos reproduzir as mesmas condições de álcool etílico e água das aguardentes, evitando variações nas respostas do detector.

Para o preparo da curva de calibração, a concentração das soluções padrões foi de 0,1% p/v, para n-propanol e isobutanol e de 0,2% p/v, para álcool isoamílico. A partir destas soluções foram feitas diluições adequadas para o preparo das curvas. A concentração da solução do padrão interno, 2-pentanol, foi de 0,4% p/v, e a quantidade adicionada às soluções dos componentes foi calculada de maneira que 5 μ l da solução contivessem, sempre, 1 μ g de 2-pentanol.

A figura 1 mostra a curva de calibração para isobutanol.

Determinação dos álcoois superiores

A 10 ml da amostra foi adicionado 0,1 ml de uma solução de 2-pentanol a 2% p/v; 5 μ l desta solução, contendo 1 μ g do padrão interno, foram injetados no cromatógrafo. As áreas obtidas foram medidas e calculada sua relação com a área do padrão interno; por meio das curvas de calibração foi lida a relação entre o peso do componente desconhecido e o peso do padrão. Como a quantidade do padrão adicionado é conhecida, por simples cálculo determinou-se a quantidade do componente presente na amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em tôdas as amostras analisadas foram encontrados os álcoois n-propanol, isobutanol e isoamílico.

Os valores encontrados para n-propanol, reunidos no Quadro I, variaram de um mí-

QUADRO I

n-Propanol: Distribuição de frequência (fi) dos valores encontrados em aguardentes de cana. (Brasil — 1971)

| n-Propanol mg/100 ml | | |
|----------------------|--|----|
| Intervalo | | fi |
| 0 --- 10,00 | | 3 |
| 10,00 --- 20,00 | | 17 |
| 20,00 --- 30,00 | | 17 |
| 30,00 --- 40,00 | | 10 |
| 40,00 --- 50,00 | | 4 |
| 50,00 --- 60,00 | | 2 |
| 60,00 --- 70,00 | | 7 |
| | | 60 |

nimo de 7,00 a um máximo de 65,20 mg por 100 ml da amostra, sendo a média aritmética (\bar{x}) igual a 29,83, o desvio padrão (s), 16,83 e a mediana, 24,00 mg/100 ml (fig. 2).

O aspecto irregular da curva construída com os valores obtidos para n-propanol, um desvio padrão grande e a mediana situada longe da média aritmética evidenciam uma grande variabilidade da quantidade de n-propanol encontrado nas amostras.

Na realidade, as amostras classificadas por seus caracteres organoléuticos como aguardentes de qualidade inferior apresentaram sempre um teor muito elevado de n-propanol. Isto explica a existência de dois agrupamentos de valores na distribuição, correspondendo a uma curva bimodal (fig. 2); o primeiro, devido a aguardentes de melhor qualidade, contendo um teor menor de n-propanol e o segundo, devido a um grupo de amostras de qualidade inferior.

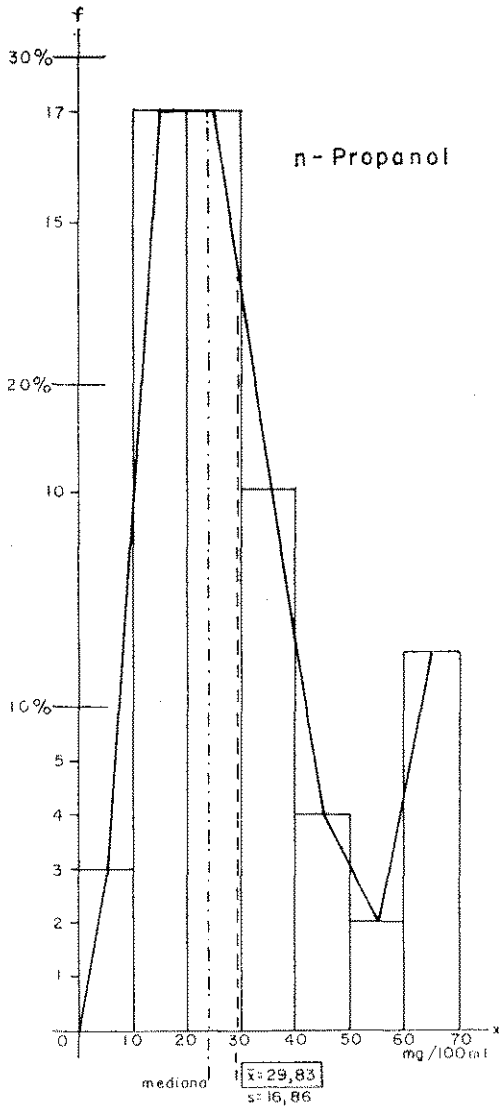


Fig. 2 — Gráfico do teor de n-Propanol em 60 amostras de aguardente de cana

Os valores encontrados para isobutanol, reunidos no quadro II, variaram de um mínimo de 6,40 a um máximo de 36,60 mg por 100 ml da amostra, sendo a média aritmética (\bar{x}) igual a 19,25, o desvio padrão (s), 6,69 e a mediana 19,00 mg/100 ml (fig. 3).

O aspecto da curva (fig. 3) construída com os valores obtidos para isobutanol e a média aritmética que praticamente se confunde com a mediana indicam uma distribuição normal do conteúdo de isobutanol encontrado nas amostras analisadas.

QUADRO II

Isobutanol: Distribuição de frequência (fi) dos valores encontrados em aguardentes de cana. (Brasil — 1971)

| Isobutanol mg/100 ml | | fi |
|----------------------|-------|----|
| Intervalo | | |
| 0 | 5,00 | 0 |
| 5,00 | 10,00 | 4 |
| 10,00 | 15,00 | 9 |
| 15,00 | 20,00 | 26 |
| 20,00 | 25,00 | 11 |
| 25,00 | 30,00 | 5 |
| 30,00 | 35,00 | 3 |
| 35,00 | 40,00 | 2 |
| | | 60 |

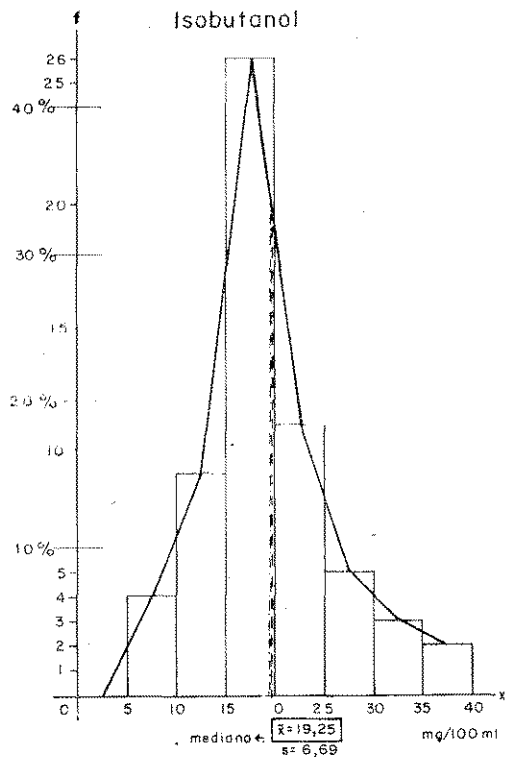


Fig. 3 Gráfico do teor de Isobutanol em 60 amostras de aguardente de cana.

Quanto ao álcool isoamílico, os valores encontrados, reunidos no quadro III, variaram de um mínimo de 19,60 a um máximo de 98,50 mg por 100 ml da amostra, sendo a média aritmética (\bar{x}) igual a 57,33, o desvio padrão (s), 17,83 e a mediana 56,00 mg/100 ml (fig. 4).

QUADRO III

Alcool Isoamílico: *Distribuição de freqüência (fi) dos valores encontrados em aguardentes de cana. (Brasil — 1971)*

| Alcool Isoamílico mg/100 ml | | fi |
|-----------------------------|--------|----|
| Intervalo | | |
| 0 | 10,00 | 0 |
| 10,00 | 20,00 | 1 |
| 20,00 | 30,00 | 2 |
| 30,00 | 40,00 | 4 |
| 40,00 | 50,00 | 13 |
| 50,00 | 60,00 | 17 |
| 60,00 | 70,00 | 11 |
| 70,00 | 80,00 | 5 |
| 80,00 | 90,00 | 4 |
| 90,00 | 100,00 | 3 |
| | | 60 |

O aspecto das curvas de freqüência dos valores de isobutanol e de álcool amílico mostra uma distribuição aproximadamente normal destes dois componentes; o teor destes álcoois, portanto, parece não interferir na qualidade das aguardentes.

Nas amostras de aguardentes de cana consideradas de boa qualidade por seus caracteres organoléticos, foram encontrados somente os álcoois superiores n-propanol, isobu-

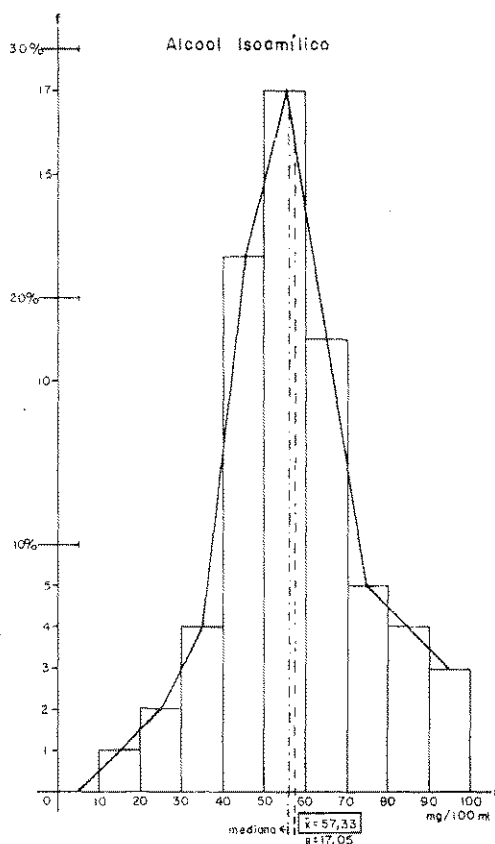


Fig. 4 — Gráfico do teor de álcool Isoamílico em 60 amostras de aguardente de cana.

tanol e isoamílico (fig. 5). Todas as amostras consideradas de qualidade inferior apresentaram um teor elevado de n-propanol e em muitas foi constatada a presença de n-butanol. No cromatograma de algumas amostras emergiram mais 2 picos sendo um deles identificado como 2-butanol e o outro, pelo seu tempo de retenção, parece corresponder a 2-metil-2-butanol; entretanto, sua confirmação depende de experiências complementares (Fig. 6).

Foi constatada, também, no cromatograma de todas as aguardentes analisadas, a presença de outros dois picos; o primeiro deles, pequeno, emergindo no cromatograma logo após o álcool etílico e o segundo, de tamanho variável, emergindo depois do álcool isoamílico. Estes componentes não foram identificados por não possuímos padrões correspondentes; entretanto, podemos afirmar não se tratar de álcool de C₃ a C₅ ou de l-hexanol.

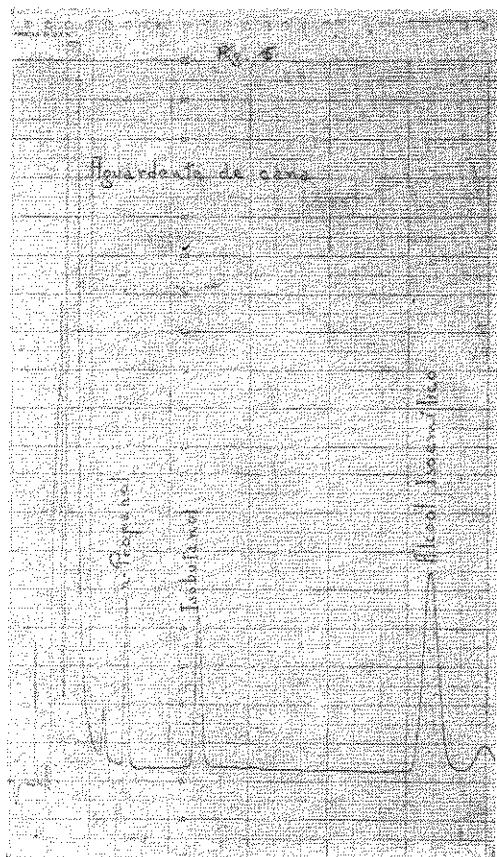


Fig. 5 — Cromatograma de uma aguardente de cana classificada de boa qualidade por seus caracteres organoléticos.

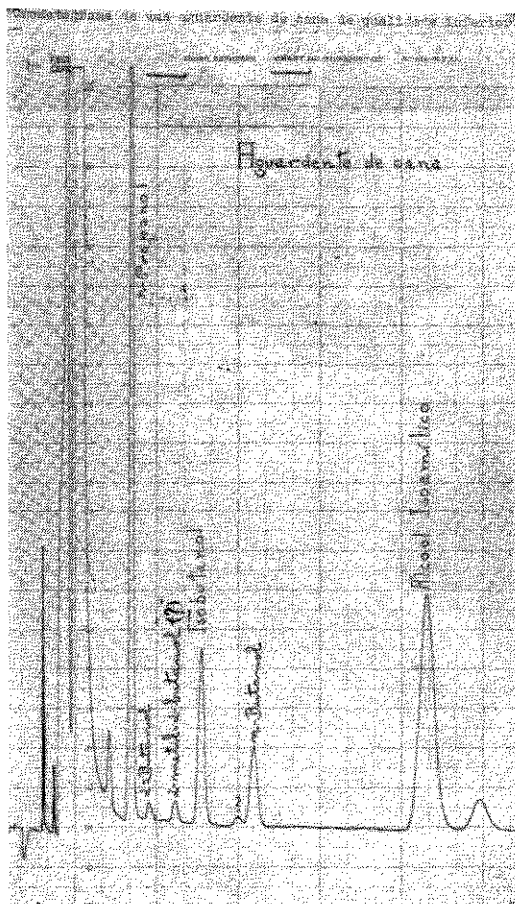


Fig. 6 — Cromatograma de uma aguardente de cana de qualidade inferior.

Não foram encontrados na literatura ao nosso alcance, dados referentes à dosagem isolada dos álcoois superiores em aguardentes de cana, porém, comparando os nossos dados, com os obtidos em análises de várias amostras de whisky escocês, por nós realizadas, constatamos nestes também, a presença dos mesmos álcoois superiores encontrados nas aguardentes de cana consideradas de boa qualidade e em teor dentro dos mesmos limites (fig. 7).

CONCLUSÃO

A determinação qualitativa e quantitativa dos álcoois superiores permitiu verificar que as aguardentes de cana consideradas de boa qualidade apresentam somente os álcoois n-propanol, isobutanol e isoamílico. As

amostras de qualidade inferior apresentaram sempre um teor elevado de n-propanol; em muitas foi constatada a presença de n-butanol e, em algumas, foi identificado 2-butanol e, provavelmente, 2-metil-2-butanol.

Os resultados obtidos indicam que grande parte de nossa aguardente de cana não tem um padrão de qualidade definido quanto ao conteúdo de álcoois superiores. O fato de ser produto largamente consumido e a obtenção de lucros fáceis por parte de alguns industriais fazem com que os produtores não se interessem em introduzir uma tecnologia adequada de fermentação e de destilação e posterior envelhecimento do produto. Uma tecnologia adequada levaria à obtenção de um produto com características organoléticas agradáveis e demais características químicas definidas, com capacidade

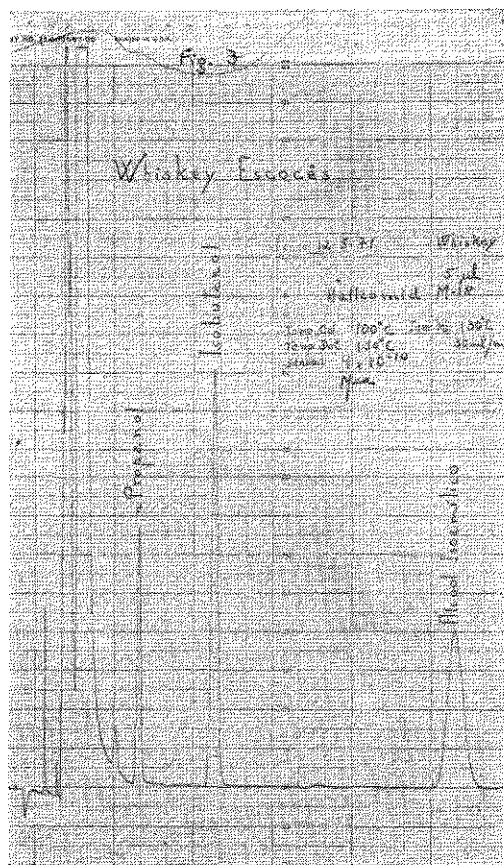


Fig. 7 — Cromatograma de whisky escocês.

de competir com outras bebidas fermento-destiladas e possibilidades de se transformar, ainda, em produto de exportação.

RESUMO

A cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama foi aplicada para a pesquisa e dosagem de álcoois superiores em aguardentes de cana.

Em 60 amostras analisadas, provenientes de diferentes regiões do país, foram sempre identificados os álcoois n-propanol, isobuta-

nol e isoamílico; os teores variaram de um mínimo de 7,00, 6,40 e 19,60 a um máximo de 65,20, 36,60 e 98,50 mg/100 ml da amostra, respectivamente. Para a dosagem foi usado 2-pentanol como padrão interno. As aguardentes classificadas, por seus caracteres organoléticos como de boa qualidade, apresentaram somente os 3 álcoois superiores acima referidos. As amostras de qualidade inferior apresentaram um teor elevado de n-propanol; em muitas foi identificado n-butanol e em algumas foi verificada a presença de 2-butanol e provavelmente, de 2-metil-2-butanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JAMES, A. T. & MARTIN, A. J. P. — Gas liquid partition chromatography — a technique for the analysis of volatile materials. *Analyst*, Lond., 77:915-32, 1952.
2. McNAIR, H. M. & BONELLI, E. J. — Basic gas chromatography. 5ed. Consolid. Printers, California, 1969. p. 150-1.
3. MARTIN, G. E.; CAGGIANO, G. & SCHLESINGER, H. C. — Fusel oil determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, 46:294-7, 1963.
4. MARTIN, G. E.; SCHOENEMAN, R. L. & SCHLESINGER, H. I. — Determination of esters in whisky by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, 47:712-3, 1964.
5. MAUREL, A.; SANSOULET, O. & GIFFARD, Y. — Etude chimique et examen chromatographique en phase gazeuse des rhums. *Annls. Falsif. Expert. Chim.*, 58:291-301, 1965.
6. SINGER, D. D. & STILES, J. W. — The determination of higher alcohols in potable spirits: comparison of colorimetric and gas-chromatographic methods. *Analyst*, Lond., 90:290-6, 1965.
7. SINGER, D. D. — The analysis and composition of potable spirits: determination of C₄, C₅ and C₆ alcohols in whisky and brandy by direct gas chromatography. *Analyst*, Lond., 91:127-34, 1966.

Recebido para publicação em 6 de setembro de 1971.

DIVULGAÇÃO DE METODOS

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ apresenta, neste número, normas e métodos adotados num de seus Serviços — Serviço de Química Aplicada da Divisão de Bromatologia e Química — e sob sua inteira responsabilidade.

Este Serviço espera contribuir para a divulgação de tais métodos, atendendo ao mesmo tempo, às muitas solicitações que lhe são feitas e contornar alguns problemas que surgem da necessidade da atualização em certas áreas especializadas, em constante desenvolvimento.

A técnica apresentada é a da *Pesquisa e Determinação de Pesticidas Clorados em Alimentos*.

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EM ALIMENTOS *

DEFINIÇÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A presença de quantidades mínimas de substâncias tóxicas e persistentes em alimentos, provindas do uso dos pesticidas ou defensivos agropecuários (ou da contaminação de solos, águas, plantas e animais, pelos mesmos), trouxe nova preocupação à Bromatologia.

Resíduo de pesticida em alimentos

Entende-se por resíduo de pesticida qualquer substância remanescente das usadas no controle de pragas e doenças, na produção, transporte, armazenamento, mercado e elaboração de alimentos; estão incluídas as substâncias relacionadas àquelas por processos de degradação ou metabolismo. Não se incluem os antibióticos, fertilizantes e reguladores de crescimento. As quantidades são expressas em partes por peso de substância por milhão de partes de alimento (ppm).

Resíduo não intencional

Quando o resíduo provém de circunstâncias não ligadas ao emprego de pesticidas na produção e proteção de alimentos, é um resíduo não intencional.

Dose diária aceitável

É a quantidade expressa em mg de substância por kg de peso corpóreo, que, usada durante toda a vida de um indivíduo, não apresentaria risco apreciável à sua saúde — em face dos fatos conhecidos e estudados até o momento.

Limites para os resíduos de pesticidas

Baseados nos conhecimentos da ação toxicológica dos diferentes pesticidas e na dose diária aceitável, foram estabelecidos limites para os resíduos de pesticidas em alimentos:

Tolerância — É o máximo de concentração do resíduo de pesticida permitida no alimento, num estágio específico de sua produção, armazenamento, transporte, mercado e preparação até o consumo. A concentração é expressa em partes por peso de resíduo de pesticida por um milhão de partes em peso do alimento (p.p.m.).

Limite prático — É considerado um limite prático de resíduo de pesticidas no alimento o máximo de resíduo não intencional que ele pode apresentar.

Lembrando que esses estudos são feitos com animais e/ou homens em experiências onde não se tem todas as variáveis de influência no efeito toxicológico, eles podem sofrer revisão e, muitas vezes são *temporários*, até um resultado de experiências a maior prazo.

A determinação de resíduos de pesticidas em alimentos constitui, pois, um tipo particular de análise em que há diversificação muito grande nos dois aspectos — o de alimentos e o de pesticidas. Por outro lado, trata-se de analisar quantidades muito pequenas de uma substância (10^{-9} g) contidas em produtos que são por si próprios misturas complexas.

O desenvolvimento da cromatografia em fase gasosa, resolveu parte do problema pois tornou possível a determinação de quantidades de substâncias na ordem de nanogramas. Ela é, entretanto, a fase final de todo um processo analítico que se inicia na amostragem e tem seu ponto crítico na extração dos resíduos, variando esta, não só em função da amostra, como do tipo de resíduo em questão.

Amostra

Deverá ser válida, representativa e suficiente.

* Elaborado por Walkyria H. Lara, Chefe da Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz.

A amostragem tem grande significado. Conhecendo-se o histórico da mesma, pode-se escolher o método a ser empregado; não se conhecendo nada sobre a mesma, tem-se que escolher entre diferentes possibilidades e não se tem um método geral aplicável a todos os casos.

Amostra subjetiva — Considera-se amostra subjetiva a que é ligada a um conhecimento prévio, isto é, tomada sabendo-se qual o pesticida a ser determinado como resíduo.

Amostra objetiva — É a que é tomada ao acaso, sem nenhuma indicação de qual seja o resíduo de pesticida.

Classificação dos pesticidas

Numa classificação química podemos separar os compostos usados como pesticidas em duas grandes classes:

Natureza inorgânica — como os compostos de arsênico: arsenitos de Cu, Na, Ca; arseniados de Ca, Pb, Cu; compostos de cobre: sulfato, oxiclurato; compostos de enxofre: poli-sulfato de Ba, Ca; etc.

Natureza orgânica — como os derivados de petróleo: óleo mineral; compostos naturais: Piretro, Rotenona, Nicotina; carbidretos clorados: DDT, BHC, Aldrin, Heptacloro, Clordana; ésteres fosforados: Paration, Malation Diazinon, TEPP, Fosdrin, Ronel; carbamatos: Ziran, Maneb, Carbaril, Baygon; produtos vários: triazinas, nitrofenóis, derivados de clorofenoxiacético, etc.

É fácil compreender a diversificação de métodos necessários para a análise desses compostos todos. Há, entretanto, aspectos comuns nos vários métodos, principalmente nos empregados para os compostos orgânicos.

Estes aspectos se referem à extração do princípio ativo, purificação do extrato, concentração do extrato, determinação do princípio ativo:

Extração do princípio ativo — É feita com solventes, de acordo com a amostra e com o princípio a ser extraído; a extração pode ser:

- A frio, direta, por imersão.
- Com desidratantes (Na_2SO_4).
- Maceração com um ou mais solventes.
- Com extratores tipo Soxhlet.
- Codestilação.

A grande dificuldade na extração é a formação de emulsões o que torna a recuperação muito baixa. A maioria dos métodos diminui esse efeito utilizando Na_2SO_4 anidro ou processos de codestilação, geralmente álcool isopropílico.

Purificação do extrato — Como sempre é extraído material estranho ao princípio ativo (corantes vegetais, proteínas) é necessária a purificação do extrato, a qual pode ser feita por:

- Partição entre solventes — para gordura e corantes.
- Cromatografia de coluna — com Florisil, alumina, Celite, celulose, carvão ativo.
- Tratamento químico.
- Codestilação.

Concentração do extrato — Pode ser feita por evaporação do solvente em:

- Banho de vapor de água com ou sem arraste de gás.
- Pressão reduzida e rotação.
- Com concentradores tipo Kuderna-Danish.

Determinação do(s) princípio(s) ativo(s) — São usadas técnicas de:

Espectrofotometria — Ultra-violeta, Visível e Infra-vermelho.

Cromatografia — Em papel, camada delgada, gás.

Método múltiplo — Um método é assim chamado quando pode levar à determinação de toda uma série de resíduos de pesticidas.

Método confirmatório — Sempre é necessário confirmar os resultados obtidos por intermédio de outro método, chamado então *confirmatório*. Assim, quando se usar cromatografia em fase gasosa, podem-se confirmar os resultados por cromatografia em camada delgada, espectrometria de massa, ou infra-vermelho.

O método usado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz está baseado no método descrito no "Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.", 11 ed. 1970, e em outros descritos no "Guide to the Analysis of Pesticide Residues" do U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, 1965.

MÉTODO GERAL PARA PESTICIDAS ORGANOCORADOS

Princípio

A amostra é extraída com solvente. Aliquota dos extratos é diluída e os resíduos de pesticidas são extraídos com éter de petróleo. Segue-se uma purificação dos extratos por cromatografia em coluna de Florisil e eluição com misturas de éter etílico e éter de petróleo. Após concentração, os eluatos são usados para a determinação e identificação dos resíduos, por cromatografia em fase gasosa.

Material

- a) Homogeneizador de alta velocidade ou equivalente (liquidificador).
- b) Colunas cromatográficas de vidro com torneira de Teflon e placa porosa, de 22 mm de diâmetro interno por 300 mm de altura.
- c) Concentrador Kuderna-Danish, de 500 ml, com receptores de tubos graduados de 5 ml.
- d) Coluna Snyder ou coluna de Vigreux.
- e) Funis de separação de 1.000 e 125 ml, com torneira de Teflon.
- f) Cromatógrafo com detector de captura de elétrons (fonte de trítium ou níquel) provido com coluna de vidro com 10% de DC-200 em Cromosorb WHP, ou 2,5% de QF-1 e 2,5% de DC-200, em Varaport 30, 80-100 mesh.

As colunas devem ser condicionadas a 250-260°C, durante 48 horas, com fluxo de nitrogênio de cerca de 100 ml/min.

Reagentes

Todos os solventes devem ser purificados e a destilação final feita em aparelho todo de vidro. Devem também ser testados da seguinte maneira:

Evaporar 300 ml de reagente em um concentrador tipo Kuderna-Danish com coluna de Vigreux até 5 ml; destes, injetar 5 microlitros no cromatógrafo nas condições de análise. Não deve aparecer nenhuma defle-

xão maior que 1 mm, na linha de base, de 2 a 60 minutos após a injeção.

a) Acetonitrila

Acetonitrila técnica pode ser purificada: adicionar a 4 l de acetonitrila 1 ml de H_3PO_4 mais 30 g de P_2O_5 e destilar entre 81-82°C.

b) Acetonitrila saturada com éter de petróleo.

Saturar Acetonitrila (item a) com éter de petróleo redestilado.

c) Álcool etílico — p.a.

d) Éter de petróleo — redestilado entre 30-60°C.

e) Éter etílico — redestilado a 34-35°C. Livre de peróxidos. Adicionar álcool até 2%.

f) Florisil — 60/100 mesh ativado a 650°C.

Aquecer por 5 horas a 130°C antes de usar. Conservar em dessecador à temperatura ambiente. Reaquecer a 130°C cada dois dias.

Preparar soluções de padrões de 1 a 4 $\mu g/ml$ em hexana. Testar cada lote de Florisil ativado, colocando 1 ml da mistura de padrões numa coluna preparada e eluir como indicado em: Purificação (clean up) — p. 131. Concentrar os eluatos e determinar por cromatografia em fase gasosa, a recuperação conseguida.

g) Sulfato de sódio — anidro, granulado.

Preparação da amostra e Extração

1. Frutas e legumes

a) Frutas firmes, raízes e legumes de folhas — Picar e bater no liquidificador uma amostra representativa, homogeneizar e proceder como em b.

b) Frutas moles — Se necessário retirar o caroço e picar uma amostra representativa. Pesar 100 g da amostra picada e colocar no liquidificador.

Adicionar 200 ml de acetonitrila e cerca de 10 g de Celite. Bater 2 minutos a alta velocidade. Filtrar por sucção através de um funil de Buchner. Transferir o filtrado para um cilindro graduado e anotar o volume obtido. Transferir o volume medido para um funil de separação de 1000 ml.

- c) Frutas e outros produtos contendo 5 a 15% de açúcar — Adicionar 200 ml de acetonitrila e 50 ml de água a 100 g da amostra, no liquidificador, e bater durante 2 minutos a alta velocidade. Continuar como em *b*, obtendo um volume de cerca de 250 ml (medir exatamente antes de transferir para o funil de 1000 ml).
- d) Frutas e outros produtos contendo 15 a 30% de açúcares (por ex.: uvas) — Aquecer a 50°C a mistura de 200 ml de acetonitrila e 50 ml de água. Adicionar a 100 g da amostra no liquidificador, e proceder como em *b*. Antes de os extratos esfriarem, transferir o volume medido para um funil de separação de 1000 ml. Deixar esfriar a temperatura ambiente.

Extrair com 100 ml de éter de petróleo adicionados ao funil de separação contendo o volume dos extratos (A). Agitar 2 minutos vigorosamente. Adicionar 10 ml de solução saturada de cloreto de sódio e 600 ml de água. Manter o funil em posição horizontal e agitar 30-45 segundos. Deixar separar as camadas. Desprezar a camada aquosa. Lavar com duas porções de 100 ml de água a camada de solvente. Transferir a camada de solvente para um cilindro graduado e medir o volume (B). Adicionar 15 g de sulfato de sódio anidro e agitar vigorosamente. (Não deixar o extrato ficar mais de uma hora em contacto com sulfato de sódio, pois ocasionará perdas por absorção). Concentrar a 5 ml no concentrador Kuderna-Danish. Transferir para a coluna de Florisil ("Clean up").

Nota: Levantar em conta a contração do volume, no caso de amostras com 85% de água, usando a fórmula:

$$P \frac{A}{T} \times \frac{B}{100} = n.^{\circ} \text{ de gramas da amostra no eluato}$$

P = n.º de gramas da amostra

A = ml do filtrado

T = total (volume de água na amostra mais ml de acetonitrila adicionado)

B = ml de extrato em éter de petróleo em que os resíduos foram particionados.

Quando 50 ml de água são adicionados à acetonitrila para extração de produtos com açúcar, o volume T é acrescido de 45.

2. Alimentos contendo gordura

- a) Óleos e Gorduras — Quando sólidos aquecer até liquefazer e filtrar através de filtro seco.
- b) Manteiga — Aquecer a 50°C até separar a gordura e decantar através de filtro seco.
- c) Leite — Adicionar a 100 ml de leite (leite evaporado deve ser diluído 1+1 com água) em um frasco de centrifuga de 500 ml, 100 ml de álcool metílico e 1 g de oxalato de sódio. Adicionar 50 ml de éter e agitar vigorosamente 1 minuto. Adicionar 50 ml de éter de petróleo e agitar 1 minuto. Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 15 minutos. Retirar a camada de solventes e colocar em um funil de separação de 1000 ml contendo 500-600 ml de água e 30 ml de solução saturada de cloreto de sódio. Re-extrair a camada aquosa do frasco de centrifuga duas vezes, com porções de 50 ml de éter etílico e éter de petróleo (1 + 1), centrifugando e retirando a camada de solventes para o funil de separação após cada extração.

Adicionar água ao funil. Desprezar a camada aquosa. Lavar a camada de solventes com duas porções de 200 ml de água, desprezando a camada aquosa. (Se houver formação de emulsão, adicionar cerca de 5 ml de solução saturada de cloreto de sódio à camada de solventes).

Passar a solução dos solventes através de uma coluna de 25x50 mm de sulfato de sódio anidro e coletar o eluato em um bequer de 400 ml. Lavar a coluna com pequenas porções

de éter de petróleo. Reunir ao bequer de 400 ml. Evaporar em banho-maria sob uma corrente de Nitrogênio, afim de obter a gordura.

d) Queijo — Colocar 25 a 100 g (o correspondente a 3 g de gordura) da amostra picada em um liquidificador. Adicionar 2 g de oxalato de sódio, 100 ml de álcool metílico e bater 2 a 3 minutos. Transferir para um frasco de centrifuga de 500 ml. Adicionar 50 ml de éter, agitar um minuto. Adicionar 50 ml de éter de petróleo e agitar mais um minuto. Continuar como em c a partir de "centrifugar a 1.500 r.p.m."

e) Conservas de carne — Homogeneizar a amostra, retirando toda a gordura aderente ao recipiente. Pesar 120 g de amostra em bequer de 600 ml. Adicionar 20 g de sulfato de sódio anidro granulado, misturando até homogeneizar. Adicionar 100 ml de éter de petróleo. Agitar. Aquecer ligeiramente a 50°C. Transferir a camada etérea para outro bequer e repetir a extração com 2 porções de 100 ml de éter de petróleo. Evaporar os extratos obtidos a 50°C em corrente de Nitrogênio, até que todo o éter evapore. Deixar à temperatura ambiente a gordura obtida.

Partição com Acetonitrila — Transferir 3 g de gordura para um funil de separação de 125 ml com o auxílio de éter de petróleo (o volume total não deve exceder 15 ml). Adicionar 25 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo. Agitar vigorosamente um minuto. Deixar as camadas se separarem. Transferir a camada de acetonitrila para um funil de separação de 1000 ml contendo 650 ml de água, 40 ml de solução saturada de sulfato de sódio, e 100 ml de éter de petróleo. Extrair a solução em éter de petróleo, no funil de 125 ml com três porções de 30 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo, agitando vigorosamente um minuto, em cada vez. Reunir todos os extratos ao funil de separação de 1000 ml. Manter o funil de 1000 ml em posição horizontal e agitar por 30-45 segundos. Deixar as camadas se separarem e transferir a camada aquosa para um segundo funil de separação de 1000 ml. Adicionar 100 ml

de éter de petróleo ao segundo funil e agitar vigorosamente 15 segundos. Deixar as camadas se separarem. Desprezar a camada aquosa e transferir a camada de éter de petróleo ao primeiro funil. Lavar com duas porções de 100 ml de água. Desprezar as camadas aquosas. Transferir a camada de éter de petróleo através de uma coluna de sulfato de sódio anidro de 25x50 mm, para o concentrador Kuderna Danish. Lavar o funil e depois a coluna com três porções de 10 ml de éter de petróleo. Reunir ao éter de petróleo no concentrador. Evaporar a cerca de 5 ml.

Purificação (Clean-up) em coluna de Florisil

Preparar uma coluna de 22 mm de diâmetro interno com Florisil ativado, de modo a ter cerca de 10 cm de altura após sedimentar. Colocar cerca de 1 cm de sulfato de sódio granulado sobre o Florisil. Umedecer a coluna com 40-50 ml de éter de petróleo. Transferir os extratos de éter de petróleo (ou o concentrado obtido na partição com acetonitrila) para a coluna, deixando passar à razão de 5 ml por minuto. Eluir com 200 ml de uma solução a 6% de éter etílico em éter de petróleo, na mesma razão de 5 ml por minuto, recolhendo em frasco receptor. Trocar o receptor e eluir com 200 ml de solução a 15% de éter etílico em éter de petróleo.

Concentrar cada um dos eluatos em concentrador Kuderna-Danish até 5 ml.

O primeiro eluato, de 6%, contém os pesticidas clorados: Aldrin, BHC, DDE, o, p' e p.p', DDT, Eptacloro, Eptacloroepóxido, Lindana e Metoxicloro. Geralmente está pronto para cromatografia em fase gasosa mas, se for necessário, poderá ser repetida a purificação usando nova coluna de Florisil. O segundo eluato, de 15%, conterá Dieldrin e Endrin. Se for necessário, deverá ser purificado em coluna de magnésio ou saponificação..

Técnicas de concentração — Usar banho de vapor para aquecimento. Após atingir cerca de 5 ml remover o tubo calibrado do concentrador e evaporar sob corrente de nitrogênio. Nunca evaporar os extratos purificados até a secagem.

Deteção e Identificação

Injetar uma alíquota conveniente (3 a 5 microlitros) do eluato concentrado, no cromatógrafo, nas condições otimizadas previamente, para se ter a separação dos picos correspondentes aos pesticidas. Identificar os picos obtidos por comparação dos tempos de retenção com os dos padrões. Para medida de área, cromatografar o padrão (ou padrões) imediatamente após cada amostra e procurar ter os picos do padrão e da amostra o mais possível de tamanhos iguais.

As condições de operação, quando se usa uma coluna 2,5% de DC-200 e 2,5% QF-1 são: temperatura do injetor — 200°C; temperatura da coluna — 190°C; temperatura do detector — 200°C, fluxo de nitrogênio — 30 ml por minuto.

A identificação deve ser confirmada, usando outro tipo de coluna e comparados os tempos de retenção obtidos nessa outra coluna para os padrões e a amostra.

Relacionamos abaixo, publicações ligadas ao assunto e periódicos onde constantemente são publicadas modificações e novos métodos para determinação de resíduos de pesticidas.

Publicações de interesse geral

BARRY, H. C.; HUNDLEY, J. G. & JOHNSON, L. Y. — Pesticide analytical manual. Washington, 1969. v. 1 e 2. U. S. Dept. of Health, Education and Welfare.

BURCHFIELD, H. P. — Guide to the analysis of pesticide residues; 2nd. ed. Washington, Govt. Print Off., 1965.

CHICHESTER, C. O. — Research in pesticides. New York, Academic Press, 1965.

FREAR, D. E. H. — Pesticide index. 4th ed. Pennsylvania, College Science Publishers, 1969.

METCALF, R. L. — Advances in pest control research. New York, Interscience Publishers, 1957-68.

O'BRIEN, R. D. — Inseticides. Action and metabolism. New York, Academic Press, 1967.

SPENCER, E. Y. — Guide to the chemical use in crop protection. 5th ed. Canadá Dept. Agriculture, 1968. [Public. 1093]

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION — Evaluations of some pesticide residues in food. Genève, WHO, 1968. [FAO/PL 1968/M/9/: WHO/FOOD/ADD/ 69.36]

ZWEIG, G., ed. — Analytical methods for pesticides, plant growth regulators and food additives. New York, Academic Press, 1963-67. v. 1-4.

Periódicos

Analytical Chemistry

Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique

Annali dell' Istituto Superiore di Sanità

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Chromatography

Food and Cosmetics Toxicology

Food Technology

International Pest Control

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Journal of Chromatography

Journal of Chromatography Sciences

Journal of the Association of Official Analytical Chemists

Journal of the Science of Food and Agriculture

Pesticides Monitoring Journal

Residue Reviews

The Analyst

World Reviews of Pest Control.

Recebido para publicação em 5 de agosto de 1971.