

Implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos

Implications of the Maillard reaction in food and in biological systems

Carlos Simões Nunes¹ e António Oliveira Baptista²

¹ 13 Rue du Général Pershing, 78000 Versailles, França

² Faculdade de Medicina Veterinária, Rua Professor Cid dos Santos, 1300-477 Lisboa, Portugal

Resumo: As interacções amino-carbonilo de natureza não enzimática, designadas por reacção de Maillard, provocam modificações complexas nos alimentos e nos sistemas biológicos. A reacção tem implicações na química dos alimentos (qualidades organolépticas), na sua inocuidade (formação de mutagénios), na nutrição (biodisponibilidade de aminoácidos), ou ainda na química das proteínas *in vivo* (envelhecimento e *diabetes mellitus*). As reacções amino-carbonilo são influenciadas por factores muito diversos que incluem os aminoácidos, os péptidos, as proteínas, as aminas, a amónia, os açúcares redutores e outros compostos carbonilo bem assim como o pH, a temperatura, a humidade, os iões de metais pesados, a luz, os sulfitos e outros constituintes. As primeiras etapas da reacção conduzem à formação de bases de Schiff e de compostos de Amadori. As etapas seguintes levam à formação de moléculas insaturadas que se polimerizam e originam pigmentos castanhos (melanoidinas). O escurecimento é a mais característica das consequências da reacção de Maillard. Esta reacção pode influenciar quer positivamente, quer negativamente, a qualidade de alimentos submetidos a tratamento tecnológico. O tratamento térmico, ou apenas a armazenagem prolongada, podem ter efeitos deletérios sobre a qualidade nutricional das proteínas, em consequência da reacção de Maillard. Os produtos cárneos e o peixe possuem, após cozedura, uma certa actividade mutagénica e a reacção de Maillard parece desempenhar um papel importante na sua formação. As manifestações do envelhecimento sobre a fibra de colagénio, assim como as alterações patológicas da córnea, observadas na *diabetes mellitus* resultam, em grande parte, da glicolisação não enzimática devida à reacção de Maillard.

Palavras-Chave: reacção de Maillard, bioquímica, nutrição, mutagénesis, fisiopatologia

Summary: The non-enzymatic carbonyl-amino interactions, named Maillard reaction, induce complex modifications in food and in biological systems. The reaction is involved in food chemistry (organoleptic quality), food safety (mutagenic formation), nutrition (amino acid bioavailability) and in the *in vivo* protein chemistry (ageing and diabetes). Carbonyl-amino reactions are influenced by very diverse factors such as amino acids, peptides, proteins, amines, ammonia, reducing sugars and other carbonyl compounds as well as by pH, temperature, heavy metal ions, light, sulphites and other compounds. First reaction steps produce Schiff bases and Amadori compounds and the following ones unsaturated molecules which undergo polymerisation resulting in brown pigments (melanoidins). Browning is the most characteristic consequence of the Maillard reaction. This reaction can positively or negatively influence the processed food. Heat or even long term storage can have deleterious effects on the protein nutritional quality as a consequence of Maillard reaction. The reaction appears as being responsible for some of

the mutagenic activity present in cooked meat and fish. Manifestations of ageing on collagen as well as pathological alterations of the cornea in diabetes are mainly the result of non-enzymatic glycosylation.

Key-Words: Maillard reaction, biochemistry, nutrition, mutagenesis, physiopathology

Introdução

As interacções entre componentes aminados e carbonilados têm exercido, através do tempo, uma influência preponderante sobre a existência humana. Tal é evidenciado, entre outros, pela formação de humo à superfície da terra, assim como pelo escurecimento e pelas modificações de sabores associados com o processamento e com a cozedura de alimentos. Das citadas interacções, designadas quer por «reacções amino-carbonilo», quer por reacções de Maillard, resultam modificações complexas nos alimentos e nos sistemas biológicos.

Na Europa e na América do Norte a investigação sobre as reacções amino-carbonilo tem incidido principalmente sobre o leite e sobre os produtos lácteos, enquanto que no Japão ela se focaliza, essencialmente, sobre os produtos derivados da soja, que são uma das fontes importantes de proteína na Ásia (Kawamura, 1983; Nakimi, 1988).

Reacções amino-carbonilo

A descoberta por Louis-Camille Maillard, em 1912, da reacção amino-carbonilo, durante a tentativa de síntese de péptidos em condições fisiológicas, abriu as portas ao que mais tarde viria a ser o mercado da cor e do sabor dos alimentos.

Tal tipo de reacções, geralmente designadas por reacções de Maillard, continua a ser o objecto de grande interesse, relacionado quer com a química dos alimentos (qualidades organolépticas), quer com a sua inocuidade (formação de mutagénios), quer com a nutrição (biodisponibilidade de aminoácidos), quer ainda com a química das proteínas *in vivo* (*diabetes mellitus* e envelhecimento).

As principais implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos são muito diversas e revestem aspectos químicos, organolépticos, nutricionais, toxicológicos e manifestações *in vivo*. Os aspectos químicos estão relacionados com o mecanismo da reacção, com o isolamento e identificação dos produtos intermediários, e com a estrutura e propriedades dos produtos finais (melanoidinas). Os aspectos organolépticos dizem respeito ao desenvolvimento de aromas e sabores, à modificação de propriedades físico-químicas e ao controlo do fenómeno de escurecimento. Os aspectos nutricionais consideram, essencialmente, a perda de aminoácidos (lisina, arginina, etc.) e de valor nutritivo das fontes de proteína. Os aspectos toxicológicos estão estreitamente relacionados com a formação de mutagénios e de antimutagénios. Finalmente, os aspectos *in vivo* estão directamente implicados em certas manifestações do envelhecimento e da *diabetes mellitus*.

Os reagentes e os factores (moduladores) que influenciam a reacção, são também muito variados. Os primeiros incluem: aminoácidos, péptidos, proteínas, aminas, amónia, açúcares redutores e outros compostos carbonilo que podem resultar da oxidação de ácidos gordos, do ácido ascórbico e de polifenóis. Os segundos compreendem o pH, a temperatura, a humidade, os iões de metais pesados, a luz, os sulfitos e outros constituintes.

Quais as razões que fundamentam a importância das reacções de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos? Quais as justificações para um interesse científico crescente em tais fenómenos?

No que diz respeito à alimentação, parece ser evidente que um regime alimentar inteiramente sintético pode ser adequado para alimentar animais em experimentação mas será praticamente insípido e inaceitável para o homem. Isto é um facto, mesmo se tal tipo de regime for nutricionalmente correcto, e obtido por mistura de amido, proteínas purificadas, lípidos, vitaminas e minerais.

A alimentação humana contém quantidades não negligenciáveis de compostos de pequena massa molecular (aminoácidos, açúcares e ácidos gordos) sob forma livre que não só têm sabor agradável como também, em consequência de reacções de Maillard, são fonte de cores e de aromas agradáveis, quando os alimentos são correctamente processados, cozinhados e armazenados.

O homem adquiriu, ao longo dos séculos, técnicas diversas de selecção, de associação de componentes alimentares e de métodos de processamento para controlar, frequentemente de forma empírica, tal tipo de reacções.

Bioquímica das reacções de Maillard

É classicamente designada por reacção de Maillard a que inicialmente ocorre entre os grupos amínicos livres (em geral o grupo ε) de aminoácidos, péptidos ou proteínas e os grupos hidroxil-glucosídicos dos açúcares redutores. Os aldeídos e as cetonas podem reagir de forma semelhante à dos açúcares

redutores com os grupos amínicos livres (Kwon *et al.*, 1965; Montgomery e Day, 1965).

As primeiras etapas da reacção são relativamente simples e conduzem à formação de um número limitado de derivados: bases de Schiff, aldose-aminas e compostos de Amadori. As etapas seguintes, que se traduzem pela degradação dos compostos de Amadori, conduzem à formação de variadíssimos compostos, muitos deles moléculas insaturadas que se polimerizam (Finot e Magnenat, 1981).

A reacção de Maillard pode ser resumidamente descrita através do seguinte esquema:

$$R-NH_2 + \text{açúcar redutor} \leftrightarrow [\text{base de Schiff} (\leftrightarrow \text{aldosilamina}) \rightarrow \text{produtos de Amadori (ou desoxicetoses)} \rightarrow \text{produtos intermediários}] \rightarrow \text{melanoidinas}$$

As aldossilaminas (bases de Schiff), as desoxicetoses e os produtos intermediários são também designados por pré-melanoidinas.

A reacção de Maillard, tratando-se de uma reacção em que intervêm grupos amina e carbonilo, deve ser distinguida da reacção de «caramelização» que ocorre durante o aquecimento ou durante o tratamento de açúcares por soluções alcalinas (Heyns e Klier, 1968). Todavia, determinadas reacções que ocorrem durante a degradação, por efeito térmico positivo, dos açúcares são semelhantes às que se observam a temperaturas inferiores entre oses e aminoácidos (Mauron, 1981; Myers e Howell, 1992). Assim, a transformação de uma aldose numa cetose pela formação de um N-glucósido durante a reacção de Maillard é análoga à transformação de Lobry de Bruyn van Ekenstein que ocorre com açúcares em solução a pH alcalino.

Os complexos amino-açúcar que se produzem nas primeiras fases da reacção têm propriedades físico-químicas, como ausência de cor, alta solubilidade e estabilidade ao calor, diferentes das exibidas pelos produtos finais da reacção, que têm fraca solubilidade e são de cor castanha (Kato e Tsuchida, 1981; Kato *et al.*, 1986).

O escurecimento é a mais característica das consequências da reacção de Maillard. A cor produzida, a sua intensidade e as propriedades do produto final da reacção são fortemente dependentes da natureza dos reagentes e das condições de reacção, especialmente do valor de pH e da temperatura.

A reactividade das aldoses é geralmente superior à das cetoses, a das pentoses superior à das hexoses, reagindo os di- e os trissacáridos de forma muito rápida.

Os aminoácidos de configuração L podem ser divididos em três grupos de acordo com a sua capacidade de participar em reacções de Maillard (Ashoor e Zent, 1984). O primeiro grupo, de alta reactividade, é composto pela lisina, pela glicina, pelo triptofano e pela tirosina. O segundo, de reactividade média, inclui a prolina, a leucina, a isoleucina, a β-alanina, a α-alanina, a hidroxiprolina, a fenilalanina, a metionina, a valina, e as amidas glutamina e asparagina. O terceiro conjunto, de fraca reactividade, é formado pela histidina, pela treonina, pelo ácido aspártico, pelo ácido glutâmico e pela cisteína.

A opinião de que os aminoácidos básicos reagiriam mais facilmente que os aminoácidos ácidos, embora tivesse prevalecido durante muito tempo, parece não ser válida (Ashoor e Zent, 1984). Assim, a glicina (aminoácido neutro) tem uma reactividade quase semelhante à da lisina (aminoácido básico) e muito superior à da arginina que é também um aminoácido básico.

O pH alcalino e as temperaturas elevadas favorecem as reacções e induzem modificações na distribuição dos produtos finais. As propriedades físico-químicas dos grupos carbonilo e amina condicionam as primeiras etapas da reacção (Feeney *et al.*, 1975; Benzing-Purdie *et al.*, 1985). Foi recentemente demonstrado que a presença de oxigénio livre não é necessária na reacção de Maillard quando nesta intervêm pentoses (Litchfield *et al.*, 1999).

Aspectos organolépticos

A reacção de Maillard é considerada como a mais importante no processo de escurecimento dos alimentos (Davis, 1995). Ela pode influenciar, quer positivamente quer negativamente, a qualidade de alimentos submetidos a tratamento tecnológico. Assim, a reacção pode ser desejável em alimentos submetidos a cozedura ou indesejável, como a que se produz em alimentos submetidos a conservação (Ashoor e Zent, 1984).

Muito embora as reacções de Maillard não detinham a exclusividade na determinação dos aromas e da sapidez dos alimentos, quer processados industrialmente, quer cozinhados, não é menos certo que tais reacções desempenham um papel fundamental nas tradições culinárias através do mundo.

Os aromas que surgem no decurso das reacções de Maillard podem ser classificados em quatro grupos. O primeiro resulta de compostos heterocíclicos de azoto (tiazóis, pirazinas e piridinas) dando origem a aromas de noz, de assado e de pão cozido. O segundo resulta de enolonas cíclicas e produz aromas semelhantes ao do caramelo. Os dois grupos restantes incluem moléculas responsáveis por aromas de tipo mais volátil (policarbonilos, como por exemplo o aldeído pirúvico e monocarbonilos, como por exemplo os aldeídos voláteis resultantes da degradação de Strecker). Os representantes destes dois grupos são, em geral, encontrados em pequeníssimas quantidades na fase vaporizável, uma vez que se condensam rapidamente para formar melanoidinas (Mauron, 1981).

Na torrefacção do café e do cacau a reacção de Maillard é responsável pelo desenvolvimento da coloração e dos aromas agradáveis que os caracterizam (Hoskin, 1994).

Como já foi referido, as reacções de Maillard também podem ter efeitos negativos, inclusive no que diz respeito ao aroma dos alimentos. O exemplo mais flagrante é o desenvolvimento de odores desagradáveis em produtos lácteos, durante a sua armazenagem. Tais odores são provocados não só por degradação lipídica mas também por reacções de

Maillard. Neste último caso derivam da presença de moléculas com núcleo heterocíclico, nomeadamente pirazinas e pirróis (Ferretti e Flanagan, 1972; Scanlan *et al.*, 1968).

O escurecimento é um dos maiores problemas relativos à qualidade dos concentrados de sumos de frutos, sendo as reacções de Maillard responsáveis, em grande parte, pelo aparecimento de coloração, odor e gosto desfavoráveis (Cornwell e Wrolstad, 1981; Nicolas *et al.*, 1994; Pribella e Betusowa, 1978; Toribio e Lozano, 1984). A cinética do escurecimento não enzimático é dependente das características do produto (teor em substratos) sobretudo oses e das condições de armazenagem (essencialmente a temperatura).

A preservação dos alimentos tem sido tarefa humana importante desde há séculos. Os preservantes químicos adquiriram em anos recentes um lugar de destaque na indústria agro-alimentar, muito embora não haja resposta cabal e definitiva para todas as interrogações, no que diz respeito à sua inocuidade, assim como às interferências com a nutrição e com as funções de nutrição.

Determinados conservantes alimentares, como os derivados do enxofre - dióxido de enxofre, sulfitos, bissulfitos e metabissulfitos - têm como principal efeito de prevenir ou retardar as reacções que conduzem ao escurecimento dos alimentos, como consequência da reacção de Maillard (Quattrucci e Masci, 1992).

Os derivados do enxofre agem pela formação de compostos estáveis com os intermediários insaturados e instáveis da reacção de Maillard, reduzindo assim a concentração de reagentes susceptíveis de originar melanóides (Wedzicha, 1984).

Em produtos com concentrações elevadas de ácido ascórbico os sulfitos também se opõem ao escurecimento não enzimático do ascorbato, por mecanismos ainda não conhecidos, mas que são diferentes dos que estão implicados no escurecimento, tanto anaeróbio como oxidativo desta vitamina (Wedzicha *et al.*, 1991).

Aspectos nutricionais

O tratamento térmico, ou apenas a armazenagem prolongada, podem ter efeitos deletérios sobre a qualidade nutricional das proteínas, essencialmente como um dos resultados da reacção (Hurrell e Carpenter, 1981).

As modificações do valor nutritivo induzidas por tal série de reacções incluem: decréscimo da digestibilidade proteica, redução da biodisponibilidade da lisina e de outros aminoácidos essenciais e mesmo, possivelmente, a formação de substâncias que podem ser quer inibidoras do crescimento quer tóxicas, como por exemplo a lisino-alanina (Desrosières *et al.*, 1989; Finot, 1983; Friedman, 1982; Gumbmann *et al.*, 1983; Satterlee e Chang, 1982; Seungwork *et al.*, 1996; Sternberg *et al.*, 1975).

As fases avançadas da reacção de Maillard conduzem à destruição de aminoácidos nas fontes de pro-

teína, o que pode ser facilmente evidenciado por cromatografia de permuta iónica. O impacto das fases precoces da reacção no conteúdo de aminoácidos traduz-se pela formação de 1-amino-1-desoxi-2-cetoses como, por exemplo, a e-N-desoxilactulosil-lisina, produto correspondente ao rearranjo de Amadori sendo a lisina o aminoácido implicado.

Para além da destruição de aminoácidos, a reacção de Maillard pode provocar um decréscimo da sua biodisponibilidade. Pelo menos três mecanismos são responsáveis pelo défice assim induzido: a implicação de uma cadeia lateral de aminoácido na reacção (bloqueamento do aminoácido), a formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas por condensação quer aldólica quer interna e uma diminuição global da digestibilidade da proteína. Logicamente, a consequência negativa mais óbvia da reacção de Maillard nos alimentos é a diminuição do valor nutritivo das fontes de proteína.

Formação de mutagénios

Os produtos cárneos e o peixe possuem, após cozedura, uma certa actividade mutagénica. Muito embora nem todos os mutagénios sejam carcinogénicos, quase todos os carcinogénicos conhecidos têm actividade mutagénica (Sugimura e Wakabayashi, 1990).

Estudos epidemiológicos mostraram que a maioria das causas etiológicas do cancro na espécie humana age por via oral (Ames, 1984; Weisburger *et al.*, 1980). Assim sendo, a avaliação da formação e da presença de mutagénios nos alimentos é extremamente importante.

Os principais métodos de preparação culinária da carne e do pescado - fritar e grelhar - têm influência manifesta na formação de substâncias com actividade mutagénica (Skog, 1993). É desejável, dum ponto de vista de preservação da saúde, que se reduza ou se obste à formação de mutagénios nos alimentos.

A cor castanha, o sabor e o aroma agradáveis da carne cozinhada são, como já foi referido, parcialmente induzidos por reacções de Maillard. O sabor agradável da carne cozinhada provém de precursores hidrossolúveis (aminoácidos e açúcares) que, durante o aquecimento, formam piridinas, pirazinas e outros compostos voláteis (Ledl, 1990). As pirazinas fazem parte das substâncias geralmente responsáveis pelos sabores e aromas agradáveis dos alimentos cozinhados, sendo apenas necessárias quantidades infinitesimais para que o seu odor seja perceptível (Fors, 1987).

A duração, a temperatura e o método utilizado no processo de cozedura têm influência manifesta na formação de mutagénios. A actividade mutagénica aumenta proporcionalmente com a temperatura de cozedura (Nielsen *et al.*, Vahl *et al.*, 1988), com a duração do processo (Hargraves e Pariza, 1984; Knize *et al.*, 1985) e é maior em produtos fritos e grelhados do que em produtos cozidos em líquido, assados ou cozidos por micro-ondas (Hargraves e Pariza, 1984; Nader *et al.*, 1981).

As substâncias mutagénicas identificadas nos alimentos cozinhados são aminas heterocíclicas. Os mutagénios formados a temperaturas inferiores a 300°C são designados por mutagénios térmicos e possuem um grupo amina ligado a um núcleo imidazol, enquanto que os mutagénios que se formam a altas temperaturas são designados por pirolíticos (Hatch *et al.*, 1988) e possuem um grupo amina ligado a um núcleo piridina (Hiramoto *et al.*, 1997).

A reacção de Maillard parece desempenhar um papel importante na formação de mutagénios (Powrie *et al.*, 1982; Hiramoto *et al.*, 1996a, b, 1997; Jäersstad *et al.*, 1983; Wei *et al.*, 1981).

Foi bem demonstrado relativamente a várias aminas heterocíclicas que, quando administradas oralmente e de forma continuada, são carcinogénicas, sendo este efeito expresso em diversos órgãos do rato, do rato e do macaco (Adamsson *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 1991; Ochiai *et al.*, 1991; Ohgaki *et al.*, 1991).

É certamente difícil avaliar o risco das aminas heterocíclicas para o homem, a partir de estudos praticados em animais, dado que as doses administradas são, em geral, mil vezes superiores ao conteúdo de tais substâncias na alimentação humana. Todavia, não deve ser esquecido que a espécie humana se encontra também exposta a indutores enzimáticos e a promotores tumorais, que podem ter efeito de potenciação sobre a acção carcinogénica dos mutagénios alimentares (Aeschbacher e Turesky, 1991; Hiramoto *et al.*, 1998).

Foi paralelamente sugerida a existência de uma actividade antimutagénica («desmutagénica») em alguns dos produtos da reacção de Maillard (Kim *et al.*, 1986).

A actividade mutagénica das aminas heterocíclicas é parcialmente suprimida quando agem em presença de melanoidinas. Este efeito é muito mais pronunciado quando as aminas heterocíclicas se encontram na forma de hidroxilaminas. Parece assim que a antimutagenicidade das melanoidinas é sobretudo devida à sua acção sobre as formas hidroxilamina das aminas heterocíclicas.

Determinados dissacáridos (sacarose e lactose) e sobretudo alguns monossacáridos (glucose e frutose), quando presentes em elevada concentração, inibem *in vitro* a formação de mutagénios (Skog e Jägerstad, 1990). O mecanismo implicado seria o bloqueamento da formação de imidazoquinoxalinas por produtos (aldeídos aromáticos) da reacção de Maillard.

Um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos implicados na formação de mutagénios, por acção térmica, deve permitir encontrar estratégias para prevenir ou reduzir o seu aparecimento. Tal pesquisa visa logicamente melhorar a qualidade e a inocuidade dos alimentos.

Envelhecimento e Diabetes Mellitus

Uma grande diversidade caracteriza tanto a duração média de vida como a duração máxima de vida

das diferentes espécies do reino animal (Sell *et al.*, 1996).

A duração média de vida é influenciada por factores ambientais, enquanto que a duração máxima de vida é determinada geneticamente e é assim característica de cada espécie. Todavia, a visão exclusivamente genética do controlo do envelhecimento é insuficiente na medida em que negligencia mecanismos que fazem intervir moléculas e estruturas que verosimilmente participam em reacções que não são controladas pelos genes. Dado que os animais envelhecem a velocidades diferentes, parece lógico que os processos que controlam o envelhecimento, tanto ao nível molecular como ao nível tissular, tenham também velocidade diferente.

As manifestações do envelhecimento são mais pronunciadas na matriz extracelular, em que o componente primário é o colagénio. As fibras de colagénio jovem são resistentes, de cor branca, elásticas e facilmente dobráveis, podendo ser facilmente solubilizadas em concentrados de ureia ou através de digestão enzimática.

Com a idade, normalmente, surgem modificações progressivas caracterizadas por decréscimo de solubilidade e de elasticidade, assim como por aumento de resistência à digestão enzimática e por acumulação de pigmentos amarelos, fluorescentes. É fortemente provável que em tais modificações físico-químicas intervenha o estabelecimento de ligações cruzadas na molécula proteica (Newman *et al.*, 1993).

Na diabetes a córnea sofre uma série de alterações caracterizadas por aumento de espessura, de autofluorescência e de permeabilidade endotelial acompanhadas pelos consequentes défices de visão.

A hiperglicémia que é o factor preponderante na patogénese das complicações da *diabetes mellitus*, induz processos bioquímicos que incluem a via metabólica dos polióis (Porte Jr e Schwartz, 1996) e a glicolisação não-enzimática ou seja através de reacções de Maillard (Sady *et al.*, 1995; Ulrich e Cerami, 2001).

Foi bem demonstrado que os produtos da reacção de Maillard ou produtos finais da glicolisação avançada se acumulam em proteínas de grande longevidade (como o colagénio e outras proteínas membranares do cristalino) tanto durante o envelhecimento normal como, e de maneira acelerada, na situação de diabetes (Chellan e Nagaraj, 1999; Ulrich e Cerami, 2001). Tais produtos, isolados em diversos tecidos, incluem: a pentosidina, a carboximetil-lisina, a pirralina e o fluoróforo LM-1 (Monnier e Cerami, 1981; Zarina *et al.*, 2000).

O escurecimento não-enzimático parece ser um factor da maior importância no mecanismo de envelhecimento de tecidos que não são dependentes da insulina e que por tal facto se encontram sistematicamente expostos a concentrações elevadas de glucose. Fazem parte deste tipo de tecidos: o cristalino, a membrana basal das arteríolas, os nervos e os tecidos intersticiais da pele. Na diabetes, as reacções de Maillard podem acelerar o «envelhecimento» de tais tecidos e contribuir assim para o aparecimento

precoce de catarata e de arteriosclerose (Ulrich e Cerami, 2001).

Conclusões

A reacção de Maillard tem incidências múltiplas, nomeadamente nos domínios ecológico, tecnológico e biológico. Muitas destas incidências são desejáveis, reconhecendo-se nesta categoria uma gradação que vai do simplesmente vantajoso ao crítico na definição da qualidade. Outras são indesejáveis, variando também aqui o grau do prejuízo que trazem, e que vai desde a pequena desvantagem à toxicidade com expressão mutagénica e/ou carcinogénica.

As reacções e as interacções implicadas na glicolisação não-enzimática são extremamente complexas pelo que se deve ter o cuidado de evitar aspectos particulares das reacções de Maillard sem os integrar na globalidade dos fenómenos mais relevantes de tais reacções.

Bibliografia

- ADAMSSON R.H., THORGEIRSSON V.P., SNYDERWINE E.G., THORGEIRSSON S.S., REEVES J., DALGARD D.W., TAKAYAMA S. E SUGIMURA T., 1990. Carcinogenicity of 2-amino-3-methyl-imidazol [4,5-*f*] quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three Macaques. *Jap. J. Canc. Res.*, 81, 10-14.
- AESCHBACHER H.V. E TURESKY R.J., 1991. Mammalian cell mutagenicity and metabolism of heterocyclic aromatic amines. *Mutat. Res.*, 259, 235-250.
- AMES B.N., 1984. *Cancer and diet*. Science, 224, 668-670 e 757-760.
- ASHOOR S.H. E ZENT J.B., 1984. Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, 49, 1206-1207.
- BENZING-PURDIE L.M., RIPMEESTER J.A. E RATCLIFFE C.I., 1985. Effects of temperature on Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 31-33.
- CHELLAN P., NAGARAJ R.H., 1999. Protein crosslinking by the Maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 368, 98-104.
- CORNWELL C.J. E WROLSTAD R.E., 1981. Causes of browning in pear juice concentrate during storage. *J. Food Sci.*, 46, 515-521.
- DAVIS E., 1995. Functionality of sugars: physicochemical interactions in foods. *Am. J. Clin. Sci.* 62 (suppl), 170S-177S.
- DESROSIÈRES T., SAVOIE L. BERGERON G. E PARENT G., 1989. Estimation of lysine damage in heated whey proteins by furosine determinations in conjunction with the digestion cell technique. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1385-1391.
- FEENEY R.E., BLAKENHORN G. E DIXON H.B.F., 1975. Carbonyl-amine reactions in protein chemistry. *Adv. Protein Chem.*, 29, 135-203.
- FERRETTI A. E FLANAGAN V.P., 1972. Steam volatile constituents of nonfat dry milk. the role of the Maillard reaction in staling. *J. Agric. Food Chem.* 20, 695-698.
- FINOT P.A., 1983. Lysinoalanine in food proteins. *Nutr. Abst. Rev.* 53, 67-79.
- FINOT P.A. E MAGNENAT E., 1981. Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog. Fd. Nutr. Sci.*, 5, 193-207.
- FORS S., 1987. Alkylpyrazines - flavour compounds in food. Ph. D. Thesis, Chalmers University of Technology, Göteborg, 139p.
- FRIEDMAN M., 1982. Chemically reactive and unreactive lysine as an index of browning. *Diabetes*, 31 (suppl. 3), 5-14.
- GUMBMAN M.R., FRIEDMAN M. E SMITH G.A., 1983. The nutritional values and digestibilities of heat damaged casein

- and casein-carbohydrate mixtures. *Nutr. Rep. Int.*, 28, 355-361.
- HARGRAVES W.A. E PARIZA M., 1984. Mutagens in cooked foods. *J. Environm. Sci. Health*, C2, 1-49.
- HATCH F.T., FELTON J.S. E KNIZE M.G., 1988. Mutagens formed in foods during cooking. *ICI Atlas of Science: pharmacology*, 222-228.
- HEYNS K. E KLIER H., 1968. Bräunungsreaktionen und Fragmentierungen von Kohlenhydraten. Teil 4, Flüchtige Abbauprodukte bei Pyrolyse von Mono-, Oligo- und Polysacchariden. *Carbohydr. Res.*, 6, 436-448.
- HIRAMOTO K., ASO-O R., NI-YYAMA H., HIKAGE S., KATO T. AND KIKUGAWA K., 1996A. DNA strand break by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, a fragrant compound in various foodstuffs. *Mutation Res.*, 359, 17-24.
- HIRAMOTO K., LI X., MAKIMOTO M., KATO T., KIKUGAWA K., 1998. Identification of hydroxyhydroquinone in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands. *Mutat. Res.*, 419, 43-51.
- HIRAMOTO K., NASUHARA A., MICHIKOSHI K., KATO T., KIKUGAWA K., 1997. DNA strand-breaking activity and mutagenicity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine. *Mutat. Res.*, 395, 47-56.
- HIRAMOTO K., SEKIGUCHI K., AYUHA K., ASO-O R., MORIYA N., KATO T. AND KIKUGAWA K., 1996B. DNA breaking activity and mutagenicity of soy sauce: characterization of the active components and identification of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Mutation Res.*, 359, 119-132.
- HOSKIN J.C., 1994. Sensory properties of chocolate and their development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 60 (suppl.), 1068S-1070S.
- HURRELL R.F. E CARPENTER K.J., 1981. The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 50, 582-588.
- ITO N., HASEGAWA R., SANO M., TAMANO S., ESUMI H., TAKAYAMA S. E SUGIMURA T., 1991. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-*b*] pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, 12, 1503-1506.
- JÄGERSTAD M., LASE REUTERSWÄRD A., OLSSON R., GRIVAS S., NYHAMMAR T., OLSSON K. E DAHLQVIST A., 1983. Creatine and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef. In: *The Maillard reaction in foods and nutrition*, ACS symposium series 215 (eds. G.R. Walker e M.S. Feather), pp. 507-519, American Chemical Society, Washington.
- KATO Y., MATSUDA T., KATO N., WATANABE K. E NAKAMURA R., 1986. Browning and insolubilization of ovalbumin by Maillard reaction with some aldohexoses. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 351-355.
- KATO H. E TSUCHIDA H., 1981. Estimation of melanoidin structure by pyrolysis and oxidation. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 147-156.
- KAWAMURA S., 1983. Seventy years of Maillard reaction. *ACS Symp. Ser.*, 215, 3-8.
- KIM S.B., HAYASE F. E KATO H., 1986. Desmutagenic effects of melanoidins against amino acid and protein pyrolyzates. *Dev. Food Sci.*, 13, 383-392.
- KWON T.W., MENZEL D.B. E OLCOTT H.S., 1965. Reactivity of malonaldehyde with food constituents. *J. Food Sci.*, 30, 808-813.
- LEDL F., 1990. Chemical pathways of Maillard reaction. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology* (eds. P.A. Finot, H.U. Aeschbacher, R.F. Hurrell e R. Liardon), pp. 19-42, Birkhäuser Verlag, Basel.
- LITCHFIELD J.E., THORPE S.R., BAYNES J.W., 1999. Oxygen is not required for the browning and crosslinking of protein by pentoses: relevance to Maillard reactions *in vivo*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31, 1297-1305.
- MAURON J., 1981. The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Fd. Nutr. Sci.*, 5, 5-35.
- MONNIER V.M. E CERAMI A., 1981. Nonenzymatic browning *in vivo*: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*, 211, 491-493.
- MONTGOMERY M.W. E DAY E.A., 1965. Aldehyde-amine condensation reaction: a possible fate of carbonyls in foods. *J. Food Sci.*, 30, 828-832.
- MYERS D.V. E HOWELL J.C., 1992. Characterization and specifications of caramel colours: an overview. *Food Chem. Toxic.*, 30, 359-363.
- NADER C.J., SPENCER L.K. E WELLER R.A., 1981. Mutagen production during pan-broiling compared with microwave irradiation of beef. *Cancer Letters*, 2, 221-226.
- NAKIMI M., 1988. Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.*, 32, 115-184.
- NEWMAN Y.M., RING S.G. E COLACO C., 1993. The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.*, 11, 263-294.
- NICOLAS J.J., RICHARD-FORGET F.C., GOUPY P.M., AMIOT M.J. E AUBERT S.Y., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34, 109-157.
- NIELSEN P.A., VAHL M. E GRY J., 1988. HPLC profiles of mutagens in lean ground pork fried at different temperatures. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 187, 451-456.
- OCHIAI M., OGAWA K., WAKABAYASHI K., SUGIMURA T., NAGASE S., ESUMI H. E NAGAO M., 1991. Induction of intestinal adenocarcinomas by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-*b*] pyridine (PhIP) in Nagase analbuminemic rats. *Jap. J. Canc. Res.*, 82, 363-366.
- OHGAKI H., TAKAYAMA S. E SUGIMURA T., 1991. Carcinogenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mutat. Res.*, 259, 399-410.
- PORTE JR D. E SCHWARTZ M.W., 1996. Diabetes complications: why is glucose potentially toxic. *Science*, 272, 699-700.
- POWRIE M.W., WU C. E STICH H., 1982. Browning reaction systems as sources of mutagens and modulators. In: *Carcinogens and mutagens in the environment*, vol. 9 (ed. H.F. Stich), pp. 121-133, CRC Press, Boca Raton.
- PRIBELLA A. E BETUSOWA M., 1978. Veränderungen in Gehalt von Stickstoffhaltigen Stoffen bei der Lagerung von Obstsaftkonzentraten. *Fruchtsaft-industrie*, 9, 15-25.
- QUATTRUCCI E. E MASCI V., 1992. Nutritional aspects of food preservatives. *Food Addit. Contam.*, 9, 515-525.
- SADY C., KHOSROF S. E NAGARAJ R., 1995. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214, 793-797.
- SATTERLEE L.D. E CHANG K.C., 1982. Food protein deterioration mechanisms and functionality. In: *Nutritional quality of deteriorated proteins* (ed. J.P. Cherry), pp. 409-431, American Chemical Society, Washington.
- SCANLAN R.A., LINDSAY R.C., LIBBEY L.M. E DAY E.A., 1968. Heat induced volatile compounds in milk. *J. Dairy Sci.*, 51, 1001-1007.
- SELL D.R., LANE M.A., JOHNSON W.A., MASORO E.J., MOCK O.B., REISER K.M., FOGARTY J.F., CUTLER R.G., INGRAM D.K., ROTH G.S. E MONNIER V.M., 1996. Longevity and the genetic determination of collagen glycooxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93, 485-490.
- SEUNGWOK W.K., ROGERS Q.R. E MORRIS J.G., 1996. Maillard reaction products in purified diets induce taurine depletion in cats which is reversed by antibiotics. *J. Nutr.*, 126, 195-201.
- SKOG K., 1993. Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food Chem. Toxicol.*, 31, 655-675.
- SKOG K. E JÄGERSTAD M., 1990. Effects of monosaccharides and disaccharides on the formation of food mutagens in model systems. *Mutat. Res.*, 230, 263-272.
- STERNBERG M., KIM C.Y. E SCHWENDE F.J., 1975. Lysinoalanine: presence in foods and food ingredients. *Science*, 190, 992-994.
- SUGIMURA T. E WAKABAYASHI K., 1990. Mutagens and carcinogens in food. In: *Mutagens and carcinogens in the diet* (eds. M.W. Pariza, J.S. Felton, H.U. Aeschbacher e S. Sato), pp. 1-18, Wiley-Liss, New York.
- TORIBIO J.L. E LOZANO J.E., 1984. Nonenzymatic browning in apple juice concentrate during storage. *J. Food Sci.*, 49, 889-892.
- ULRICH PE., CERAMI A., 2001. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.*, 56, 1-21.
- VAHL M., GRY J. E NIELSEN P.A., 1988. Mutagens in fried pork and influence of the frying temperature. *Mutat. Res.*, 203, 239.
- WEDZICHA B.L., 1984. A kinetic model for the sulphite-inhibited Maillard reaction. *Food Chem.*, 14, 173-187.
- WEDZICHA B.L., BELLION I. E GODDARD S.J., 1991. Inhibition of browning by sulphites. In: *Nutritional and toxicological consequences of food processing* (ed. M. Friedman), pp. 217-236, Plenum Press, New York.

WEI C.I., KITAMURA K. E SHIBAMOTO T., 1981. Mutagenicity of Maillard browning products obtained from a starch-glycine model system. *Food Chem. Toxicol.*, 19, 749-751.

WEISBURGER J., REDDY B.S., HILL P., COHEN L.A. E WYNDER E.L., 1980. Nutrition and cancer - on the mechanisms bearing on causes of cancer of the colon, breast, prostate, and stomach. *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 56, 673-696.

ZARINA S., ZHAO H.R., ABRAHAM E.C., 2000. Advanced glycation end products in human senile and diabetic cataractous lenses. *Mol. Cell. Biochem.*, 210, 29-34.

Efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen no desempenho produtivo de ruminantes – Revisão

Effects of rumen defaunation on productivity in ruminants – A review

A.J.M. Fonseca¹ e A.A. Dias-da-Silva²

¹Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte, 4485-661 Vairão, Tel.: 252 660400, Fax: 252 661780, e-mail: amira@mail.icav.up.pt

²Departamento de Zootecnia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001 Vila Real Codex

Resumo: Nesta revisão faz-se uma análise crítica dos efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen na resposta produtiva de ruminantes. Reconhece-se que, embora a lista dos possíveis efeitos da eliminação dos protozoários seja relativamente longa, os efeitos no fluxo de azoto para o duodeno e na digestibilidade da fibra são aqueles que mais importa considerar. Em termos médios pode dizer-se que o fluxo de proteína para o duodeno aumenta e a digestibilidade da fibra tende a diminuir. Esta alteração na relação proteína/energia nos produtos finais da digestão é susceptível de provocar melhorias significativas no desempenho produtivo de ruminantes em situações de subalimentação proteica. Mas, por outro lado, recolhe-se também evidência que demonstra que os protozoários poderão ter um significado nutricional importante em animais alimentados com dietas em que houve incorporação de concentrados – amido. Conclui-se, porém, da necessidade de maior evidência experimental, obtida em ensaios de resposta, para que os efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen possam ser descritos de forma segura.

Palavras-chave: eliminação dos protozoários, desempenho produtivo, ruminantes.

Summary: In this review a critical analysis of the effects of rumen defaunation on the performance of ruminants is made. It is recognised that the main rumen defaunation effects are on nitrogen outflow to duodenum and on fibre digestion. On average, duodenal protein supplies increase and fibre digestibility usually decrease. This change on the protein/energy ratio of digestion end products can induce an improvement on animal performance when protein supply is a limiting factor. On the other hand, the protozoa can have an important nutrition meaning when ruminants are fed concentrate – starch – diets. It is concluded that more experimental evidence is required to establish the consequences of rumen defaunation on ruminant performances.

Key-words: defaunation, performance, ruminants.

Introdução

O rúmen alberga uma complexa mistura de partículas alimentares e de microrganismos: protozoários ciliados e flagelados, fungos, bactérias, micoplasmas e bacteriófagos, os quais estabelecem entre si diversas interações. As bactérias e os protozoários ciliados representam, na maior parte das condições, os

componentes mais importantes da população microbiana.

Ainda que o papel dos protozoários na fermentação ruminal seja inquestionável (Hungate, 1966), a verdade é que o ruminante não necessita deles para viver (Pounden e Hibbs, 1950; Eadie e Gill, 1971; Williams e Dinussen, 1973) podendo a sua eliminação representar, nalguns casos, um benefício adicional para o ruminante (Leng, 1990).

Apesar da lista dos possíveis efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen ser relativamente longa e poder ir desde uma menor degradação do lactato (Newbold *et al.*, 1986) a um aumento da sensibilidade à toxicidade do cobre (Ivan *et al.*, 1986), os efeitos no fluxo de N para o duodeno e na digestão das paredes celulares são, em geral, os mais relevantes e aqueles que são melhor conhecidos.

No presente trabalho passaremos em revista alguma da informação disponível sobre os efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen no desempenho produtivo de ruminantes.

Efeitos na digestão da fibra

Demeyer (1989), ao efectuar uma revisão sobre os efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen na digestão da fibra e na cinética do *digesta*, concluiu que, na maior parte dos casos, a eliminação reduzia a digestão no rúmen das paredes celulares das plantas. Os efeitos variaram, no entanto, desde uma forte inibição (50%) até uma ligeira estimulação (15%), sendo os efeitos depressivos particularmente relevantes em dietas em que houve incorporação de concentrados (amido) (Ushida *et al.*, 1990, 1991). É conhecido que os protozoários removem partículas de amido, ingerindo-as bem como às bactérias aderentes, o que pode estar na origem do aumento da população bacteriana amilolítica aquando da eliminação dos protozoários. As variações do pH do rúmen são maiores, havendo uma produção de ácidos gordos voláteis (AGV) mais rápida e menos regular ao longo do dia, o que se traduz em condições menos favoráveis ao desenvolvimento das bactérias com actividade celulolítica. Em trabalho mais recente,

Mendoza *et al.* (1993), ao estudarem a influência dos protozoários no local e na extensão de digestão do amido e na fermentação ruminal, verificaram que os protozoários reduziam a taxa de digestão do amido, bem como a extensão da sua digestão no rúmen, desviando a digestão para o intestino. Estes autores sugeriram que a presença destes microrganismos pode desempenhar um papel importante na redução de acidoses em dietas com elevada incorporação de concentrados (amido).

Já Romulo *et al.* (1989) observaram, em ovinos alimentados com dietas à base de palha, que a eliminação dos protozoários tinha um efeito positivo sobre a degradabilidade da palha *in sacco*. Neste trabalho, o número de zoósporos viáveis aumentou consideravelmente nos animais em que os protozoários foram eliminados, facto que importa considerar na interpretação dos resultados, visto o aumento da população fúngica do rúmen poder compensar a diminuição da actividade celulolítica associada com a eliminação dos protozoários.

Efeitos no fluxo de azoto para o duodeno

A ausência de protozoários aumenta, em geral, o fluxo de N para o duodeno e a eficiência do crescimento microbiano (Quadro 1). Estes efeitos podem explicar-se pelo facto das bactérias representarem uma importante fonte de proteína para os protozoários, sendo a presença de protozoários ciliados no rúmen responsável pela diminuição em 50 a 90% do número de bactérias (Coleman, 1989) e porque grande parte (60 a 80%) da biomassa dos protozoários, ao ficar retida no rúmen, morre neste compartimento gástrico, não sendo digerida pelo ruminante (Leng, 1989). Ao mesmo tempo, a fracção da proteína alimentar que escapa à degradação ruminal tende também a ser superior nestes animais (Quadro 1). A eliminação dos protozoários do rúmen representa, deste modo, uma forma eficaz de aumentar a quantidade de proteína que chega ao duodeno, dado que as fontes de aminoácidos para o ruminante - proteína de origem alimentar e microbiana - aumentam consideravelmente.

Quadro 1 - Efeito da eliminação de protozoários do rúmen (SP) no fluxo de azoto para o duodeno (gd⁻¹).

Referências	Espécie	Dieta†	N não amoniacal [1]		N microbiano [2]			N alimentar [1] - [2]		Efic. Sint. Prot. Micro.f	
			P	SP	Método‡	P	SP	P	SP	P	SP
LINDSAY e HOGAN (1972)	Ovinos	FL TV	18 29	21 32	DAPA DAPA	12 18	14 19	6 11	7 13	-	-
VEIRA <i>et al.</i> (1983)	Ovinos	48%SM+47%MI	15,6	17,4	-	-	-	-	-	-	-
USHIDA <i>et al.</i> (1984)	Ovinos	67%FL+30%CV+3%PT	23,4	32,8*	AN DAPA	15,3 12,1	18,1 17,7*	8,1 11,3	14,7 15,1	34,2 26,9	63,0* 60,6*
ROWE <i>et al.</i> (1985)	Ovinos	50%CC+50%FN	19,3	21,9*	¹⁵ N	12,3	14,8	7,0	7,1	32,0	35,0
KAYOULI <i>et al.</i> (1986)	Ovinos	50%CC+50%FN	22,4	28,7*	DAPA	13,4	17,0	8,2	11,6	28,8	45,1
MEYER <i>et al.</i> (1986)	Ovinos	54%CC+46%PM	18,8	22,4	³⁵ S DAPA ³⁵ S-DAPA	12,2 7,8 4,4	16,9* 16,1* 0,9*	6,6 -	5,5 -	27,4 -	42,7* -
USHIDA <i>et al.</i> (1986)	Ovinos	65%FL+30%CV	23,4	32,8*	³⁵ S AN DAPA	12,6 15,3 12,1	14,7 18,1 17,7*	9,8 7,1 10,3	17,1* 13,7* 14,1*	28,1 34,2 26,9	50,5* 63,0* 60,6*
		67%PTHS+33%CC(s/amido)	25,1	31,1*	³⁵ S AN DAPA	16,2 16,1 15,5	18,8 18,5 19,2*	6,7 6,7 7,3	10,1* 10,5* 9,8*	38,5 38,7 37,3	58,2* 57,2* 59,2*
PUNIA <i>et al.</i> (1987) (fluxo para o abomaso)	Bovinos	4,1kg FN	51,0	52,4*	DAPA	32,0	28,5	19,0	23,9	18,6	18,3
		4,1kg FN+20g ureia kg ⁻¹	50,6	57,0*	DAPA	32,4	33,0	18,2	24,0	17,9	21,2
USHIDA <i>et al.</i> (1990)	Ovinos	90%PTTA+10%CC	12,8	16,1*	AN DAPA	6,0 4,9	8,4* 7,8*	6,8 7,9	7,7 8,3	17,5 15,2	26,3* 24,4*
		72%PTTA+18%MI+10CC	13,3	19,3*	AN	6,6	9,3*	6,7	10,0	17,8	32,5*
					DAPA	5,9	10,2*	7,4	9,1	16,1	35,7*
		IVAN <i>et al.</i> (1991)	Ovinos	850g SM+126g CA 763g SM+213g BS	18,02 20,98	21,79* 26,87*	- -	- -	- -	- -	- -
HSU <i>et al.</i> (1991)**	Ovinos	65%AF+35%CC	214,2	253,5*	AN	118,2	133,5	96,0	119,7	10,9	13,2
BROUDISCOU <i>et al.</i> (1994)	Ovinos	600g FN+ 500g CC	16,44	23,93*	AN DAPA	7,16 9,45	10,75* 13,97*	9,28 6,99	13,18 9,96	13,9 18,5	26,4* 34,5*

† FL= feno de luzerna; TV= trevo violeta; SM= silagem do milho; MI= milho; CV= cevada; PT= palha de trigo; CC= concentrado; FN= feno; PM= palha de milho; PYHS= palha de trigo tratada com hidróxido de sódio; PTTA= palha de trigo tratada com amoníaco; i CA= caséina; BS= Bagaço de soja; AF= Alimento fibroso.

‡ DAPA= ácido diaminopimédico; AN= ácidos nucleicos.

Eficiência de síntese de proteína microbiana (g N Kg⁻¹ MOD: sendo MOD= matéria orgânica aparentemente dirigida no rúmen).

* O efeito foi significativo (P<0,05)

** O fluxo de azoto está expresso em proteína bruta (PB).

Quadro 2 - Efeito da eliminação dos protozoários do rúmen (SP) na resposta produtiva de ruminantes.

Referências	Animais	PVI [¶] (kg)	Dieta [†]	Ingestão (kg dia ⁻¹)		AMD [¶] (g dia ⁻¹)		Prod. de lã (g dia ⁻¹)	
				P	SP	P	SP	P	SP
POUNDEN e HIBBS (1950)	Bovinos	-	Leite (até 6 sem.); 66,7%FN+33,3%CC	-	-	106,8 [‡]	103,9 [‡]	-	-
BRYANT e SMALL (1960)	Bovinos	-	Leite; FN+CC	-	-	324	491,7	-	-
CHRISTIANSEN <i>et al.</i> (1965)	Ovinos	29,5	47%FL+47%MI+5,5%BS	-	-	254,0	186,0	-	-
BORHAMI <i>et al.</i> (1967)	Búfalos	48	Leite	122 ^f	122 ^f	380	330	-	-
			Leite+CC, 32%BA+65%SA	175 ^f	169 ^f	400	310*	-	-
			Leite+CC, 32%BA+65%SA	163 ^f	150 ^f	360	240*	-	-
			Leite+CC; CC	159 ^f	174 ^f	410	320	-	-
OSMAM <i>et al.</i> (1970)	Zebus	30	Leite+CC	1,26	1,27	310	240*	-	-
EADIE e GILL (1971)	Ovinos		Leite+FD	-	-	230	220	-	-
			CC+FD	-	-	98	100	-	-
WILLIAMS e DINUSSEN (1973)	Bovinos		Leite+CC	-	-	790	790	-	-
BIRD e LENG (1978)	Bovinos	180	1,5 kgPA+ML <i>ad libitum</i>	3,76	3,65	451	490	-	-
			1,5 kgPA+240 gCPBP+ML <i>ad libitum</i>	4,15	4,23	530	757*	-	-
BIRD <i>et al.</i> (1979)	Ovinos	20	PA+ML+Ureia	0,387	0,454	-11	37*	-	-
			PA+ML+Ureia+4%FP	0,645	0,693	75	133*	-	-
			PA+ML+Ureia+7%FP	0,660	0,685	146	159	-	-
			PA+ML+Ureia+10%FP	0,745	0,735	179	154	-	-
DEMEYER <i>et al.</i> (1982)	Ovinos	10	88%PB+5%ML+2,6Ureia	0,871	0,857*	181	213	-	-
			83%PHS+10%ML+3%Ureia	0,878	0,964	102	140*	-	-
			58%PHS+10%ML+26%MA+3%Ureia	1,766	1,895	239	192	-	-
BIRD e LENG (1984)	Ovinos	16	75%ML+25%CC(proteico)	1,127	1,530*	135	208*	-	-
			16	PA+ML+4%FP+3%Ureia	0,865	0,890	122	135	8,0
VAN NEVEL <i>et al.</i> (1985)	Ovinos	16	PA+ML+4%FP+5%Ureia	0,870	0,930	122	132	7,9	11,0*
			77,6%ML+21,9%CC(proteico)	1,085	1,114	100	120*	-	-
FORSTER e LENG (1989a)	Ovinos	-	84%PT+10%BA+6%UreiaM	0,871	0,917	57	69	4,2§	5,4§*
			54%PT+30%MI+10%BA+6%UreiaM	1,034	1,102	127	145	7,8§	8,7§*
HABIB <i>et al.</i> (1989)	Ovinos	25	PT+Ureia (dieta base)	0,625	0,679*	14,4	31,4*	4,0	4,7*
FENN e LENG (1989)	Ovinos	-	Pastagem verde	-	-	-	-	5,46§	6,80§*
FORSTER e LENG (1989b)	Ovinos	-	54%PT+30%MI+10%BA+6%UreiaM	0,905	0,790*	95	101	7,9§	9,6§*
ANKRAH <i>et al.</i> (1990)	Ovinos	25	CC(base MI)	1,160	1,087	169	188	-	-
IVAN <i>et al.</i> (1992)	Ovinos	42	92,61%SM+6,6%BS	1,71	1,48	217	204	4,58	7,02*
YANG e VARGA (1993)	Bovinos	642	45%SE+55CC	19,4	18,1	27,7§	24,6§*	-	-
BIRD <i>et al.</i> (1994)	Ovinos	32	PT	0,455	0,510	-69	-62	1,64	2,27*
			PT+150g FL	0,535	0,710	-20	-1	2,23	3,15*
			PTTA	0,755	0,675	41	14	2,5	3,15*
			PTTA+150g FL	0,825	0,840	58	72	3,09	4,15*
CHAUDHARY e SRIVASTAVA (1995)	Búfalos	190	65%PT+35%CC(40%MI)	4,19	4,2	516,7	466,7	-	-

† FN= feno; CC= concentrado; FL= feno de luzerna; MI= milho; BS= bagoço de soja; BA= bagoço de algodão; SA= sêma de arroz; FD= forragm desidratada; PA= palha de aveia; ML= melação; CPBP= concentrado proteico *bypass*; FP= farinha de peixe; PB= polpa de beterraba; PHS= palha tratada com hidróxido de sódio; MA= mandioca; PT= palha de trigo; UreiaM= mistura de ureia, minerais, vitaminas e melação; SM= silagem de milho; SE= silagem de erva; PTTA= palha de trigo tratada com amoníaco.

¶ PVI= peso vivo inicial; AMD= aumento médio diário.

‡ Peso vivo aos 6 meses (Kg)

^f Quantidade total de nutrientes digestíveis ingeridos (TDN/animal).

§ g de lã produzida por unidade de área (patch).

§ Quantidade de leite produzida (Kg dia⁻¹)

* O feito foi significativo (p<0,05).

Assim sendo, será de esperar que esta estratégia apresente efeitos benéficos na produtividade animal quando o nível de aminoácidos absorvidos for limitante. As respostas negativas porventura observadas deverão resultar, em princípio, de uma redução da digestão no rúmen e na consequente diminuição de EM disponível para o ruminante.

Efeitos no desempenho produtivo de ruminantes

Alguma da informação disponível sobre o efeito da eliminação dos protozoários na resposta produtiva de ruminantes está reunida no Quadro 2. Da análise deste quadro ressalta a elevada variação dos resultados obtidos, bem como das condições experimentais em que estes trabalhos foram realizados,

particularmente no que respeita ao tipo de dieta e de animal. Assim, para além de uma apreciação global onde a observação de registos contraditórios prevalece, importa avaliar os efeitos da ausência dos protozoários em função das diferentes condições.

Os primeiros trabalhos realizados sobre este assunto utilizavam, em geral, animais isolados após o nascimento (livres de protozoários) e, como termo de comparação, animais com protozoários, isto é, inoculados com licor de rúmen fresco proveniente de animais com uma flora microbiana normal. São disto exemplo os trabalhos de Pounden e Hibbs (1950), Bryant e Small (1960) Borhami *et al.* (1967), Osman *et al.* (1970), Eadie e Gill (1971) e Williams e Dinussen (1973). Como se pode observar, aos animais isolados correspondem, na maior parte dos casos,

aumentos médios diários (AMD) inferiores. No entanto, na interpretação destes resultados não pode deixar de considerar-se que os animais isolados podem não ter desenvolvido uma população microbiana “normal”, ou tendo-o, podem ter demorado mais tempo a fazê-lo e que, aquando da inoculação, os animais recebem, não só protozoários, como também um conjunto de fungos e bactérias, o que poderá contribuir para que os efeitos não possam ser apenas imputados à presença de protozoários.

A dieta é outro factor susceptível de interactuar com a eliminação dos protozoários do rúmen. Esta favorece ou não afecta significativamente o crescimento de ruminantes alimentados com dietas à base de alimentos fibrosos (Quadro 2: Demeyer *et al.*, 1982; Forster e Leng, 1989a; Habib *et al.*, 1989; Ivan *et al.*, 1992; Bird *et al.*, 1994) e com incorporação de níveis consideráveis de melaço (Bird e Leng, 1978, 1984; Bird *et al.*, 1979; Demeyer *et al.*, 1982; van Nevel *et al.*, 1985). Por outro lado, em dietas com incorporação de amido, os AMD dos animais livres de protozoários foram inferiores aos dos animais com uma população microbiana normal (Christiansen *et al.*, 1965; Demeyer *et al.*, 1982; Chaudhary e Srivastava, 1995). Estes resultados não são, porém, suportados pelos trabalhos de Forster e Leng (1989a, 1989b) e Ankrah *et al.* (1990). Isto sugere que, nestas condições, os protozoários poderão ter um significado nutricional importante, provavelmente pelo já referido “efeito tampão” no rúmen. São ainda apresentados no Quadro 2 os resultados de um trabalho de Yang e Varga (1993), onde foi estudado o efeito da eliminação dos protozoários do rúmen na produção de leite. A eliminação dos protozoários traduziu-se em menores produções de leite.

Estes efeitos na resposta do animal, ora positivos, ora negativos, em termos de produção de leite ou de crescimento, estão possivelmente associados com a situação nutricional em que o animal se encontra, uma vez que a eliminação dos protozoários altera a relação proteína/energia nos produtos finais da digestão, favorecendo o seu aumento. O fluxo de proteína para o duodeno aumenta (Quadro 1) e a digestibilidade da fibra, apesar de alguma variação, tende a diminuir. Será pois de esperar que os resultados positivos estejam associados a situações de subalimentação proteica e os negativos resultem da redução de energia disponível para o animal. Estas considerações sobre a alteração do perfil de nutrientes absorvidos são suportadas pelos resultados da eliminação dos protozoários na produção de lã. Com efeito, em todos os estudos apresentados, a eliminação dos protozoários exerceu um efeito positivo e significativo no crescimento da lã (Quadro 2). Este aumento da produção de lã é, certamente, resposta a uma maior absorção de aminoácidos (Quadro 1), visto que, como é bem conhecido, o crescimento da lã é altamente sensível à quantidade de proteína e, em particular, de aminoácidos sulfurados absorvidos no intestino delgado (Reis *et al.*, 1990 e 1992).

Finalmente, no que respeita à interpretação dos resultados em termos de crescimento (aumento de

peso), importa realçar que à eliminação dos protozoários do rúmen pode estar associada um aumento do volume do fluído ruminal (Orpin e Letcher, 1983/84), o que pode mascarar os AMD observados. Assim, quando se pretende estudar o efeito da eliminação dos protozoários do rúmen no crescimento, é importante que este factor seja eliminado. Só desta forma se podem realizar comparações seguras.

Conclusão

Os estudos que acabámos de rever evidenciam que a eliminação dos protozoários do rúmen altera a relação proteína/energia nos produtos finais da digestão, favorecendo o seu aumento e, como tal, é susceptível de provocar melhorias na resposta produtiva de ruminantes alimentados à base de alimentos fibrosos de baixo valor nutritivo. Não existe, contudo, um volume de evidência experimental obtida em estudos de longa duração que permita a descrição segura dos efeitos da eliminação dos protozoários no desempenho produtivo de ruminantes.

Bibliografia

- ANKRAH, P., LOERCH, S.C., KAMPMAN, K.A. E DEHORITY, B.A., 1990. Effects of defaunation on in situ dry matter and nitrogen disappearance in steers and growth of lambs. *J. Anim. Sci.*, 68: 3330-3336.
- BIRD, S.H. E LENG, R.A., 1978. The effects of defaunation on the rumen on the growth of cattle on low-protein high-energy diets. *Br. J. Nutr.*, 40: 163-167.
- BIRD, S.H. E LENG, R.A., 1984. Further studies on the effects of presence or absence of protozoa in the rumen on live-weight gain and wool growth of sheep. *Br. J. Nutr.*, 52: 607-611.
- BIRD, S.H., HILL, M.K. E LENG, R.A., 1979. The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein-high-energy diets. *Br. J. Nutr.*, 42: 81-87.
- BIRD, S.H., ROMULO, B. E LENG, R.A., 1994. Effect of lucerne supplementation and defaunation on feed intake, digestibility of sheep fed straw based diets. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 45: 119-129.
- BORHAMI, B.E.A., EL-SHAZLY, K., ABOU-AKKADA, A.R. E AHMED, I.A., 1967. Effect of early establishment of ciliate protozoa in the rumen on microbial activity and growth of early weaned buffalo calves. *J. Dairy Sci.*, 50: 1654-1660.
- BROUDISCOU, L., POCHE, S. E PONCET, C., 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and re-faunated sheep. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 49: 189-202.
- BRYANT, M.P. E SMALL, N., 1960. Observations on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. *J. Dairy Sci.*, 43: 654-667.
- CHAUDHARY, L.C. E SRIVASTAVA, A., 1995. Performance of growing Murrah buffalo calves as affected by treatment with Manoxol and the presence of ciliate protozoa in the rumen. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 51: 281-286.
- CHRISTIANSEN, W.N.C., KAWASHIMA, R. E BURROUGHS, W., 1965. Influence of protozoa upon rumen acid production and liveweight gains in lambs. *J. Anim. Sci.*, 24: 730-734.
- COLEMAN, G.S., 1989. Protozoal-bacterial interaction in the rumen. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 13-27.
- DEMEYER, D.I., 1989. Effect of defaunation on rumen fibre digestion and digesta kinetics. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 171-179.
- DEMEYER, D.I., VAN NEVEL, C.J. E VAN DE VOORDE, G., 1982. The effect of defaunation on the growth of lambs fed

three urea containing diets. *Arch. Tierernähr.*, 32: 595-604.

Eadie, J.M. e Gill, J.C., 1971. The effect of absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage-concentrate diet. *Br. J. Nutr.*, 26: 155-167.

FENN, P. E LENG, R.A., 1989. Effects of bentonite on wool growth of faunated and faun-free sheep. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 327-329.

FORSTER, F.J. E LENG, R.A., 1989A. Effect of varying protozoal population and diet supplementation on wool growth. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 321-322.

FORSTER, F.J. E LENG, R.A., 1989B. Effect on sheep of varying rumen protozoal population and bentonite supplementation in the drinking water. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 331-332.

HABIB, G., NOLAN, J.V. E LENG, R.A., 1989. Fermentative digestion and metabolism in faunated or fauna-free lambs fed roughage-based diets. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 323-326.

HSU, J.T., FAHEY, G.C.JR., BERGER, L.L., MACKIE, R.I. E MERCHEN, N.R., 1991. Manipulation of nitrogen digestion by sheep using defaunation and various nitrogen supplementation regimens. *J. Anim. Sci.*, 69: 1290-1299.

HUNGATE, R.E., 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York, 533 pp.

IVAN, M., DAYRELL, DES., MAHADEVAN, S. E HIDIROGLOU, M., 1992. Effects of bentonite on wool growth and nitrogen metabolism in fauna-free and faunated sheep. *J. Anim. Sci.*, 70: 3194-3202.

IVAN, M., HIDIROGLOU, M. E PETIT, H.V., 1991. Duodenal flow of nitrogen following protozoal inoculation of fauna-free sheep fed a diet supplemented with casein or soyabean meal. *Can. J. Anim. Sci.*, 71: 793-801.

IVAN, M., VEIRA, D.M. E KELLEHER, C.A., 1986. The alleviation of chronic copper toxicity in sheep by ciliate protozoa. *Br. J. Nutr.*, 55: 361-367.

KAYOULI, C., VAN NEVEL, C.J., DENDOOVEN, R. E DEMEYER, D.I., 1986. Effect of defaunation and refaunation of the rumen on rumen fermentation and N-flow in the duodenum of sheep. *Arch. Tierernähr.*, 36: 827-837.

LENG, R.A., 1989. Dynamics of protozoa in the rumen. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 51-58.

LENG, R.A., 1990. Factors affecting the utilization of "poor-quality" forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr. Res. Rev.*, 3: 277-303.

LINDSAY, J.R. E HOGAN, J.P., 1972. Digestion of two legumes and rumen bacterial growth in defaunated sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 23: 321-330.

MENDOZA, G.D., BRITTON, R.A. E STOCK, R.A., 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, 71: 1572-1578.

MEYER, J.H.F., VAN DER WALT, S.I. E SCHWARTZ, H.M., 1986. The influence of diet and protozoal numbers on the breakdown and synthesis of protein in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, 62: 509-520.

NEWBOLD, C.J., CHAMBERLAIN, D.G. E WILLIAMS, A.G., 1986. The effects of defaunation on the metabolism of lactic acid in the rumen. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 1083-1090.

ORPIN, C.G. E LETCHER, A.J., 1983/84. Effect of absence of ciliate protozoa on rumen fluid volume, flow rate and bacterial population in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 10: 145-153.

OSMAN, E.H., ABOU-AKKADA, A.R. E AGABAWI, K.A., 1970. Influence of rumen ciliate protozoa on conversation of food and growth rate in early-weaned zebu calves. *Anim. Prod.*, 12: 267-271.

POUNDEN, W.D. E HIBBS, J.W., 1950. The development of calves raised without protozoa and certain other characteristic rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.*, 33: 639-644.

PUNIA, B.S., LEIBHOLZ, J. E FAICHNEY, G.J., 1987. The role of rumen protozoa in the utilization of paspalum (*Paspalum dilatatum*) hay by cattle. *Br. J. Nutr.*, 57: 395-406.

REIS, P.J., TUNKS, D.A. E MUNRO, S.G., 1990. Effects of the infusion of amino acids into the abomasum of sheep, with emphasis on the relative value of methionine, cysteine and homocysteine for wool growth. *J. Agric. Sci., Camb.*, 114: 59-68.

REIS, P.J., TUNKS, D.A. E MUNRO, S.G., 1992. Effects of abomasal protein and energy supply on wool growth in merino sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 43: 1353-1366.

ROMULO, B. BIRD, S.H. E LENG, R.A., 1989. Combined effects of defaunation and protein supplementation on intake, digestibility, N retention and fungi counts in sheep fed straw based diets. In: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 285-288.

ROWE, J.B., DAVIES, A. E BROOME, A.W.J., 1985. Quantitative effects of defaunation on rumen fermentation and digestion in sheep. *Br. J. Nutr.*, 54: 105-119.

USHIDA, K., JOUANY, J.P. E DEMEYER, D.I., 1991. Effects of presence or absence of rumen protozoa on the efficiency of utilization of concentrate and fibrous feeds. In: T Tsuda, Y. Sasaki e R. Kawashima (Editors), *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants: Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology*. Academic Press, Inc. pp. 625-654.

USHIDA, K., JOUANY, J.P. E THIVEND, P., 1986. Role of rumen protozoa in nitrogen digestion in sheep given two isonitrogenous diets. *Br. J. Nutr.*, 56: 407-419.

USHIDA, K., JOUANY, J.P., LASSALAS, B. E THIVEND, P., 1984. Protozoal contribution to nitrogen digestion in sheep. *Can. J. Anim. Sci.*, 64 (Suppl.): 20-21.

USHIDA, K., KAYOULI, C., DE SMET, S. E JOUANY, J.P., 1990. Effect of defaunation on protein and fibre digestion in sheep fed on ammonia-treated straw-based diets with or without maize. *Br. J. Nutr.*, 64: 765-775.

VAN NEVEL, C.J., DEMEYER, D.I. E VAN DE VOORDE, G., 1985. Effect of defaunating the rumen on growth and carcass composition of lambs. *Arch. Tierernähr.*, 35: 331-337.

VEIRA, D.M., IVAN, M. E JUI, P.V., 1983. Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. *J. Dairy Sci.*, 66: 1015-1022.

WILLIAMS, P.P. E DINUSSON, W.E., 1973. Ruminal volatile fatty acid concentrations and weight gains of calves reared with and without ruminal ciliated protozoa. *J. Anim. Sci.*, 36: 588-591.

YANG, C.-M.J. E VARGA, G.A., 1993. The effects of continuous ruminal dosing with dioctyl sodium sulphosuccinate on ruminal and metabolic characteristics of lactating Holstein cows. *Br. J. Nutr.*, 69: 397-408.

Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo

Characterization of the inhibitors effects of *L. monocytogenes* Scott a produced by ripening microflora of Alentejo's traditional cheeses.

Maria Manuela M. Guerra*, Fernando M. A. Bernardo**

CIISA / Laboratório de Inspeção Sanitária - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
Rua Prof. Cid dos Santos, Polo Universitário da Ajuda, 1300 - 477 Lisboa, Portugal
Telef.: 351 21 3652800 Fax: 351 213652815 email: mguerra@fmv.utl.pt

Resumo: Procedeu-se a ensaios de inibição de *Listeria monocytogenes* "Scott A" utilizando isolados (n=531) recolhidos a partir de queijos tradicionais alentejanos. Verificou-se que 208 daqueles isolados (39,2%) inibiram o microrganismo de safo. Oitenta e dois isolados (39,4%) produziram substâncias filtráveis antagonistas de *Listeria*. Vinte e cinco inibições foram atribuídas à produção de ácidos orgânicos (12,0%), 37 à produção de peróxido de hidrogénio (17,8%) e 8 à produção simultânea destes dois compostos (6,7%). Não se observou a produção de bacteriocinas. Os agentes que evidenciaram capacidade anti-*Listeria* pertenciam aos géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Staphylococcus*.

Summary: From some traditional Alentejo's cheeses ripening microflora, 531 isolates were screened for *Listeria* antagonistic activity. Two hundred and eight of them exhibited inhibitory capacity towards the indicator strain 39,2% and 81 produced filterable substances (39,4%), which were able to inhibit the pathogen. Twenty-five inhibitions (12,0%) were attributed to the organic acids production, 37 to the hydrogen peroxide production (17,8%) and 8 to the simultaneous production of these two products (6,7%). No bacteriocin anti-*Listeria* production was observed. The agents that expressed a capacity anti-*Listeria*, were from the *Enterococcus*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; *Leuconostoc* and *Staphylococcus* Genera.

Introdução

Listeria monocytogenes tem vindo a ser reconhecida, nos últimos anos, como um dos agentes mais problemáticos em higiene e inocuidade alimentar. Em Portugal, este microrganismo tem sido encontrado com elevada frequência em queijos (Duarte, 1992; Guerra & Bernardo, 1997), carnes (Bernardo, 1992; Esteves *et al.*, 1996) e pescado (Pedro, 1996).

A presença de *L. monocytogenes* no queijo é atribuída ao facto de estes serem muitas vezes fabrica-

dos com leite cru ou leite submetido a um tratamento térmico equivalente a uma pasteurização baixa, permitindo a respectiva sobrevivência, ou ainda, a contaminação pós-pasteurização (Zottola & Smith, 1991).

Por outro lado, o controlo obrigatório destas contaminações acarreta elevados prejuízos sanitários e económicos, pelo que é imprescindível investigar outras vias de controlo destas contaminações, nomeadamente as que decorrem de interações bióticas.

É conhecido que as bactérias lácticas e os *Enterococcus* produzem vários compostos bactericidas incluindo os ácidos orgânicos, que fazem baixar o pH, o peróxido de hidrogénio, enzimas bacteriolíticas e as bacteriocinas (Demrigny *et al.*, 1996; Giraffa *et al.*, 1997). Alguns destes compostos também são responsáveis pelas características organolépticas dos queijos e ao mesmo tempo inibem parte dos microrganismos da microflora indesejável (Racchah *et al.*, 1979; Abdel-Bar & Harris, 1984; Piard & Desmazaud, 1992; Abdalla *et al.*, 1993; Hérard *et al.*, 1993; Nettles & Barefoot, 1993).

O presente trabalho teve por objectivo avaliar o papel que as microfloras comensais e de maturação de queijos tradicionais alentejanos podem, eventualmente, desempenhar no controlo e exclusão daquele germe infeccioso. Procurou-se ainda, identificar os respectivos mecanismos de inibição de *L. monocytogenes*.

Material e Métodos

Seleccção primária de estirpes competidoras

Para se obterem estirpes com potencial antagonismo com *L. monocytogenes*, isolaram-se bactérias próprias da maturação natural de queijos. Para tal colheram-se asepticamente 25g de queijo (incluindo a casca) e homogeneizaram-se num Stomacher (Lab-Blender 400) com 225 ml de Água Peptonada Tamponada (APT) (Oxoid). Efectuaram-se diluições decimais, e

* Engenheira Zootécnica, Bolseira de doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia / Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade Técnica de Lisboa

** Professor Associado da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa

semeou-se, por incorporação, 1 ml de cada uma delas, em gelose de diferenciação e contagem de microflora láctica (Gelose L-S modificada) (NP-1864/87) e, em gelose Canamicina Esculina Azida Agar (CEAA) (Oxoid) para o isolamento de enterococos. As culturas foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas, sendo o L-S em microaerofilia (Gas Generating Kit Oxoid).

Coleccionaram-se 216 isolados das culturas em gelose L-S, 50 a partir de MRS agar e 265 de CABEA.

Para pesquisa de actividade inibitória, realizaram-se ensaios de selecção, num inibigrama de contacto directo, à superfície de geloses "Plate Count Agar" (Difco) e "All Purpose Tween" (Difco). Como estirpe desafio utilizou-se *L. monocytogenes* "Scott A" numa concentração de 10⁶ ufc / ml.

Caracterização do efeito inibidor

As estirpes que revelaram antagonismo na fase de selecção (aparecimento de um halo transparente circundando a cultura testada) após 16-18 horas de incubação a 37 °C, foram averiguadas quanto ao mecanismo antagonista de acordo com uma adaptação do método seguido por Pilet *et al.* (1995) que utiliza os sobrenadantes das culturas.

Assim, estudou-se o mecanismo antagonista cultivando os isolados seleccionados em caldos de M17 (Oxoid), de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Oxoid) e Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid), os quais foram incubados a 37 °C durante 16-18 horas. Centrifugaram-se 10 ml de cada cultura durante 20 minutos a 4000 r.p.m. em centrífuga Hettich Universal. Os sobrenadantes obtidos, foram filtrados em Minisart Sartorius por filtros com 0,2 mm de diâmetro de porosidade. Prepararam-se quatro misturas do sobrenadante filtrado para caracterizar o efeito inibidor, com os seguintes ensaios:

- Ensaio 1 (E1) - adicionou-se catalase (Sigma) em tampão Fosfato de Sódio (pH 7) (0,2 M) (concentração final de 500 UI/ml) a 1ml do sobrenadante filtrado. Esta mistura foi incubada durante 30 minutos a 30°C.

- Ensaio 2 (E2) - neutralizou-se o pH de uma fracção do Sobrenadante Filtrado com NaOH (Merk) 1 M para excluir os efeitos dos possíveis ácidos orgânicos produzidos.

- Ensaio 3 (E3) - 1ml do sobrenadante filtrado, com pH neutralizado, foi tratado com catalase tal como se procedeu no ensaio 1, de forma a excluir os efeitos dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio eventualmente produzidos (Pilet *et al.*, 1995).

- Ensaio 4 (E4) - ensaio realizado directamente a partir do sobrenadante filtrado sem qualquer outro tratamento (ensaio em branco).

A parte final destes ensaios foi idêntica, isto é, depositaram-se 20 µl de cada um dos filtrados sobre a superfície de placas de gelose Triptona de Soja (Oxoid) com 0,6% de extracto de levedura (Difco) TSA-YE de consistência reduzida (1% de agar) (TSA-YE 1%) previamente inoculadas com 10⁶ UFC / ml de *L. monocytogenes* Scott A. As placas

foram incubadas a 37°C durante um período de 24 - 48 horas, após o qual se observaram e registaram os halos de inibição.

Identificação dos agentes com actividade inibidora

Os agentes microbianos que revelaram capacidade de inibição foram identificados com base nos procedimentos descritos por Hardie (1986); Kandler & Weiss (1986); Kloos & Schleifer (1986); Schleifer (1986) no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology e por Gasser (1992); Leveau *et al.* (1991); Devriese *et al.* (1993).

Utilizaram-se também os sistemas API STAPH (Bio Mérieux), API 20 STREP (BioMérieux) e API 50 CHL (BioMérieux) na identificação daqueles isolados.

Resultados

De um total de 531 isolados testados, 208 revelaram efeitos antagónicos directos com *Listeria* (39,2%). Em termos de caracterização das actividades inibidoras, verificou-se que 25 dessas estirpes produziam ácidos orgânicos (12,0%), 37 peróxido de hidrogénio (17,8%) e 14 produziram simultaneamente os dois tipos de compostos (6,7%). Registaram-se ainda 6 ensaios de inibição positivos, devidos a substâncias filtráveis não identificadas (2,9%) e 126 (60,6%) que se atribuíram à competição por nutrientes. Não se observou a produção de bacteriocinas contra *Listeria* por nenhum dos isolados testados (Quadro 1).

Os microrganismos que exibiram actividade contra *Listeria monocytogenes* Scott A, pertenciam a onze espécies diferentes (Quadro 2).

Discussão

A produção de ácidos e de peróxido de hidrogénio pela flora láctica e *Enterococcus* também foi registada por outros autores, confirmando-se neste estudo *in vitro* efeitos biológicos com eventual relevância tecnológica e sanitária. Ocando *et al.* (1993), isolaram 8 estirpes de *E. faecalis*, 2 de *Lb. casei*, 1 de *Lb. lactis* e 2 de *Lb. Brevis*, a partir de amostras de queijo Palmita, originário da Venezuela e identificaram os ácidos produzidos pelos referidos isolados. Todas as estirpes que analisaram produziam ácido láctico e propiónico e algumas também ácido acético e ácido succínico. Juven *et al.* (1992) demonstraram a capacidade de uma estirpe de *Lb. acidophilus* para produzir ácido láctico e H₂O₂. Tharrington & Sorrells (1992) verificaram que os filtrados de culturas de *Lb. delbruekii subsp lactis*, inibiam a *L. monocytogenes* através da produção de ácido láctico e peróxido de hidrogénio.

A metodologia de selecção primária adoptada neste estudo, pode ter condicionado a detecção da eventual biossíntese de bacteriocinas activas contra a *L. monocytogenes*, atendendo à composição inespecífica das geloses utilizadas. Como se pode constatar, não

Quadro 1 – Caracterização do tipo de inibição promovido contra *Listeria monocytogenes*

Meio	Nº. de estirpes analisadas	Nº. de Inibigramas Positivos	Competição por nutrientes	Ácidos Orgânicos	Peróxido de Hidrogénio	Ácidos Orgânicos e Peróxido de Hidrogénio	Bacteriocinas	Outras substâncias filtráveis
LS	216	87 (16,4%)	64 (30,8%)	8 (3,8%)	8 (3,8%)	4 (1,9%)	0	3 (1,4%)
MRS	50	24 (4,5%)	3 (1,4%)	4 (1,9%)	12 (5,8%)	3 (1,4%)	0	2 (1,0%)
CABEA	265	97 (18,3%)	59 (28,4%)	13 (6,3%)	17 (8,2%)	7 (3,4%)	0	1 (0,5%)
Total	531	208 (39,2%)	126 (60,6%)	25 (12,0%)	37 (17,8%)	14 (6,7%)	0	6 (2,9%)

Quadro 2 - Identificação dos isolados antagonistas de *L. monocytogenes*

Espécies	Nº de Isolados	Produção de ácidos orgânicos	Produção de peróxido de hidrogénio	Produção simultânea de ácidos e peróxido de hidrogénio
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	5	10	2
<i>Enterococcus faecium</i>	4	1	13	---
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	7	2	2	3
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	1	---	1
<i>mesenteroides / dextranicum 1</i>				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7	2	4	1
<i>Lactobacillus paracasei 1</i>	4	1	3	---
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	---	---	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	---	1	1
<i>Staphylococcus chonii</i>	1	---	1	---
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	1	---	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	1	2	---

Legenda: Sem produção de ácidos, peróxido de hidrogénio e/ou sem produção simultânea destes produtos.

foram detectadas inibições da estirpe desafio que se desvessem à produção daquele tipo de substâncias (bacteriocinas).

A determinação do mecanismo antagónico foi realizada com base no método descrito por Pilet *et al.* (1995) utilizado para produção de bacteriocinas em *Carnobacterium piscicola* e *C. divergens*, activas contra a *L. monocytogenes*. As alterações introduzidas neste estudo, em termos de meios de cultura e tempos de incubação, podem ter influenciado os mecanismos de produção de bacteriocinas, promovendo a supremacia dos efeitos decorrentes da produção de ácidos e peróxido de hidrogénio ou outras substâncias (enzimas).

Ao que parece, a biossíntese de bacteriocinas ocorre durante ou no final, da fase exponencial da multiplicação. Geralmente são produtos da excreção celular, mas uma parte dos factores com actividade antimicrobiana pode permanecer retida no interior da célula. Por outro lado, vários autores verificaram que a produção de bacteriocinas está relacionada com a biomassa bacteriana. A monitorização das condições de cultura pode ser decisiva para a optimização da biossíntese de bacteriocinas (Piard & Desmazeaud, 1992). O caldo M17 foi utilizado para cultivar *Enterococci* e *Lactococci* a 37°C em ensaios de determinação da actividade bacteriocinogénica. Também foi o escolhido por Carminatti *et al.* (1989), Villani *et al.* (1993), Tarelli *et al.* (1994) e Martinez *et al.* (1995).

Por sua vez, em ensaios equiparáveis, mas aferidos para a produção *in vitro* de bacteriocinas por *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus thermophilus*, vários autores adoptaram culturas em caldo de MRS, com incubação a 37°C, durante 16-20 horas (Spelhaug & Harlander, 1988; Carminatti *et al.*, 1989; Daeschel *et al.*, 1990; Villani *et al.*, 1993; Farias *et al.*, 1994; Tarelli *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1996).

Para a produção de bacteriocinas por *Micrococccaeae*, Spelhaug & Harlander (1988) e Villani *et al.* (1993), utilizaram caldo BHI a 37°C.

A vantagem da metodologia adoptada decorre da possibilidade da realização simultânea dos quatro ensaios, permitindo caracterizar em sucessivas fases os principais tipos de factores de inibição. A caracterização foi possível graças à neutralização e/ou ao tratamento escalonado dos filtrados com catalase. Na eventualidade do ensaio para verificação da produção de bacteriocinas (E3) ser positivo, ter-se-iam prosseguido os testes de forma a excluir ou não a hipótese das inibições terem ocorrido devido à produção de ácidos ou peróxido de hidrogénio, ou outros factores de inibição que se reconhece serem produzidos pelas bactérias lácticas (Piard & Desmazeaud, 1991).

A não detecção de isolados bacteriocinogénicos pode ter-se ficado a dever a vários factores: as condições ecológicas de biossíntese destas substâncias podem não ter sido optimizadas; também as estirpes antagónicas isoladas, podem não ser de facto bacte-

riocinogénicas ou, caso o fossem, podem ser substâncias específicas mas inativas para com a estirpe desafio utilizada (Ukuku & Shelef, 1997). Por outro lado, a frequência com que estas estirpes são referidas nos queijos é geralmente muito baixa. Por exemplo, Farias *et al.* (1994) obtiveram 25 estirpes antagonistas da *L. monocytogenes* isoladas a partir de queijos artesanais argentinos. Estas estirpes pertenciam aos géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*. Contudo, apenas 4 estirpes de *Enterococcus* revelaram capacidade de produção de listeriocinas. Também, Mathieu *et al.* (1993) isolaram 165 estirpes de *Leuconostoc spp.* a partir de vários alimentos, entre os quais, leite cru e queijos franceses. Somente uma estirpe – *Leuconostoc mesenteroides spp mesenteroides* FR52, que fora isolada a partir do leite cru produziu uma bacteriocina. Contudo esta Mesenterocina não foi testada contra a *L. monocytogenes*. Tarelli *et al.* (1994) ensaiaram 116 estirpes de *Enterococci*, das quais, apenas 21 mostraram actividade anti – *Listeria* pela produção de bacteriocinas. Também Ali *et al.* (1995) encontraram 14 estirpes de *Lactococcus lactis* inibidoras de *L. innocua*, isoladas a partir de leite cru e queijos fabricados a partir de leite cru. Somente uma estirpe foi seleccionada pela actividade contra *L. monocytogenes*. Por último, referimos que Martinez *et al.* (1995) verificaram que apenas 19 de 180 estirpes de *Lactococcus*, isoladas a partir de queijos tradicionais espanhóis, produziam bacteriocinas. No entanto estes autores não testaram a sua actividade contra *L. monocytogenes*.

Conclusões

Os resultados deste trabalho confirmam a existência de microrganismos que, *in vitro* expressam capacidades antagonistas de *L. monocytogenes* em queijos tradicionais (alentejanos). Por outro lado, a maioria dos efeitos antagónicos registados são do tipo ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio, detectados em 15,2% da microflora de cura ensaiada. Nos ensaios realizados, não se isolaram estirpes produtoras de bacteriocinas com actividade sobre *L. monocytogenes*. Seria importante prosseguir esta linha de pesquisa, atendendo à reduzida persistência de estirpes bacteriocinogénicas nos queijos ($p < 0,002$).

A aplicabilidade destes resultados, ao controlo da *Listeria*, no fabrico de queijos alentejanos necessita por isso de estudos mais aprofundados, nomeadamente, utilizando estirpes padrão reconhecidamente produtoras de bacteriocinas e efectuando estudos de optimização das condições de produção destas substâncias.

Bibliografia

ABDALLA, O. M., DAVIDSON, P. M. & CHRISTEN, G. L. 1993. Survival of Selected Pathogenic Bacteria in White Pickled Cheese made With Lactic Acid Bacteria or Antimicrobials. *J. Food Protection* 56: 972-976.

ABDEL-BAR, N. M. & HARRIS, N. D. 1984. Inhibitory Effect of *Lactobacillus bulgaricus* on Psychrotrophic Bacteria in Associative Cultures and in Refrigerated Foods. *J. Food Protection*. 47: 61-64.

ALI, D., LACROIX, C., THUAULD, D., BOURGEOIS, C. M. & SIMOND, R. E. 1995. Characterization of Diacetin B, a Bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. lactis* bv. *diacetylactis* UL720. *Can. J. Microbiol.* 41: 832-841.

BERNARDO, F. M. A. 1994. A Carne: Processos de Obtenção e Qualidade. In: Seminário - A Indústria das Carnes - Uma Prespectiva Integrada. Porto. Portugal.: 46.

CARMINATTI, D., GIRAFFA, G. & BOSSI, M. G. 1989. Bacteriocin - Like Inhibitions of *Streptococcus lactis* Against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection*. 52: 614-617.

DEMARIGNY, Y., BEUVIER, E., DASEN, A. & DUBOZ, G. 1996. Influence of Raw Milk Microflora on the Characteristics of Swiss-Type Cheeses. I. Evolution of Microflora During Ripening and Characterization of Facultatively Heterofermentative *Lactobacilli*. *Lait*. 76: 371-378.

DEVRIESE, L. A., POT, B. & COLLINS, M. D. 1993. Phenotypic Identification of the Genus *Enterococcus* and Differentiation of Phylogenetically Distinct *Enterococcal* Species and Species Groups – a Review. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.

DUARTE, M. H. 1992. Incidência de *Listeria monocytogenes* e Avaliação da qualidade Higié-Sanitária do Queijo Fresco Português. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa.

ESTEVES, A., SARAIVA, C., RIBEIRO, P., PATARATA, L. & MARTINS, C. 1996. *Listeria monocytogenes* and Hygienic Quality of Raw Meat. 42th International Congress of Meat Science and Technology. Lillehammer, Norway. Proc. 8-9.

FARIAS, M. E. F., HOLGADO, A. R. & SESMA, F. 1994. Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Regional Cheeses: Inhibition of Foodborne Pathogenes. *J. Food Protection*. 57: 1013-1015.

GASSER, F. 1992. Taxonomic *Lactobacillus* – *Lactococcus* – *Streptococcus* – *Leuconostoc* – *Pediococcus*. In: Cours International de Microbiologie des Aliments. Unité "Laits et Produits Laitiers". Institut Pasteur de Lille. (25 Mai – 25 Juin).

GUERRA, M. & BERNARDO, F. 1997. Occurrence of *Listeria spp.* in Traditional cheeses from Alentejo, Portugal. World Congress on Food Hygiene. The Hague. Prc. Book.

GIRAFFA, G., CARMINATTI, D. & NEVANI, E. 1997. *Enterococci* Isolated from Dairy Products: a Review of Risks and Potential Technological Use. *J. Food Protection*. 60: 157-161.

HARDIE, J. M. 1986. Genus *Streptococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Sneath, P. H. A., Maine, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. Williams & Wilkins. Baltimore. Vol. II.: 1043-1079.

HÉRARD, Y., RENAULT, D., CENATIEMPO, Y., LETELLIER, F., MAFTAH, A., JAYAT, C., BRESSOLIER, P., RATINAUD, M. H., JULIEN, R., FLEURY, Y., DELFOUR, A. 1993. Les Bacteriocines Contre *Listeria*: Une Nouvelle Famille de Protéines. *Le Lait*. 73: 207-213.

JUVNEN, B. J., SCHNED, F. & LINDNER, P. 1992. Antagonistic Compounds Produced by a Chicken Intestinal Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Protection*. 55: 157-161.

KANDLER, O. & WEISS, R. 1986. Section 14. Regular, Nonsporulating Gram-positive Rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Sneath, P. H. A., Maine, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. Williams & Wilkins. Baltimore. Vol. II.: 1208-1234.

KELLY, W. J., ASMUNDSON, R. V. & HUANG, C. M. 1996. Characterization of Plantaracin KW30, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 657-662.

KLOOS, W. E. & SCHLEIFER, K. H. 1986. Genus IV. *Staphylococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Sneath, P. H. A., Maine, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. Williams & Wilkins. Baltimore. Vol. II.: 1013-1019.

LEVEAU, J-Y., BOUIX, M. & ROISSANT, H de. 1991. La Flore Lactique. In: Techniques d'Analyse et De Contrôle Dans Les Industries Agro Alimentaires. Cap. 3. 2^{ème} édition. Vol.3 Ed. Bourgeois, C. M. & Leveau, J-Y. Lavoisier – Tec&Doc. Apria. Paris: 152-186.

MARTÍNEZ, B., SUÁREZ, J. E. & RODRÍGUEZ, A. 1995. Antimicrobials Produced by Wild *Lactococcal* Strains Isolated From Homemade Cheeses. *J. Food Protection*. 58: 1118-1123.

- MATHIEU, F., SUWANDI, S., REKHIF, N., MILLIÈRE, J. B. & LEFEBURE, G. 1993. Mesenterocin 52, a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* FR52. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 372-379.
- NETTLES, C. G. & BAREFOOT, S. F. 1993. Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *J. Food Protection.* 56: 338-356.
- OCANDO, A. F., GRANADOS, A., BASANTA, Y., GUTIERREZ, B & CABRERA, L. 1993. Organic Acids of Low Molecular Weight Produced by *Lactobacilli* and *Enterococci* Isolated From Palmita-Type Venezuelan Cheeses. *Food Microbiol.* 10: 1-7.
- PEDRO, S. C. N. C. 1996. Ocorrência de *Listeria* em Pescado e a sua Ecorresistência em Meio Aquático. Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa.
- PIARD, J. C. & DESMAZEAUD, M. 1992. Inhibiting Factors Produced by Lactic Acid Bacteria. 2. Bacteriocins and Other Antibacterial Substances: a Review. *Lait.* 72: 113-142.
- PILET, M-F., DOUSSET, X., BARRÉ, R., NOVEL, G., DESMAZEAUD, M. & PIARD, J-C. 1995. Evidence for Two Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated From Fish and Active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection.* 58: 256-262.
- RACCAH, M., BAKER, R. C., REGENSTEIN, J. M. & MULNIX, E. J. 1979. Potential Application of Microbial Antagonism to Extend Storage Stability of a Fresh Type of Food. *J. Food Sci.* 44: 43-46.
- SCHLEIFER, K. H. 1986. Gram positive cocci. Section 12. Family I – *Micrococcaceae*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. Sneath, P. H. A., Maine, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. Williams & Wilkins. Baltimore. Vol. II.: 999-1005.
- SPELHAUG, S. R. & HARLENDER, S. K. 1989. Inhibition of foodborne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Protection.* 52: 856-862.
- TARELLI, G. T., CARMINATI, D. & GIRAFFA, G. 1994. Production of Bacteriocins Active Against *Listeria innocua* From Dairy *Enterococci*. *Food Microbiology.* 11: 243-252.
- THARRINGTON, G. & SORRELS, K. M. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Milk Culture Filtrates from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*. *J. Food Protection.* 55: 542-544.
- UKUKU, D. O. & SHELEF, L. . 1997. Sensitivity of Six strains of *Listeria monocytogenes* to Nisin. *J. Food Protection.* 60: 867-869.
- VILLANI, F. SALZANO, G., SORRENTINO, E., PEPE, O., MARINO, P. & COPPOLA, S. 1993. Enterocin 226 NWC, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* 226, Active Against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 380-387.
- ZOTTOLA, E. A. & SMITH, L. B. 1991. Pathogenes in Cheese. *Food Microbiol.* 8: 171-182.

Comportamento higiénico de *Apis Mellifera Iberica* em células de criação de obreiras artificialmente infestadas com o parasita varroa

Hygienic behaviour of *Apis Mellifera Iberica* in brood cells artificially infested with varroa mites

J. M. Flores Serrano¹, S. M. Afonso Pires², F. Puerta Puerta¹

¹ - Centro Andaluz de Apicultura Ecológica. Campus Universitario de Rabanales, 14071. Cordoba - España.
Correio electrónico: ba1pupuf@lucano.uco.es

² - Escola Superior Agrária de Bragança (Departamento de Zootecnia)
Apartado 172, 5300-855 Bragança Codex - Portugal. Correio electrónico: spires@ipb.pt

Resumo: Este estudo teve como objectivo investigar a resposta de colónias de *Apis mellifera iberica*, relativamente a células de obreiras artificialmente infestadas com o parasita varroa, com o fim de aplicar os resultados obtidos no desenvolvimento de técnicas dirigidas à detecção e selecção de abelhas tolerantes ao parasita.

Alvéolos com criação de obreiras de 7 dias após a operculação foram artificialmente infestados com o parasita varroa. A resposta higiénica das abelhas, relativamente a estas células, foi medida num período de 24 horas. As abelhas manifestaram dois comportamentos diferentes. No primeiro, limpavam completamente as células, retirando os ácaros e as crias das abelhas. No segundo, desopercularam e reopercularam os alvéolos, retirando os ácaros, mas a cria permaneceu nas células.

O primeiro destes comportamentos foi mais constante e assegura um maior êxito relativamente à eliminação dos ácaros que se encontram a reproduzir nas células da criação. Os resultados foram analisados com o objectivo de propor futuras técnicas para localizar e seleccionar abelhas tolerantes à varroose.

Palavras-Chave: *Apis mellifera*, comportamento higiénico, tolerante, varroa.

Summary: The objective of this study was to investigate the response of colonies of *Apis mellifera iberica*, relatively to worker brood cells artificially infested with the varroa mite, with the aim of applying the obtained results in the development of techniques directed to the detection and selection of bees tolerant to the mite.

Cells with worker brood, 7 days after operculation were artificially infested with varroa mites. The hygienic behaviour of the bees, relatively to these cells was measured after a period of 24 h. The honeybees demonstrated two different behaviours. In the first, cleaned completely the cells, removing both brood and mites from the cells. In the second, bees uncapped and recapped the cells, removing the mites, but not the brood. The first of these behaviours was more constant than the second and assures a larger success relatively to the removal of the mites reproducing in the brood cells. The results were analysed with the propose of future techniques to localise and select bees tolerant to the mite.

Key-Words: *Apis mellifera*, honeybee, hygienic behaviour, tolerance, varroa.

Introdução

O parasita *Varroa destructor* (Anderson e Trueman, 2000) é um dos principais problemas da patologia apícola ocidental. É um ácaro elipsoidal, de cor castanha avermelhada. No seu ciclo de vida temos que distinguir entre uma fase forética, sobre as abelhas adultas e outra reprodutiva dentro das células de criação operculada (coberta por uma cúpula de cera, sobre a qual se produzirá a metamorfose da abelha). Em ambas as fases o ácaro alimenta-se sugando a hemolinfa do hospedeiro originando graves danos às abelhas. Durante a fase reprodutiva o ácaro produz várias fêmeas e um macho, que fecundará as suas próprias irmãs, de tal forma que quando a nova abelha nasce com ela emergem da célula o parasita progenitor e parte da sua descendência. O ciclo descrito anteriormente sucede-se várias vezes ao longo da vida do parasita, pelo que o crescimento da população é rápido sempre que exista criação disponível.

A presença da varroa tem provocado enormes perdas, obrigando à utilização de tratamentos químicos de síntese para evitar a morte das colmeias e dos apiários. Estes tratamentos têm ajudado a controlar a situação, mas por sua vez têm originado novos problemas, especialmente o aparecimento de resíduos nos produtos apícolas e de resistências do parasita a algumas das moléculas utilizadas (Milani, 1999 e Wallner, 1999). Distintas vias alternativas de luta estão a ser estudadas, entre as quais se destaca a selecção de abelhas tolerantes ao parasita, entendendo-se por tolerância a capacidade que as abelhas têm em conviver com a varroa. No nosso caso concreto, este termo, significa que a população de varroas nas colmeias pode crescer mais lentamente, pelo que se pode prolongar o período entre dois tratamentos ou podem ser tratadas com produtos menos agressivos. Neste sentido, como modelo de trabalho utiliza-se a relação da varroa com o seu hospedeiro originário, a abelha asiática *Apis cerana* Fabr. Entre esta abelha e o ácaro existe um equilíbrio, de tal forma que não existem riscos para a sobrevivência das colónias, e não é necessário o tratamento químico. Uma das características que permitem este equilíbrio é o comportamento higiénico da abelha *Apis cerana*. Esta

espécie é capaz de localizar as células de criação das obreiras onde se introduziu a varroa para se reproduzir, e limpá-las interrompendo o ciclo reprodutivo do parasita (Peng *et al.*, 1987; citados por Buchler, 1994; Boecking e Spivak, 1999 e Rath, 1999). Neste sentido, foram registados dois comportamentos em *Apis cerana*: no comportamento I, as abelhas detectaram e limpam completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a criação das abelhas, enquanto que no comportamento II as abelhas retiraram os parasitas e reopercularam as células, permitindo que prosseguisse o ciclo biológico da criação (Rath e Drescher, 1990; Rosenkranz *et al.*, 1993).

Estes mesmos comportamentos foram descritos na nossa abelha *Apis mellifera* L. (Boecking e Drescher, 1994). Este estudo teve como objectivo investigar a resposta de colónias de *Apis mellifera iberica*, relativamente a células de obreiras artificialmente infestadas por *Varroa destructor*, com o fim de aplicar os resultados no desenvolvimento de técnicas dirigidas à detecção e selecção de abelhas tolerantes ao parasita.

Material e Métodos

Os ensaios foram realizados em Córdoba (Espanha), em dois períodos diferentes do ano de 1999: verão (entre 21/5 a 8/7), coincidindo com as florações do girassol (*Helianthus annuus*) e do eucalipto (*Eucalyptus sp*) e inverno (entre 17/11 a 23/12), coincidindo com um aporte de néctar limitado. Foram utilizadas colónias de *Apis mellifera iberica* (Goetze, 1964), alojadas em colmeias Langstroth com 10 quadros, cobrindo as abelhas entre 9 e 10 quadros no verão e entre 7 e 9 no inverno. Nos ensaios utilizamos células contendo crias de obreiras com 7 dias após a operculação, em estado de pupas brancas, com olhos pardos (Rembold e Kramer, 1980). Para conhecer a idade da cria marcava-se o momento da operculação numa lâmina de plástico transparente, num período máximo de 24 horas. As varroas foram obtidas de abelhas adultas procedentes de colmeias dadoras, altamente parasitadas. Estes ácaros foram capturados utilizando açúcar em pó (Boecking e Ritter, 1993). Foram aplicados 3 tratamentos: no primeiro, células artificialmente infestadas com três varroas vivas; no segundo, que funcionou como o grupo testemunha I, as células foram abertas e fechadas sem introduzir parasitas e no terceiro, que funcionou como o grupo testemunha II, as células não foram manipuladas. Os parasitas foram introduzidos nas células através de uma pequena abertura na parte lateral do opérculo (De Ruijter, 1987; Boecking e Ritter, 1993). Os ensaios realizaram-se em 9 colmeias. Um total de 23 repetições foram efectuadas. Para cada tratamento e cada repetição foram utilizadas 10 células. Em 4 colónias realizaram-se, pelo menos, 3 repetições, nas restantes foram realizadas 1 ou 2. Nos resultados avaliaram-se dois comportamentos: comportamento I, no qual as abelhas limpam completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a criação e comportamento II, no qual as abelhas abriram e fecharam as células, retirando um ou mais parasitas

(no caso do ácaro não ter abandonado as células) mas não a criação. No estudo estatístico utilizaram-se testes não paramétricos. Para comparar os resultados dos diferentes tratamentos aplicamos o teste ANOVA de Friedman quando trabalhamos em simultâneo com os 4 tratamentos, e o teste Wilcoxon matched pairs quando foram comparados 2 a 2. Para estudar a correlação entre os comportamentos I e II aplicamos o Pearson Product Moment Correlation. As diferenças entre estações foram analisadas pelo teste Mann-Whitney U e as diferenças entre colmeias foram analisadas por ANOVA Kruskal-Wallis.

Resultados

Os resultados expressam-se em percentagem média \pm desvio padrão. As abelhas limpam $0,43 \pm 0,43\%$ das células abertas e fechadas sem introduzir os parasitas (testemunhas I), e $2,17 \pm 0,88\%$ das células não manipuladas (testemunhas II). Se considerarmos conjuntamente os comportamentos I e II, $63,63\%$ das células artificialmente infestadas provocaram a resposta das abelhas, das quais $20,55 \pm 4,98\%$ correspondeu ao comportamento I (as abelhas retiraram os parasitas e a criação) e $43,08 \pm 5,41\%$ ao comportamento II (as abelhas retiraram os parasitas, mas não retiraram a criação). Em $68,08 \pm 6,17\%$ das células artificialmente infestadas, em que as abelhas manifestaram o comportamento II (as abelhas retiraram os parasitas e reopercularam as células com criação), permaneceram alguns dos três parasitas depois destas serem reoperculadas. Em relação ao comportamento I, não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo testemunha I (células abertas e fechadas não parasitadas) e o II (células não manipuladas) ($p > 0,05$). No entanto, existiram diferenças significativas na resposta higiénica entre as testemunhas I e as células artificialmente infestadas ($p \leq 0,001$) e entre as testemunhas II ($p \leq 0,01$) e as células infestadas. Não existiu correlação estatisticamente significativa entre os comportamentos I e II na resposta das abelhas relativamente às células artificialmente infestadas ($r = -0,09$; $p > 0,05$). A resposta higiénica das abelhas entre os dois períodos em estudo (verão e inverno), foi igual ($p > 0,05$), no que se refere ao comportamento I. Contrariamente, existiram diferenças significativas entre ambas as temporadas quando consideramos o comportamento II ($p \leq 0,01$). De forma similar, não foram observadas diferenças significativas na resposta higiénica das abelhas, entre o verão e o inverno, relativamente às testemunhas I ($p > 0,05$), sendo essas diferenças significativas quando consideramos o grupo testemunhas II ($p \leq 0,05$) (Quadro I). No Quadro II podem ser consultados os valores obtidos nas 4 colmeias, em que foram efectuadas, pelo menos, 3 repetições. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre elas ($p > 0,05$), pode-se comprovar uma grande amplitude de variação na sua resposta e a maior diferença foi observada quando consideramos o comportamento I.

Discussão

Entre a abelha *Apis cerana* (hospedeiro originário do ácaro varroa) e o ácaro *Varroa destructor* existe um equilíbrio, de tal forma que o parasita nunca chega a pôr em perigo a sobrevivência das colónias de abelhas, as quais não necessitam de ser tratadas. Uma das razões que permitem este equilíbrio baseia-se no comportamento higiénico das abelhas relativamente a células de obreiras parasitadas, ou seja, à capacidade das abelhas de detectar e limpar as células da criação de obreiras que se encontram parasitadas pelo ácaro (Peng *et al*, 1987a; Peng *et al*, 1987b; Büchler, 1994; Boecking and Spivak, 1999; Rath, 1999). Este mesmo comportamento foi descrito por Boecking e Spivak, (1999) na abelha *Apis mellifera*, ainda que com uma intensidade menor. No nosso caso, os resultados mostram como o desencadeamento do comportamento higiénico resulta dos parasitas introduzidos e não da manipulação dos opérculos, uma vez que apenas 0,43% das células que se manipularam, mas nas quais não se introduziram parasitas (testemunhas I) foram removidas, comparativamente com 2,17% de células não manipuladas. Por outro lado, na abelha *Apis cerana* descreveram-se dois comportamentos diferentes: as abelhas podem limpar completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a própria criação das abelhas (comportamento I), ou então podem retirar unicamente os parasitas, reoperculando as células e permitindo a sobrevivência da cria das abelhas (comportamento II) (Rath e Drescher, 1990; Rosenkranz *et al.*, 1993). Ambos os comportamentos foram também descritos na abelha *Apis mellifera* (Boecking e Drescher, 1994; Flores *et al.*, 2000), e foram também verificados nos resultados aqui apresentados, ainda que vários aspectos devam ser considerados ao utilizar um ou outro comportamento na avaliação da resposta das abelhas.

- À priori, poderíamos considerar mais interessante o comportamento II, pois as abelhas retiram os parasitas e permitem a sobrevivência da cria. Este comportamento é especialmente interessante, na abelha *Apis cerana*, uma vez que os parasitas que permanecem nos alvéolos com cria de obreiras não conseguem reproduzir-se (Büchler, 1994 e Rath, 1999). O problema coloca-se de forma diferente na abelha *Apis mellifera*, na qual o ácaro consegue reproduzir-se nos alvéolos

com cria de obreiras. Além disso, os nossos resultados mostram como em 68,08% das células parasitadas, abertas e reoperculadas pelas abelhas (comportamento II) permaneceu algum parasita depois da reoperculação. Estes parasitas que permanecem podem completar o seu ciclo, contribuindo, desta forma, para o aumento da população de varroas nas colmeias.

- Por outro lado, seria de esperar que aquelas colónias que apresentaram um elevado grau do comportamento I também o fizessem com o comportamento II e vice-versa. Contrariamente a este facto, não conseguimos encontrar uma correlação significativa quando comparamos os comportamentos I e II nas células artificialmente infestadas com varroas. O que indica que ambos os comportamentos se devem manifestar de forma independente, não sendo possível avaliar um comportamento a partir dos resultados obtidos no outro.
- São de grande interesse os resultados obtidos quando comparamos a resposta higiénica das abelhas nos dois períodos estudados: verão e inverno (Quadro I). Assim, quando consideramos o comportamento I, observamos que foram limpas 24,44% e 18,04% das células infestadas com 3 varroas no verão e inverno respectivamente, não sendo encontradas diferenças estatísticas entre as duas estações ($p > 0,05$). Pelo contrário, não ocorre o mesmo se consideramos o comportamento II, em que 24,44% e 55,06% das células parasitadas foram limpas no verão e inverno respectivamente, existindo claras diferenças quando comparamos a resposta das abelhas entre as duas estações ($p \leq 0,01$), o que indica que este comportamento foi influenciado pela estação do ano e impede comparar colónias avaliadas em diferentes períodos.
- Quando comparamos as 4 colónias testadas, pelo menos, em 3 ocasiões (Quadro II), podemos comprovar que as maiores diferenças foram alcançadas ao considerar o comportamento I. Relativamente, ao comportamento II, as diferenças encontradas são muito mais exíguas, o que nos permite sugerir, uma vez mais, que provavelmente será mais interessante avaliar o comportamento I, quando pretendemos diferenciar colónias, procurando as que apresentam um comportamento higiénico mais eficaz.

Quadro I - Comportamento higiénico da abelha *Apis mellifera iberica* relativamente às células com criação de obreiras artificialmente infestadas com três varroas.

	Células infestadas. Comportamento I	Células infestadas. Comportamento II	Células abertas e fechadas sem parasitas	Células não manipuladas
Verão n=9	24,44±10,29 ^a	24,44±7,47 ^A	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Inverno n=14	18,04±5,09 ^a	55,06±5,59 ^B	0,71±0,71 ^a	3,57±1,33 ^b

Na mesma coluna letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) entre temporadas.

Na mesma coluna letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre temporadas

Quadro II - Comportamento higiénico de 4 colónias de *Apis mellifera iberica* relativamente às células com criação de obreiras artificialmente infestadas com três varroas.

	Número de repetições	Células infestadas. Comportamento I	Células infestadas. Comportamento II
Colónia 1	6	35,19±13,29	41,30±12,27
Colónia 2	3	6,67±6,67	40,00±25,17
Colónia 3	3	6,06±6,06	42,12±14,72
Colónia 4	3	11,11±11,11	45,56±17,88

- Outro factor a ter em atenção é o menor tempo que é necessário utilizar para a avaliação de cada colmeia quando registamos o comportamento I relativamente ao II. Este factor tem grande importância quando queremos testar um número elevado de colónias, sendo possível anotar os resultados deste comportamento no mesmo apiário, apenas com recurso à utilização de folhas de acetato onde foram marcadas as células em estudo. Pelo contrário, para registar os resultados do comportamento II, é necessário, além disso, a utilização da lupa binocular, o que dificulta este tipo de trabalho.
- Finalmente, após todas estas considerações, pensamos que o comportamento I (remoção da criação e parasitas) é o mais interessante para desenvolver técnicas que permitam detectar e seleccionar abelhas tolerantes ao parasita. No entanto, são necessários estudos posteriores para comprovar que as colónias que mostram de uma forma mais evidente este comportamento são as que apresentam um crescimento mais lento da população de parasitas.

Conclusão

Tal como na abelha *Apis cerana*, nas nossas abelhas pudemos observar dois tipos de comportamentos: I) as abelhas limpam completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a criação e II) as abelhas retiraram os parasitas (ou eles abandonaram as células ao serem desoperculadas pelas abelhas) e reopercularam os alvéolos, respeitando a vida da criação.

O comportamento I mostrou-se mais eficaz e apresentou uma menor variabilidade entre estações. Por isso, pensamos que é o comportamento mais adequado para detectar e seleccionar abelhas com alta capacidade higiénica em relação às células com criação de obreiras parasitadas.

São necessárias novas investigações para comprovar que as colónias seleccionadas desta forma são as que apresentam um crescimento mais lento da população de parasitas.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo "Instituto Nacional de Investigación Agraria", no âmbito do Programa

Apícola Nacional Espanhol (projectos API 98-003, API 99-007 Y API 99-008), assim como pelos FUNDOS FEDER (projecto 1FD97-1061).

Bibliografia

- ANDERSON, D.L. & TRUEMAN, J.W.H., (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & Applied Acarology*, 24, 165-189.
- BOECKING, O. & DRESCHER, W. (1994). Rating of signals that trigger *Apis mellifera* L. bees to remove mite-infested brood. *Apidologie*, 25, 459-465.
- BOECKING, O. & RITTER, W. (1993). Grooming and removal behaviour of *Apis mellifera intermissa* in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 32, 127-134.
- BOECKING, O. & SPIVAK, M (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie*, 30, 141-158.
- BÜCHLER, R. (1994). *Varroa* tolerance in honey bees occurrence, characters and breeding. *Bee World*, 75, 54-70.
- DE RUIJTER, A. (1987). Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive brood cycles of the honeybee. *Apidologie*, 18, 321-326.
- FLORES, JM; RUIZ, JA; RUZ, JM; PUERTA, F; CAMPANO, F. (2000). Tolerancia a *Varroa*. El comportamiento higiénico de las abejas. *El Colmenar*, 57, 44-49.
- GOETZE, G. (1964). Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchttause. *Paul Parey Hamburg, RFA*.
- MILANI, N. (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 30, 229-234.
- PENG, YS; FANG, Y; XU, S; GE, L. (1987A). The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49, 54-60.
- PENG, YS; FANG, Y; XU, S; GE, L; NASR, M.E. (1987B). Response of foster Asian honey bee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49, 256-264.
- RATH, W. (1999). Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie*, 30, 97-110.
- RATH, W. & DRESCHER, W. (1990). Response of *Apis cerana* Fabr. towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud. and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie*, 21, 311-321.
- REMBOLD, H. & KRÄMER, J.P. (1980). Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Apidologie*, 11, 29-38.
- ROSENKRANZ, R; TEWARSON, N.C.; SINGH, A; ENGELS, W. (1993). Differential hygienic behaviour towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. *Journal of Apicultural Research*, 32 (2), 89-93.
- WALLNER, K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30, 235-248.

Helminthas parasitas do Bambi comum (*Sylvicapra grimmia*) em Angola

Helminths affecting grey duiker (*Sylvicapra grimmia*) in Angola

Adriano F. Gomes

Instituto de Investigação Veterinária, Caixa Postal 405, Lubango, Angola

Resumo: Depois de abatidos em diferentes locais do Planalto Central de Angola, foram submetidos à pesquisa de helmintas um total de 14 exemplares de bambi comum (*Sylvicapra grimmia*), tendo sido identificados diversos géneros e espécies de Trematoda, Cestoda e Nematoda: *Paramphistomum* sp., *Moniezia expansa*, *Avitellina centripunctata*, *Stilesia hepatica*, *Taenia hydatigena* (forma larvar), *Taenia* sp. (forma larvar), *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus axei*, *Cooperia pectinata*, *Cooperia hungi*, *Haemonchus contortus*, *Haemonchus vegliai*, *Impalaia tuberculata*, *Trichuris* sp., *Setaria hombyi* e *Setaria caelum*. Destes helmintas, apenas *Setaria hombyi* havia já sido mencionada na literatura como parasitando o bambi comum em Angola. A prevalência e intensidade parasitária foram, em geral, baixas. Diversas das espécies identificadas parasitam igualmente ruminantes domésticos na região.

Summary: A total of fourteen grey duiker (*Sylvicapra grimmia*) were slaughtered in different places of the central plateau of Angola and submitted to a survey for helminths. Different genera and species of Trematoda, Cestoda and Nematoda were identified: *Paramphistomum* sp., *Moniezia expansa*, *Avitellina centripunctata*, *Stilesia hepatica*, *Taenia hydatigena* (larval stage), *Taenia* sp. (larval stage), *Trichostrongylus colubriformis*, *T. axei*, *Cooperia pectinata*, *C. hungi*, *Haemonchus contortus*, *H. vegliai*, *Impalaia tuberculata*, *Trichuris* sp., *Setaria hombyi* e *Setaria caelum*. From these helminths, only *Setaria hombyi* was already cited in the literature as a parasite from grey duiker in Angola. Prevalence and parasitic intensity were low. Several of the species identified are also present in domestic ruminants of the region.

Introdução

O bambi comum (*Sylvicapra grimmia*), é um pequeno antílope (Artiodactyla: Bovidae: Cephalophinae) que habita a região Afrotropical. Frequente em Angola, onde lhe tem sido movida caça sistemática, ocorre nos vários tipos de habitat, com excepção da floresta densa húmida e do deserto. Prefere regiões suficientemente cobertas, que lhe sirvam de refúgio e que tenham água disponível. No entanto, a sua dependência da água é relativa, pois pode prescindir dela por muito tempo (Sieiro, 1974).

É um animal de pequena estatura, com uma altura variando entre 45 e 63 cm e um peso médio de 16 kg. Os chifres, apenas presentes nos machos, possuem 13 a 17 cm de comprimento e são orientados obliquamente em relação ao plano facial, para cima e para trás (Sieiro, 1974). Vive isolado ou temporaria-

mente acasalado (Sieiro, 1974) e é quase que exclusivamente «browser» (Dorst & Dandelot, 1972). Alimenta-se de uma ampla variedade de lenhosas, incluindo flores, rebentos, folhas, frutos, sementes e vagens (Stuart & Stuart, 1997). As gramíneas raramente são ingeridas por este antílope e, quando o são, apenas se forem novas e suculentas ou na ausência de forragem lenhosa (Hofmann, 1973, citado por Boomker *et al.*, 1986). Utiliza os chifres para escavar bulbos, tubérculos e raízes, dos quais também se pode alimentar (Stuart & Stuart, 1997). Provoca ocasionalmente prejuízos nos campos de cultura quando aí vai em busca de alimentos (Stuart & Stuart, 1997). Alimenta-se igualmente de térmitas, outros insectos, e de pequenos vertebrados (Stuart & Stuart, 1997). O período de gestação é de cerca de 190 dias, dando origem a uma cria com um peso médio de 1,6 kg. Embora a parição possa ocorrer em qualquer época do ano, em algumas regiões o pico de nascimentos coincide com a época das chuvas (Stuart & Stuart, 1997).

Os helmintas do bambi comum foram inventariados por diversos autores, nomeadamente Round (1968) e Boomker *et al.* (1983; 1987; 1989). Contudo, em Angola, para além de algumas identificações ocasionais, não existem estudos sobre os parasitas deste antílope. Na presente comunicação, são apresentados os resultados das colheitas de parasitas internos realizadas em diversos exemplares de bambi comum abatidos em diferentes localidades do Planalto Central, uma das 32 zonas agrícolas de Angola.

Material e Métodos

O Planalto Central, ou Zona Agrícola 24, corresponde à superfície planáltica de maior altitude do território angolano, em grande parte situada acima da curva de nível dos 1500m. Possui uma área de cerca de 79040 km² (6,33% da superfície total do território) e compreende integralmente a província do Huambo e pequenas parcelas mais ou menos limítrofes das províncias do Bié, Huíla, Benguela e Kwanza Sul. A temperatura média anual oscila entre os 18°C e os 20°C, podendo o clima ser considerado como temperado quente. As médias anuais das temperaturas máximas oscilam entre 25°C e 27°C, e as

médias das temperaturas mínimas entre 11°C e 13°C. Os respectivos valores mais elevados e mais baixos ocorrem na estação seca. Segundo a classificação de Thornthwaite, toda a superfície se enquadra em climas húmidos (B1, B2 e B3) e mesotérmicos; na classificação de Köppen é do tipo climático Cwb (clima temperado com inverno seco e verão quente). A estação chuvosa, em coincidência com a época quente, dura, em média, cerca de sete meses, estendendo-se de Outubro a Abril. Existe boa distribuição das chuvas e a precipitação oscila desde os 1100 mm até um pouco acima dos 1400 mm. A estação seca, vulgarmente designada por cacimbo, alonga-se pelos restantes meses do ano. A humidade relativa média anual varia entre os 60% e 70%, verificando-se os máximos em Janeiro (75 a 80%) e os mínimos em Agosto (33 a 40%) (Diniz, 1973). É coberta por «mata de panda», caracteristicamente dominada por um estrato superior arbóreo de *Brachystegia*, *Isoberlinia angolensis* e *Julbernardia paniculata*, e um estrato inferior arbustivo de elementos esparsos, revestindo-se o solo de uma cobertura graminosa pouco densa. A ocupação da terra tem vindo a alterar o aspecto fisionómico inicial, provocando o surgimento, em grande parte da área, de comunidades típicas de savana com arbustos, em que o estrato herbáceo é essencialmente dominado pelas hiparrénias (Diniz, 1991). Em correspondência com os topos planálticos, em geral acima dos 1750m de altitude, ocorrem as denominadas comunidades herbáceas dos altiplanos ou «anharas do alto» (Diniz, 1991).

Um total de 14 bambis comuns foram abatidos a intervalos irregulares, durante o período compreendido entre Janeiro de 1990 e Agosto de 1992, em diversos locais de diferentes municípios das províncias do Huambo, Bié, Huíla e Benguela, integrados na zona do Planalto Central (Quadro 1). Todos os animais possuíam dentição definitiva. O ano foi dividido em estação das chuvas (Outubro a Abril) e estação seca (Maio a Setembro). Durante a primeira, foram abatidos e examinados seis animais, e no decurso da segunda, oito.

A pesquisa e colheita de helmintas foi realizada conforme descrito por Euzéby (1982) para os pequenos ruminantes. Os helmintas colhidos foram conservados em solução de formol a 5% e posteriormente identificados microscopicamente após esclarecimento pelo lactofenol. A identificação foi feita

com base em Soulsby (1982), Gibbons (1979; 1981), Boomker (1977), Cruz e Silva (1971), Yeh (1959), Verster (1969) e Wardle & McLeod (1952). Os termos de ecologia parasitária utilizados foram-no segundo as definições propostas por Margolis *et al.* (1982).

Resultados

Todos os bambis pesquisados se encontravam parasitados por uma ou mais espécies de helmintas. No Quadro 2 são especificados o número de animais parasitados e intensidade média parasitária verificada. No referente aos *Nematoda*, apenas foram consideradas as formas adultas. Dos nemátodos colhidos, nove foram identificados até à espécie, e um apenas até ao género. Dos tremátodos e céstodos, três foram-no até ao género e outros três até à espécie. Apenas uma das espécies identificadas, *Setaria hornbyi*, havia já sido mencionada na literatura como parasitando o bambi comum em Angola.

Os únicos tremátodos observados pertencem ao género *Paramphistomum*. Foram colhidos em bambis abatidos nos municípios de Longuimbali, Tchikala-Tcholoanga e Katchiungo durante a época das chuvas.

Moniezia expansa foi assinalada nos municípios de Longuimbali e Caconda, e *Avitellina centripunctata* apenas neste último. Foram observados exemplares de *Cysticercus tenuicollis*, forma larvar de *Taenia hydatigena*, em dois animais abatidos nos municípios de Ekunha e Longonjo. Outra forma de *Cysticercus*, não identificada, foi observada num bambi no município de Caála. Assinalou-se *Stilesia hepatica* nos municípios de Caála e Caconda.

As maiores cargas parasitárias por *Haemonchus* spp. ocorreram durante a época das chuvas. *Haemonchus contortus* foi observado nos municípios de Longuimbali, Ekunha, Caála e Caconda e *Haemonchus veglii* nos de Balombo, Katchiungo e Chinguar. Os três exemplares de *Trichostrongylus colubriformis* foram identificados num animal abatido no município de Caconda no decurso da estação chuvosa, e os de *Trichostrongylus axei* nos municípios de Caála e Longonjo, também no decorrer da mesma estação. Somente um animal, no município de Caconda, apresentou *Cooperia pectinata*, tendo sido a colheita realizada durante a estação pluviosa, o mesmo acontecendo com *Cooperia hungi*, assinalada

Quadro 1 - Províncias e municípios onde foram abatidos e submetidos a estudo exemplares de bambi comum.

Província	Benguela	Bié	Huambo	Huíla
Município	Balombo (1)	Chinguar (1)	Longuimbali (1) Ekunha (2) Caála (1) Tchikala-Tcholoanga (2) Katchiungo (1) Longonjo (2) Ukuma(1)	Caconda (2)

Nota: o número de animais pesquisados por município é indicado entre parêntesis.

Quadro 2 - Helmintas identificados em bambis comuns abatidos no Planalto Central

Espécie de helminta	Número de animais parasitados	Intensidade média
Trematoda		
<i>Paramphistomum</i> spp.	3	8
Cestoda		
<i>Moniezia expansa</i>	2	1
<i>Avitellina centripunctata</i>	1	2
<i>Stilesia hepatica</i>	2	*
<i>Taenia hydatigena</i> (forma larvar)	2	2
<i>Taenia</i> sp. (forma larvar)	1	1
Nematoda		
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	1	3
<i>Trichostrongylus axei</i>	3	42
<i>Cooperia pectinata</i>	1	21
<i>Cooperia hungi</i>	2	17
<i>Haemonchus contortus</i>	4	23
<i>Haemonchus vegliai</i>	3	8
<i>Impalaia tuberculata</i>	3	26
<i>Trichuris</i> sp.	2	17
<i>Setaria hornbyi</i>	6	1
<i>Setaria caelum</i>	2	1

* Infestação ligeira.

nos municípios de Longonjo e Balombo. Exemplos de *Trichuris* sp. foram assinalados em bambis abatidos tanto na época pluviosa como na seca, nos municípios de Ekunha e Londuimbali. *Impalaia tuberculata* foi observada nos municípios de Tchikala-Tcholoanga, Katchiungo e Chinguar, somente na estação das chuvas. Os espécimes de *Setaria* spp. foram colhidos nas diferentes épocas do ano em animais abatidos nos municípios de Londuimbali, Longonjo, Ekunha, Ukuma e Tchikala-Tcholoanga.

Discussão

Pesquisas que englobem a colheita e identificação de parasitas em animais selvagens permitem a obtenção de informações valiosas sobre espécies e respectiva intensidade parasitária. Entretanto, para que esses estudos sejam mais significativos, deverão indicar também a especificidade de hospedeiro (Horak, 1981). Contudo, esta nem sempre é fácil de ser determinada, pois exige o exame de um grande número de animais provenientes de vários locais e a colheita de formas adultas e imaturas dos parasitas, sua contagem e identificação. Consoante a especificidade de hospedeiro, Horak (1981) agrupa os parasitas em definitivos, ocasionais e acidentais. Os primeiros estão presentes, frequentemente em número alto, numa grande percentagem da população, e podem-se reproduzir e sobreviver por longo período de tempo nos hospedeiros. Os parasitas ocasionais ocorrem em número variável e apenas em alguns hospedeiros. São capazes de se reproduzir, mas sobrevivem apenas por tempo limitado no animal. Os parasitas acidentais estão presentes em pequeno número e apenas numa pequena percentagem da população. Poderão não ser capazes de se desenvol-

ver até ao estado adulto e, quando tal acontece, eventualmente não serão capazes de se reproduzir. O seu período de sobrevivência no hospedeiro poderá ser curto. Este parasitismo acidental ocorre, com frequência, quando diferentes hospedeiros utilizam a mesma área de pastagem.

O bambi comum é um antílope comum no Planalto Central, onde muitas vezes frequenta áreas de pasto também utilizadas por ruminantes domésticos e outros animais selvagens. Não são estritamente territoriais e vagueiam consideravelmente. Sendo «browsers», alimentam-se fundamentalmente de forragem lenhosa. Boomker *et al.* (1983) indicam que as larvas infectantes de helmintas que emergem da massa fecal também podem migrar para essas plantas, particularmente quando as gramíneas escasseiam, como por exemplo em áreas com sobrepastoreio, o que facilita a infecção daquele antílope por parasitas que lhe não são específicos.

Considerando que Angola apresenta uma ampla variedade de climas, os resultados obtidos na região estudada não devem ser extrapolados para outras áreas do território. Enquanto que a distribuição dos parasitas nos animais domésticos é influenciada principalmente pelas condições climáticas, nos antílopes, para além do clima, também o é pela distribuição biogeográfica dos respectivos hospedeiros (Horak, 1981). De uma forma geral, a prevalência e número de helmintas assinalados nesta pesquisa foram inferiores àqueles indicados por Boomker *et al.* (1983; 1986; 1987). Tal facto, poderá ser o reflexo de diferentes densidades de povoamento por herbívoros domésticos e selvagens nas áreas estudadas. O presente estudo foi realizado numa área mais extensa e, eventualmente, com menor densidade de povoamento por herbívoros. Por outro lado, a baixa carga parasitária verificada será também devida aos

hábitos de alimentação selectivos do bambi comum, que é fundamentalmente «browser». Considerando que as colheitas não foram realizadas a intervalos mensais durante o período de um ano, não podem ser tiradas conclusões sobre a sazonalidade dos parasitas observados. Contudo, os dados obtidos deixam transparecer uma tendência sazonal na ocorrência dos mesmos.

Diversos dos helmintas identificados parasitam frequentemente os ruminantes domésticos, podendo ser considerados como parasitas definitivos destes. O seu aparecimento no bambi comum advém principalmente do facto de, no Planalto Central, este utilizar amiudadamente as mesmas áreas de pastagem comunitária aproveitadas pelo gado, particularmente aquele do sector tradicional. Certamente que, nas áreas do território reservadas à fauna selvagem, aqueles parasitas serão substituídos por outros reconhecidos como parasitando quase exclusivamente antílopes. De entre os helmintas assinalados, aqueles peculiares da fauna selvagem parasitam igualmente diversas outras espécies de Artiodactyla para além do bambi comum. Boomker *et al.* (1986) afirmam que diversas espécies de helmintas de antílopes não apresentam grande especificidade de hospedeiro. Ainda segundo Boomker *et al.* (1983; 1986), os antílopes constituem melhores hospedeiros para os parasitas dos animais domésticos, do que estes para os parasitas daqueles. O mesmo parecem comprovar esta pesquisa e os levantamentos parasitológicos em ruminantes domésticos realizados em Angola. Estes levantamentos também têm indicado que os nemátodos são, na generalidade, os helmintas com maior prevalência nos ruminantes domésticos, o que igualmente acontece neste estudo relativamente ao bambi comum.

Os exemplares de *Paramphistomum* spp., pequenos tremátodos cónicos, necessitam no seu ciclo evolutivo de um hospedeiro intermediário, geralmente um gastrópode de água doce. O animal infecta-se ingerindo metacercárias enquistadas na vegetação existente próximo da água, principalmente no decurso da estação seca, quando alimentação e água escasseiam. Em Angola, nos ruminantes domésticos, a doença por eles provocada apresenta características sazonais (Gomes, não publicado). Boomker *et al.* (1983) consideram-nos como parasitas definitivos do bambi comum.

Stilesia hepatica é um cestódo que vive nos canais biliares de ovinos, caprinos, bovinos e antílopes. É comum nos Artiodactyla em África (Round, 1968). Em Angola, Fuhrmann (1943) já o havia assinalado na palanca vermelha (*Hippotragus equinus*). Foi postulado que *S. hepatica* terá sido originalmente um parasita dos antílopes selvagens em África, que mais tarde terá infectado também ruminantes domésticos (Mönnig & Veldman, 1956). Boomker *et al.* (1986) identificaram-no em dois bambis comuns, de um total de quatro necropsiados, no Parque Nacional de Kruger (África do Sul). Contudo, anteriormente, Boomker *et al.* (1983) não o encontraram em 16 bambis comuns num rancho do Transvaal central. *Moniezia expansa* é um dos Cestoda de ungulados

mais largamente distribuídos do ponto de vista geográfico (Cruz e Silva, 1971). Encontra-se mais ou menos difundida no seio dos ruminantes domésticos na região estudada (Gomes, não publicado). É vulgar nos Artiodactyla selvagens (Round, 1968). A sua ocorrência no bambi comum pode ser considerada como ocasional (Boomker *et al.*, 1983). O facto deste animal ser «browser», contribui para que ingira uma menor quantidade de ácaros *Oribatidae*, hospedeiro intermediário da *M. expansa*, e onde se concentram os cisticercóides, formas larvares infectantes deste helminta. *Avitellina centripunctata*, cestódo muito espalhado em África, pode ser encontrada em diversos Artiodactyla selvagens (Round, 1968). Em Angola, parasita frequentemente ruminantes domésticos (Gomes, não publicado). A sua ocorrência no bambi comum parece ser ocasional (Boomker *et al.*, 1983).

Cysticercus tenuicollis, forma larvar de *Taenia hydatigena*, ocorre com muita frequência em ovinos, caprinos, bovinos e suínos no Planalto Central, o que sugere que o parasitismo do cão e canídeos selvagens por esta *Taenia* seja comum. A forma livre como são criados os cães no meio rural e a presença de Carnívora selvagens contribuem para que tal aconteça. *C. tenuicollis* tem sido frequentemente assinalado nos herbívoros selvagens em África (Round, 1968).

Haemonchus spp. localiza-se no abomasum dos Artiodactyla. Gibbons (1979) considera válidas nove espécies, entre as quais *Haemonchus contortus* e *Haemonchus veglii*. *H. contortus* é um dos nemátodos mais frequentes nos ruminantes domésticos em Angola (Gomes, não publicado). Dias (1970) assevera que o parasitismo por *H. contortus* é frequente no bambi comum. Horak (1981) sugere que *H. contortus* evoluciona em ovinos e que a sua presença nos ruminantes selvagens se deve à introdução de ovinos no habitat daqueles e ao grande número de ovos expulsos pelo helminta, expondo assim espécies simpátricas à infecção. Boomker *et al.* (1989) consideram-no como parasita definitivo de ovinos e, possivelmente, também de caprinos. A sua presença nos antílopes deve ser considerada accidental e consequência de infecção cruzada a partir de ruminantes domésticos. Levine (1983) indica que o desenvolvimento óptimo do *H. contortus* se faz a temperaturas médias mensais compreendidas entre os 15 e 37°C e pluviosidade mensal superior a 50 mm, condições que existem na região estudada no decurso da estação das chuvas. *H. veglii* parece ser a espécie de *Haemonchus* mais comum nos antílopes «browsers» (Round, 1968; Boomker *et al.*, 1986). Embora a sua carga parasitária seja em geral baixa no bambi comum, pode ser considerado como parasita definitivo deste animal (Boomker *et al.*, 1983).

Trichostrongylus colubriformis, para além de parasitar ruminantes domésticos, também tem sido encontrado em diversos antílopes (Round, 1968). Dias (1970) afirma que este helminta parasita frequentemente o bambi comum. Boomker *et al.* (1983) assinalaram-no neste mamífero no Transvaal central, África do Sul. Considerando a baixa prevalência e abundância verificadas no bambi comum, parece ser

um parasita acidental deste animal, adquirido provavelmente a partir dos pequenos ruminantes domésticos. As formas adultas de *Trichostrongylus axei* localizam-se no abomasum dos ruminantes domésticos (Soulsby, 1982), sendo também frequentemente observadas em herbívoros selvagens que utilizem as mesmas áreas de pastagem (Boomker *et al.*, 1983; 1989). Dias (1970) indica que o bambi comum é muitas vezes parasitado por este helminta. Boomker *et al.* (1983; 1987; 1989) identificaram-no naquele animal em diferentes locais da África do Sul. No presente estudo, ocorreu em municípios onde a existência de ruminantes domésticos é significativa. Boomker *et al.* (1983) consideram *T. axei* como parasita definitivo do bambi comum. Levine (1963) indica que os estádios de vida livre de *Trichostrongylus* spp. têm o seu desenvolvimento óptimo quando as temperaturas médias mensais se situam entre 6 e 20 °C e a pluviosidade mensal é de pelo menos 50,8 mm, o que acontece no Planalto Central durante grande parte da estação chuvosa.

Cooperia pectinata parasita principalmente bovinos, mas tem sido observada igualmente em diversos herbívoros selvagens (Round, 1968). A sua presença no bambi comum poderá ser considerada como acidental (Boomker *et al.*, 1983). *Cooperia hungi* parasita diversos Artiodactyla selvagens em África (Round, 1968). Boomker *et al.* (1983; 1986) assinalaram-na no Transvaal central e no Parque Nacional de Kruger, África do Sul, tendo-a considerado como parasita definitivo do bambi comum.

Impalaia tuberculata é um helminta muito comum nos herbívoros selvagens (Round, 1968; Boomker, 1977). Boomker *et al.* (1983) observaram-no em prevalência e quantidade consideráveis infectando o bambi comum na África do Sul e consideram-no como parasita definitivo deste antílope. Atendendo que ocorreu em áreas onde outros Artiodactyla selvagens são também comuns, a infecção cruzada a partir destes poderá desempenhar papel importante na prevalência do helminta.

A ocorrência de *Trichuris* spp. nos Artiodactyla africanos não é rara (Round, 1968). Boomker *et al.* (1983; 1987; 1989) assinalam-no no bambi comum em diversos locais da África do Sul. Nas áreas onde ovinos e caprinos são frequentes, representa provavelmente um parasitismo ocasional adquirido a partir destes animais. Naquelas onde os herbívoros selvagens são frequentes, não pode ser excluída a infecção cruzada a partir de outro antílope (Boomker *et al.*, 1983).

Os helmintas do género *Setaria* localizam-se na cavidade peritoneal, ocasionalmente também na cavidade pleural, olhos e escroto dos ungulados e possuem como hospedeiros intermediários insectos hematófagos. Yeh (1959) propôs a sua divisão em três géneros distintos: *Setaria*, *Hyaconema*, *Artionema*. Alguns helmintologistas rejeitam, no entanto, os dois últimos géneros. Assim, Nelson (1962) refere que, do ponto de vista biológico, todas as espécies de *Setaria* fazem parte de um mesmo grupo natural. Por sua vez, Ortlepp (1964) considera que os caracteres morfológicos adoptados para fragmentar o género

não possuem valor genérico. As espécies do género *Setaria* parecem ser muito comuns nos Artiodactyla em África (Round, 1968). Serrano & Andrade (1973) já haviam assinalado *Setaria hornbyi* no bambi comum em Quimbango (Malanje). Anteriormente, já Kreis (1938) se havia a ela referido como parasitando *Hippotragus* spp. em Angola, e Vuylsteke (1956) a palanca vermelha (*Hippotragus equinus*).

Bibliografia

- BOOMKER, J. (1977). A revision of the genus *Impalaia* Mönig, 1924. Onderstepoort J. vet. Res., 44: 131-138.
- BOOMKER, J.; DU PLESSIS, W. H. & BOOMKER, E. A. (1983). Some helminth and arthropod parasites of the grey duiker, *Sylvicapra grimmia*. Onderstepoort J. vet. Res., 50: 233-241.
- BOOMKER, J.; HORAK, I. G. & DE VOS, V. (1986). The helminth parasites of various artiodactylids from some South African nature reserves. Onderstepoort J. vet. Res., 53: 93-102.
- BOOMKER, J.; HORAK, I. G. & MacIVOR, K. M. DE F. (1989). Helminth parasites of grysbok, common duikers and Angora and Boer goats in the Valley Bushveld in the eastern Cape Province. Onderstepoort J. vet. Res., 56: 165-172.
- BOOMKER, J.; KEEP, M. E. & HORAK, I. G. (1987). Parasites of South African wildlife. I. Helminths of bushbuck, *Tragelaphus scriptus*, and grey duiker, *Sylvicapra grimmia*, from the Weza State Forest, Natal. Onderstepoort J. vet. Res., 54: 131-134.
- CRUZ e SILVA, J. A. (1971). Contribuição para o estudo dos helmintes parasitas dos vertebrados de Moçambique. Mem. Junta Invest. Ultram., 2ª série, 61, Lisboa. 465pp.
- DIAS, J. A. T. (1970). Algumas considerações epidemiológicas e económicas relacionadas com a fauna selvagem de Moçambique. Rev. Ciências Vet., Série B, 3: 109-127.
- DINIZ, A. C. (1973). Características mesológicas de Angola. MIAA, Nova Lisboa. 482pp.
- DINIZ, A. C. (1991). Angola - O Meio Físico e Potencialidades Agrárias. Instituto para a Cooperação Económica, Lisboa. 189pp.
- DORST, J. & DANDELLOT, P. (1972). A field guide to the larger mammals of Africa. Collins, London.
- EUZEBY, J. (1982). Diagnostic expérimental des helminthoses animales. Livre 2. Editions «Informations Techniques des Services Vétérinaires», Paris. 364pp.
- FUHRMANN, O. (1943). Cestodes d'Angola. Résultats de la Mission scientifique Suisse en Angola. 2me voyage (1932-33). Revue Suisse Zool., 50: 449-471.
- GIBBONS, L. M. (1979). Revision of the genus *Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongylidae). Systematic Parasitology, 1: 3-24.
- GIBBONS, L. M. (1981). Revision of the African species of the genus *Cooperia* Ransom, 1907 (Nematoda, Trichostrongylidae). Systematic Parasitology, 2: 219-252.
- HORAK, I. G. (1981). Host specificity and the distribution of the helminth parasites of sheep, cattle, impala and blesbock according to climate. Journal of the South African Veterinary Association, 52: 201-206.
- KREIS, H. A. (1938). Beiträge zur kenntnis parasitischer Nematoden. VII. Parasitische Nematoden der schweizerischen wissenschaftlichen Expedition nach Angola (Afrika) im Jahre 1932. Zentbl. Bakt. Parasitkde, 142: 90-105.
- LEVINE, N. D. (1963). Weather, climate and the bionomics of ruminant nematode larvae. Advances in Veterinary Science, 8: 215-261.
- MARGOLIS, L.; ESCH, G. W.; HOLMES, J. C.; KURIS, A. M. & SCHAD, G. A. (1982). The use of ecological terms in parasitology (Report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). J. Parasitol., 68(1): 131-133.
- MÖNNIG, H. O. & VELDMAN, F.J. (1956). Handbook on Stock Diseases. Nationale Boekhandel Beperk, Cape Town. 429pp.
- NELSON, G. S. (1962). Observations on the development of *Setaria labiatopapillosa* using new techniques for infecting *Aedes aegypti* with this nematode. J. Helminth., 36: 281-296.
- ORTLEPP, R. J. (1964). Observations on helminths parasitic in

warthogs and bush pigs. Onderstepoort J. vet. Res., 31: 11-38.

ROUND, M. C. (1968). Check-list of the helminth parasites of African mammals of the orders Carnivora, Tubulidentata, Proboscidea, Hyrycoidea, Artiodactyla and Perissodactyla. Technical Communication of the Commonwealth Bureau of Helminthology, 38, vi + 252pp..

SERRANO, F. M. H. & ANDRADE, M. H. PINTO de, (1973). Contribuição para o estudo dos helmintas da fauna selvagem de Angola. Livro de Homenagem ao Professor Fernando Frade Viagas da Costa, Lisboa: 321-339.

SIEIRO, D. M. (1974). Herbívoros Selvagens de Angola. Série Técnica, 45. Instituto de Investigação Agronómica de Angola, Nova Lisboa. 68pp..

SOULSBY, E. J. L. (1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th ed., Baillière Tindall, London. 809pp..

STUART, C. & STUART, T. (1997). Field guide to the larger mammals of Africa. Struik Publishers, Cape Town. 318pp..

VERSTER, A. (1969). A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus, 1758. Onderstepoort J. vet. Res., 36: 3-58.

VUYLSTEKE, C. (1956). Note sur quelques nématodes parasites avec description de neuf espèces nouvelles. Revue Zool. Bot. Afr., 53: 441-477.

WARDLE, R. A. & McLEOD, J. A. (1952). The zoology of tapeworms. University of Minnesota Press, Minneapolis. 780pp..

YEH, L. -S. (1959). A revision of the nematode genus *Setaria* Viborg, 1795, its host-parasite relationship, speciation and evolution. Journal of Helminthology, 33: 1-98.

Helmintofauna do veado (*Cervus elaphus* L.) e do gamo (*Dama dama* L.) na Tapada Nacional de Mafra*

The Helminth Fauna of the red deer (*Cervus elaphus* L.) and fallow deer (*Dama dama* L.) in Tapada Nacional de Mafra

Maria João Maia

Centro de Ecologia Aplicada Prof. Baeta Neves
Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex, ceabn@ip.pt

Resumo: Apresenta-se um estudo realizado à helmintofauna das populações de veado e gamo existentes na Tapada Nacional de Mafra. Examinaram-se de Setembro 1992 a Março de 1993, o aparelho gastrointestinal de 12 veados e 13 gamos. Verificou-se a presença de quatro espécies de helmintes no veado (1 Trematoda – *Fasciola hepatica*, 1 Cestoda – *Cysticercus tenuicollis* e 2 Nematoda – *Oesophagostomum venulosum* e *Haemonchus contortus*) e as mesmas espécies no gamo excepto a última. *Fasciola hepatica* apresentou a prevalência de 33.4% dos veados e 15.4% dos gamos, *Cysticercus tenuicollis* em 8% quer dos veados quer dos gamos, *Oesophagostomum venulosum* em 25% dos veados e 15% dos gamos e *Haemonchus contortus* apenas em 8% dos veados.

Análises coprológicas realizadas a amostras de fezes de veado e gamo colhidas de forma indirecta no campo, demonstraram a existência de ovos de *Trichuris* sp., *Capillaria* sp. e *Strongyloides* sp com fraca eliminação (máximo 300 OPG).

Summary: In the present work samples of 12 wild red deer and 13 fallow deer sub-adult and adult males were collected over seven month period September 1992 until March 1993 and examined for helminths. One specie of Trematode and Cestode and two species of Nematode were found. *Fasciola hepatica* was recorded in 33.4% of the red deer and 15.4% of the fallow deer, *Cysticercus tenuicollis* in 8% of the red and fallow deer, *Oesophagostomum venulosum* in 25% of the red deer and 15% of the fallow deer and *Haemonchus contortus* only on red deer in 8%.

Coprologic analysis from fresh pellets randomly collected were done in order to identify other possible helminths eggs, showed the presence of *Trichuris* sp., *Capillaria* sp. and *Strongyloides* sp. at low worm egg counts (300e.p.g.).

Introdução

O estudo da helmintofauna de animais silvestres apresenta-se de uma particular relevância não só por provocar uma diminuição das funções vitais do hospedeiro mas também por causar a sua morte (Silva, 1971), e ainda por ser possível a sua transmissão a outros hospedeiros, tais como aos animais domésticos e o homem, alargando os efeitos económicos e sanitários (David & Andersen, 1973). Estes problemas revestem-se de maior importância a partir da

implementação da Lei da Caça de 1986, com o surgimento de zonas de caça maior em explorações agrícolas onde à actividade silvo-pastoril é adicionada a venatória conducentes a um maior rendimento dos sistemas agro-silvo-cinegéticos.

A helmintofauna dos cervídeos tem merecido pouca atenção e nenhum trabalho foi realizado até à morte de numerosos gamos na Tapada Nacional de Mafra, que conduziu ao primeiro estudo realizado por Barata (1987), seguido por Maia (1993) e Maia *et al.*, (1994/95). Nesta Tapada a população de gamos tem presença secular em simpatria com uma população de veados e outra de javalis (*Sus scrofa* L.). Nas últimas décadas, estas populações foram criadas com o objectivo de venda a particulares no sentido de (re)povoar outras zonas de caça (cerçadas) por todo o país. Não existindo experiência na produção destas espécies, muitas vezes os cervídeos são mantidos em áreas vedadas em sobredensidade, com outras espécies cinegéticas e por vezes domésticas, sendo por isso maior a probabilidade de infecção parasitária e consequentes perdas económicas.

Material e Métodos

Área de estudo

O presente estudo foi efectuado nos cervídeos da Zona de Caça Nacional – Tapada Nacional de Mafra com uma área de 800 ha, localizando-se a 30 km a Norte de Lisboa (38° 56'N, 9° 17'W). Em termos bioclimáticos encontra-se no bioclima Mediterrâneo Mesofítico Oceânico (Rivas-Martínez, 1994). O relevo é acentuado, variando entre 80 m e 358 m.

O efectivo estimado em 1992 indicou a presença de 90 veados (*Cervus elaphus* L.) e 270 gamos (*Dama dama* L.), o que corresponde a 0.5 cervídeos/ha, vivendo em simpatria com cerca de 90 javalis (*Sus scrofa* L.) (Borges, comunicação pessoal).

Procedeu-se à recolha dos helmintes nos animais abatidos na época de caça 1992/93, quer por análises coprológicas efectuadas aos mesmos e por colheita indirecta de fezes de forma aleatória na Tapada.

* Trabalho apresentado na 2ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Parasitologia, Porto, 1994.

Recolha directa

A recolha de helmintos foi efectuada pelas necrópsias efectuadas a 12 veados (11 machos jovens) e 13 gamos (9 machos adultos e quatro machos jovens), abatidos durante a época de caça 1992/93, organizada pela Direcção dos Serviços de Caça, Direcção-Geral das Florestas com início em Setembro de 1992, e termino em Março de 1993. As necrópsias, efectuadas segundo técnica de Petisca & Montano (1962), e a colheita directa de fezes, cerca de 1 hora *post-mortem*, foram realizadas no laboratório existente no local.

Após a decantação dos conteúdos dos diferentes órgãos e colheita dos helmintos, estes foram cuidadosamente limpos, e colocados em água no frigorífico durante 24 horas à temperatura de 4 °C, para morte em extensão. Posteriormente, foram colocados em frascos com álcool a 70°, para fixação e conservação.

As técnicas de preparação do material para posterior identificação das diferentes espécies seguiram a metodologia preconizada por Travassos Dias (1989).

Assim, para o estudo dos cestóides e trematódeos foi indispensável o uso de uma técnica de coloração na qual se utilizou o carmin alcoólico clorídrico a 1%, desidratado por uma série de álcoois e esclarecimento pelo salicilato de metilo. Em seguida foram montados em Bálsamo do Canadá.

Os nematóides foram montados entre lâmina e lamela e esclarecidos pelo lactofenol, para posterior identificação.

Colheita indirecta

A colheita indirecta de fezes aos cervídeos da Tapada decorreu entre os dias 6-12 de Outubro de 1992. Para tal, colheram-se fezes frescas aleatoriamente em diferentes zonas e altitudes da Tapada.

Com o material fecal de ambas as proveniências realizaram-se análises coprológicas qualitativas e quantitativas pelos métodos de Willis, de sedimentação espontânea e de McMaster.

Resultados

A distribuição das diferentes espécies parasitas pelos respectivos hospedeiros encontra-se indicada na figura 1, onde podemos observar que as espécies: *Fasciola hepatica*, *Cysticercus tenuicollis* e *Oesophagostomum venulosum* foram registados simultaneamente nas duas espécies de cervídeos em estudo e que *Haemonchus contortus* apenas foi registado no veado.

CLASSE	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	
		VEADO	GAMO
TREMATODA	<i>Fasciola hepatica</i>	X	X
CESTODA	<i>Cysticercus tenuicollis</i>	X	X
NEMATODA	<i>Oesophagostomum venulosum</i>	X	X
	<i>Haemonchus contortus</i>	X	-

Figura 1 - Espécies parasitas colhidas em veados e gamos na Tapada Nacional de Mafra.

Na figura 2 pode-se observar que a prevalência dos trematódeos e nematóides em relação a ambas as espécies em estudo foi superior para os veados independentemente da espécie de helmintos em causa e *F. hepatica* foi a espécie que maior percentagem apresentou (33.4%).

Nos veados a coexistência parasitária por *F. hepatica/O. venulosum*, apenas se verificou em 8.4% dos casos, o mesmo valor encontrado entre *F. hepatica/H. contortus/O. venulosum*.

A forma larvar de cestóide *Cysticercus tenuicollis* foi colhida no veado na pleura.

Verificou-se a presença de larvas pulmonares na traqueia de 50% dos veados abatidos. Não se encontraram estromgilídeos pulmonares.

A forma larvar de cestóide *Cysticercus tenuicollis* foi colhida no gamo no peritoneu.

Não se encontraram formas adultas de estromgilídeos pulmonares, independentemente de em 23% dos gamos observados, se terem encontrado larvas de estromgilídeos pulmonares, das quais, 15% presentes no exsudado da traqueia e as restantes no sedimento obtido após decantação pulmonar.

Nos restantes órgãos não se verificaram alterações dignas de registo.

Na figura 3 podem observar-se as relações entre a percentagem de animais infectados por *F. hepatica* e *O. venulosum*, lesões hepáticas e eliminação de ovos, *F. hepatica* e Estromgilídeos gastrintestinais (EGI).

O trematódeo *F. hepatica* foi detectado nas duas espécies de cervídeos, embora com maior prevalência (o dobro dos casos positivos) no veado (33.4%). Enquanto que a carga parasitária foi superior no gamo (27/4) com uma média de 14.5 espécimes/fígado, em relação ao veado (14/2) com uma média de 8 espécimes/fígado. Verificou-se maior percentagem de gamos com lesões hepáticas (77%, pela presença ou ausência de parasitas adultos), do que no veado em que as lesões observadas coincidiram com a presença de espécimes.

Animais analisados		<i>F. hepatica</i>			<i>H. contortus</i>			<i>O. venulosum</i>		
Espécie	Número	Positivos	%		Positivos	%		Positivos	%	
			a)	b)		a)	b)		a)	b)
Veado	12	4	33.4	16	1	8.4	4	3	25	12
Gamo	13	2	15.4	4	-	-	-	2	15.4	4

a) em relação ao total de cervídeos em estudo

b) em relação a cada espécie de cervídeo em estudo

Figura 2 - Prevalência de *F. hepatica*, *H. contortus* e *O. venulosum* nos veados e gamos.

Espécie	Animais infectados (%)		Lesões hepáticas (%)	Eliminação de ovos (%)	
	<i>F. hepatica</i>	<i>O. venulosum</i>		<i>F. hepatica</i>	<i>O. venulosum</i>
Veado	33.4	25	33.4	-	16.7
Gamo	15.4	15.4	77	15.4	7.7

Figura 3 - Relação entre a percentagem de animais infectados, lesões hepáticas e eliminação de ovos.

Coprologia

Nas fezes colhidas *post-mortem* no veado não se encontrou eliminação de ovos de *F. hepatica*, enquanto que no gamo todos os animais parasitados se encontravam a eliminar ovos.

A percentagem de animais de ambas as espécies que se encontravam a eliminar ovos de EGI foi inferior em relação à percentagem de animais infectados (Fig. 3).

Nos exames coprológicos provenientes da colheita indirecta de fezes de veado e gamo, encontraram-se ovos de strongilídeos gastrintestinais, *Trichuris sp.*, *Capillaria sp.*, e de *Strongyloide sp.*, com fraca eliminação (min. 100 OPG-máx. 300 OPG).

Discussão

Fasciola hepatica

A presença de *F. hepatica* foi pela primeira vez detectada no gamo em Portugal, na Tapada de Mafra por Barata (1987), com carga parasitária média de 130 espécimes e com a presença de lesões hepáticas em 99% dos fígados observados. De referir que a pesquisa anteriormente realizada realizou-se com o objectivo de conhecer as razões que conduziam à mortalidade e morbilidade da população de gamos existentes. Comparativamente ao estudo realizado há 5 anos, podemos afirmar que existiu um decréscimo de cerca de 20% ao nível das lesões hepáticas acompanhada por uma diminuição da carga parasitária média (de 130 para 14.5 espécimes/fígado). Para tal poderão ter contribuído os consecutivos anos de seca acompanhados pelos esforços de desparasitação indirecta e calagens consecutivas nas linhas de água como meio de combate ao hospedeiro intermediário.

No que respeita a esta espécie de Trematódeo, também foi presenciado no gamo em Espanha e Inglaterra por Alvarez *et al.*, (1975) e Chapman & Chapman (1975), respectivamente.

A incidência parasitária por *F. hepatica* no veado foi superior (o dobro) em relação ao gamo. Este valor talvez se fique a dever ao comportamento destes animais mediante as acções de desparasitação efectuadas. No entanto, não existe qualquer referência em Portugal até à elaboração do presente estudo.

No veado encontraram registos da espécie *F. hepatica* por Vos (1982) sendo causadora de grandes infecções na Alemanha e na América do Norte, Hall & Henshaw (1983) e Blaxter *et al.*, (1988) na Nova Zelândia e ainda Brelurut *et al.*, (1990) e Bonnet & Klein (1991) em França.

Oesophagostomum venulosum

Detectou-se em 25% dos veados infecção por *O. venulosum*, superior à verificada no gamo 15.4%. Os espécimes encontraram-se no cólon, em ambos os cervídeos.

Não se encontrou à data da realização do trabalho qualquer referência desta espécie nos referidos hospedeiros em Portugal, no entanto, a referida espécie parasita já foi referenciada no veado na Nova Zelândia por Blaxter *et al.*, (1988). No gamo apenas foi citada na Alemanha por Barth & Matzke (1984).

Haemonchus contortus

Esta espécie foi apenas encontrada no veado com uma prevalência de 8.4%, no cólon dos animais.

H. contortus foi também registado no veado por Bonnet & Klein (1991) em França, não tendo sido encontrada qualquer referência a esta espécie em ambos os hospedeiros, em Portugal até à data da realização do presente estudo.

Cysticercus tenuicollis

Duas formas larvares de cestóide, *Cysticercus tenuicollis* foram encontradas, uma no veado, localizada na pleura e outra no gamo, no peritoneu. Não se encontrou qualquer referência quer em Portugal quer noutros países.

Strongilídeos pulmonares

Não se detectou a presença de strongilídeos pulmonares, no entanto, encontraram-se larvas pulmonares, na traqueia de 50% dos veados e 23% dos gamos.

Não se encontrou qualquer referência destes parasitas em veados e gamos, quer em Portugal quer em outros países.

Quanto aos exames coprológicos provenientes da colheita indirecta de fezes de veado e gamo também Blaxter *et al.*, (1988) encontrou nos veados da Escócia ovos de strongilídeos gastrintestinais, *Strongyloide sp.*, *Haemonchus sp.*, e *Oesophagostomum sp.*, também com um máximo de eliminação (300 OPG).

Conclusões

Numa primeira abordagem ao conhecimento da helmintofauna do veado e gamo existentes na Tapada Nacional de Mafra, três espécies parasitas foram encontradas em ambos os hospedeiros, *Fasciola hepatica*, *Cysticercus tenuicollis*, *Oesophagostomum venulosum* e ainda *Haemonchus contortus* no veado, encontrando-se apenas a primeira referenciada para o

gamo em Portugal e na mesma Tapada. Verificou-se ainda a presença de larvas pulmonares na traqueia de ambos os hospedeiros, assim como fraca eliminação de ovos de *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Strongyloides* sp. e strongilídeos gastrintestinais.

Dado existir historial de perdas económicas provocadas pela infecção do trematódeo traduzidas na mortalidade e morbilidade causada à população de gamo nesta Tapada, é de importância primordial dar continuidade à monitorização da helmintofauna. A estes factos acresce dizer que da Tapada Nacional de Mafra partiram muitos cervídeos para outros locais do país com objectivos de (re)povoar zonas de caça, com todos os problemas de infecção de outras populações de espécies silvestres ou domésticas que possam coexistir.

Agradecimentos

Dra. Virgínia Crespo e Eng^a Ana Pereira da Escola Superior Agrária de Santarém. Eng^o Saramago e Dr. Faustino da Divisão de Caça da Direcção-Geral das Florestas. Aos Prof. Doutores Vitor Caeiro e Isabel Fazendeiro.

Bibliografia

- ALVAREZ, F., BRAZA, F. & NORZAGARAY, A. (1975). Ectograma cuantificado del gamo (*Dama dama*) en libertad. *Sep. Doñana Acta Vert.*, 2(1), 93-142.
- BARATA, M.C.S. (1987). Sobre a existência de *Fasciola hepatica* L., 1758, em animais silvestres da Tapada Nacional de Mafra: estudo preliminar. *Garcia de Orta, Série Zool.*, 14(2), 29-33.
- BARTH, D. & MATZKE, P. (1984). Gastro-intestinal nematodes of fallow deer (*Dama dama* L.) in Germany. *Vet. Parasitol.*, 16, 173-176.
- BLAXTER, K. KAY, R. SHARMAN, G. CUNNINGHAM, J. EADIE, J. e HAMILTON, W. (1988). Health and disease. In: *Farming the red deer*. The final report of an investigation by the Rowett Res. Inst. and the Hill Farming Resaearch Org. (Edinburg), 84-87.
- BONNET, G. & KLEIN, F. (1991). Le cerf élaphe: mortlité et pathologie. In: *Le cerf*. Hatier, Faune Sauvage (Paris, França), 20-25.
- BRELURUT, A., PINGARD, A. e THÉRIEZ, M., (1990). Pathologie du cerf d'élevage. In: *Le cerf et son élevage*. INRA (Paris, França), 90-109.
- CHAPMAN, D. e CHAPMAN, N. (1975). Mortality, Diseases and Parasites. In: *Fallow deer: their history, distribution and biology*. Lavenham Press Limited (Suffolk, U.K), 195-215.
- DAVIS, J. W. & ANDERSON, R.C. (1973). Enfermidades parasitárias dos mamíferos selvagens. Editores: Acribia Zarotoga. Fac. Vet. Univ. de Madrid, 1-42.
- HALL, M. & HENSHAW, J. (1983). Red deer. *Biologist* 30(1), 4-10.
- MAIA, M. (1993). *Contribuição para o estudo de algumas espécies de cervídeos (Cervus elaphus, Cervus canadensis e Dama dama) no Jardim Zoológico de Lisboa e Tapada Nacional de Mafra*. Trab. Fim curso de Prod. Animal. Esc. Sup. Agrária Santarém, 103-107.
- MAIA, M. VIÇOSA, M. SIMÕES, A. e CAEIRO, V. (1994/95). Endoparasitas da fauna silvestre raramente ou não assinalados em Portugal. *Acta Parasit. Port.*, 2(1/2), 23-25.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S. (1994). Classificación bioclimática de la tierra. *Folia Bot. Matriensis*, 12, 1-21.
- PETISCA, J. e MONTANO, A. (1962). *Técnica da necrópsia em medicina veterinária*. Livraria Luso-Espanhola (Lisboa, Portugal), 1-149.
- SILVA, J. (1971). *Contribuição para o estudo dos helmintes parasitas dos vertebrados de Moçambique*. Mens. Junta Inv. Ultra. 2^a Série 61, 1-479.
- TRAVASSOS-DIAS, J.A. (1989). *Manual de colheitas e de técnicas parasitológicas elementares a praticar nas regiões tropicais*. IICT comunicações, 1-123.
- VOS, A. (1982). Diseases and Parasitism. In: *Deer farming. Guidelines on practical aspects*. FAO (Roma), 28-31.

Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999)

Mycological quality evaluation of bovine feedstuffs (Portugal: 1996 - 1999)

H. M. Martins, M. L. Martins

Lab. Nacional de Investigação Veterinária, Serviço de Micologia - Estrada de Benfica, 701 1549-011 Lisboa Portugal
Email: marina.martins@Iniv.min-agricultura.pt

Resumo: Durante quatro anos (1996-1999), efectuaram-se 189 análises micológicas a rações para bovinos, sendo 143 rações farinadas e 46 granuladas. A pesquisa, quantificação e identificação dos agentes fúngicos foram efectuadas por métodos microbiológicos convencionais oficialmente estabelecidos.

Todas as rações farinadas revelaram contaminações fúngicas, o mesmo acontecendo com 12 das granuladas ($n+ = 155$) (82,2%).

O teor micológico médio (M) foi de $6,6 \times 10^4$ /g, oscilando entre $5,8 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^5$ ufc/g. Foram encontradas leveduras em 78,1% das amostras positivas ($M= 4,1 \times 10^4$ /g). Os bolores de maior prevalência pertenciam aos géneros *Aspergillus* (91,0%) ($M=1,3 \times 10^4$ /g), *Penicillium* (58,0%) ($M=6,4 \times 10^2$ /g), *Mucor* (52,3%) ($M=8,3 \times 10^4$ /g), *Phoma* (31,6%) ($M=1,2 \times 10^4$ /g), *Absidia* (30,3%) ($M=1,6 \times 10^2$ /g) e *Fusarium* (20,0%) ($M=4,4 \times 10^3$ /g). *Asp. flavus* foi detectado em 42 amostras (27,0%), apresentando teores entre 10^2 a 10^3 ufc/g. Estes resultados correspondem, em termos gerais a um ligeiro decréscimo da frequência e do teor das contaminações fúngicas nos alimentos compostos para bovinos relativamente ao registado nas duas últimas décadas, em Portugal.

Summary: During four years (1996-1999), 189 bovine feedstuffs (143 meal feed and 46 granulated), were analysed for mycoflora evaluation. The fungal quantification and identification were performed using microbiological conventional methods. Twelve granulated and all samples of meal feed revealed fungal contaminations ($n+ = 155$) (82,2%). The average of fungal contamination was $6,6 \times 10^4$ /g, ranging from $5,8 \times 10^2$ to $1,7 \times 10^5$ cfu/g. Yeasts were found in 78,1% of positive samples ($M= 4,1 \times 10^4$ /g).

Most prevalent mould genera were: *Aspergillus* (91,0%) ($M=1,3 \times 10^4$ /g), *Penicillium* (58,0%) ($M=6,4 \times 10^2$ /g), *Mucor* (52,3%) ($M=8,3 \times 10^4$ /g), *Phoma* (31,6%) ($M=1,2 \times 10^4$ /g), *Absidia* (30,3%) ($M=1,6 \times 10^2$ /g) and *Fusarium* (20,0%) ($M=4,4 \times 10^3$ /g). *Asp. flavus* was found in 42 samples (27,0%), with levels ranging from 10^2 to 10^3 cfu/g.

These results might suggest an increase of mycological quality of feedstuffs for bovine, compared with the results found on the last 20 years, in Portugal.

Introdução

A qualidade das forragens, dos cereais e das proteaginosas é fundamental para garantir uma adequada produtividade dos animais produzidos quer

em regime extensivo quer intensivo. Estes alimentos são predominantemente colonizados por microfloras esporuladas, bacterianas e fúngicas. Neles instalam-se sucessivas vagas de populações fúngicas características das contaminações de campo, da transformação e do armazenamento. Estes germes são responsáveis pela degradação dos nutrientes e por alterações nas características organolépticas destas matérias primas (Quinta, 1978).

A micoflora de campo instala-se nos cereais e proteaginosas durante o período do desenvolvimento vegetativo das plantas, sendo predominantemente constituída por leveduras e bolores telúricos e fitofílicos, cujos géneros mais representativos são: *Phychia*, *Torulopsis*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Thamnidium*, *Verticillium*, *Phoma* e *Penicillium*.

A colheita, o transporte e a transformação (desidratação, exposição solar, tratamentos térmicos e/ou químicos) limitam bastante a sobrevivência das micofloras originais, sobrevivendo alguns esporos e introduzindo outros agentes com maior xerofilia; as contaminações anemófilas também têm um peso considerável nesta segunda vaga fúngica: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Wallemia*, *Monascus*, *Scopulariopsis* (flora de transformação).

O armazenamento propicia também, através do efeito designado por «suor dos contentores» a multiplicação e supremacia de outros géneros fúngicos: *Mucorales* (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*), *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhodotorula* e *Candida* (flora de armazenamento).

Nas matérias primas ou numa ração de boa qualidade microbiológica não devem existir mais de 10^5 ufc de fungos / g. Com teores acima de $10^{7,5}$ ufc / g, estes alimentos cheiram a bafio (mofo), são organolépticamente anormais e sobretudo representam um perigo potencial para a saúde dos animais por poderem conter substâncias zootóxicas (Smith, 1985). Os cheiros e sabores anormais podem afectar o nível de aceitalidade das rações por parte dos animais e influenciar, assim, negativamente a produtividade das explorações.

O desenvolvimento das populações fúngicas instaladas nestes alimentos conduzem inexoravelmente a

um estado de corrupção, que será atingido logo que as populações microbianas alcancem teores totais da ordem dos $10^{7.5}$ ufc / g.

Em Portugal são sistematicamente controlados os teores micológicos das matérias primas para rações e dos produtos acabados, estando publicados alguns desses resultados (Martins, 1987; Martins *et al*, 1999). Trabalhos publicados na década de 80 por Martins (1987), indicavam teores médios da ordem dos $8,6 \times 10^4$ ufc/g, em 109 amostras de rações de bovinos. Nesse estudo era patente uma significativa variabilidade sazonal; os teores mais elevados registaram-se sistematicamente nos meses do fim do Inverno e Primavera. Quanto aos géneros fúngicos de maior relevância higio-sanitária verificou-se que *Penicillia* estava presente em mais de 80% das rações; 16% das quais tinham teores superiores a 5×10^3 *Penicillia* /g. O grupo de fungos referidos como os de segunda maior frequência foi *Mucorales*, presentes em 73% das rações, quase todas com teores inferiores a 5×10^3 *Mucorales* /g (91%). Quanto às outras espécies com alguma importância higio-sanitária verificou-se que *Asp. flavus*, agente potencialmente toxígeno, tinha uma repartição anual regular, estando presente em 53% das rações. Teores superiores a 5×10^3 *Asp. flavus*/ g apenas foram encontrados em 12% das rações. *Fusarium spp.* foi detectado em 41% das rações, mas cerca de 17% tinham teores superiores a 5×10^3 /g.

Neste trabalho procurou-se caracterizar o actual panorama das contaminações fúngicas que se registam nas rações para bovinos, atendendo às mutações entretanto operadas no comércio destes produtos e às alterações resultantes da interdição da incorporação de farinhas de origem animal.

Material e Métodos

Amostragem

Durante quatro anos, período de Janeiro de 1996 a Dezembro de 1999, 189 amostras de alimentos compostos para bovinos, foram submetidas a controlo micológico, sendo 143 rações farinadas e 46 granuladas. Estas rações pertenciam a diversas explorações espalhadas por todo o País.

Para efeitos de transporte, as amostras foram acondicionadas assepticamente em sacos de plástico esterilizados e mantidos ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

Metodologia

Foram pesados assepticamente 10 g de cada amostra e adicionados 90 ml de Triptona sal (OXOID CM 87). As amostras foram homogeneizadas por agitação durante 5 minutos. Efectuaram-se diluições decimais a partir da suspensão-mãe. De cada diluição semeou-se 1 ml, por espalhamento à superfície de uma gelose de Rosa de Bengala com Cloranfenicol (OXOID CM. 549), em duas séries de 5 caixas de Petri de 12 cm Ø. As caixas foram incubadas a 25°C durante 5 dias (NP -3277-1, 1987)

Para efeitos de contagem, os géneros fúngicos foram agrupados com base nas características morfológicas das colónias, para efeitos de contagem.

A identificação das espécies foi efectuada com base na macro e na micromorfologia com recurso a chaves dicotómicas (Rapper *et al* 1949 ; Both 1977 e Onions *et al* 1981).

Resultados e Discussão

Verificou-se que todas as rações farinadas apresentavam contaminações fúngicas, enquanto nas granuladas a frequência de amostras positivas foi de apenas 26,1%. Globalmente obteve-se uma positividade de 82,0 % ($n^+ = 155$) (Quadro 1).

Em 1997 e 1999 a frequência anual de contaminação fúngica foi mais elevada do que nos outros anos, 97,3 % e 91,8 % respectivamente, embora se deva tomar em consideração o facto de o número de amostras analisadas, 1988, ter sido ser muito reduzido, sendo as mesmas granuladas (Quadro 2).

O teor micológico médio (M) foi de $6,6 \times 10^4$ /g, oscilando entre $5,8 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^5$ ufc/g (Quadro 3).

Os bolores de maior prevalência pertenciam aos géneros *Penicillium* (58,0) (M= $6,4 \times 10^3$ /g), *Mucor* (52,3%) (M= $8,3 \times 10^3$ /g), *Phoma* (31,6%) (M= $1,2 \times 10^4$ /g), *Absidia* (30,3%) (M= $1,6 \times 10^2$ /g), *Aspergillus* (91,0%) (M= $1,3 \times 10^4$ /g) e *Fusarium* (20,0%) (M= $4,4 \times 10^3$ /g). *Asp. flavus* foi detectado em 42 amostras (27,0%), apresentando teores entre 10^2 a 10^3 ufc/g (Quadro 4)

Os níveis de contaminação fúngica anual em ufc / g nas rações para bovinos, está representado no Quadro 4 por grupos fúngicos. Em rastreios semelhantes ao deste trabalho, realizados por Abdel-Fattah *et al.* (1982), registaram-se como agentes fúngicos predominantes: *Aspergillus* (*Asp. niger* e *Asp. flavus*),

Quadro 1 - Número e frequência de amostras positivas em função da respectiva apresentação comerci-

	Farinadas		Granuladas		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Positivas	143	(100,0)	12	(26,1)	155	(82,0)
Negativas	0	(0)	34	(73,9)	34	(18,0)
Total	143	(75,7)	46	(24,3)	189	(100,0)

Quadro 2 - Distribuição anual dos teores micológicos totais nas amostras positivas (cfu/g)

ufc/g	1996	1997	1998	1999	TOTAL
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n
<10 ³	15 (60,0)	33 (89,1)	3 (100,0)	59 (65,5)	110 (71,0)
10 ⁶ < n < 10 ³	10(40,0)	3 (8,1)	0	28(31,1)	41 (26,4)
>10 ⁶	0 (0)	1 (2,7)	0	3(3,3)	4 (2,6)
TOTAL	25 (65,7)	37 (97,3)	3 (20,0)	90 (91,8)	155 (82,0)

Quadro 3 - Média do teor dos diferentes grupos de fungos detectados (Log 10 ufc/g)

FUNGOS	Média Log10 ufc/g
Leveduras	4,6
<i>Asp flavus</i>	2,23
<i>Aspergillus spp.</i>	4,16
<i>Fusarium spp.</i>	3,64
<i>Penicillium spp.</i>	2,89
<i>Mucor spp.</i>	4,27
<i>Absidia spp.</i>	2,33
<i>Rhizopus spp.</i>	3,25
<i>Cladosporium spp.</i>	2,13
<i>Phoma spp</i>	4,1
<i>Paecilomyces spp.</i>	1,56
Teor médio	4,8

Quadro 4 - Distribuição dos géneros fúngicos pelas rações contaminadas (1996/1999)

Fungos	1996	1997	1998	1999	TOTAL
	n+/N (%)	n+/N (%)	n+/N (%)	n+/N (%)	n+/N (%)
Leveduras	24/38 (96,0)	27/38 (73,0)	3/15 (100,0)	67/98 (74,4)	121/189 (78,1)
<i>Asp flavus</i>	10/38 (40,0)	6/38 (16,2)	0 / 15	26/98 (28,8)	42/189 (27,0)
<i>Aspergillus spp</i> ^(*)	22/38 (88,0)	32/38 (86,5)	3/15 (100,0)	84/98 (93,3)	141/189 (91,0)
<i>Fusarium spp.</i>	4/38 (16,0)	3 /38 (8,10)	0 / 15	24/98 (26,6)	31/189 (20,0)
<i>Penicillium spp.</i>	14/38 (56,0)	20/38 (54,0)	3/15 (100,0)	53/98 (58,8)	90/189 (58,0)
<i>Mucor spp.</i>	13/38 (52,0)	17/38 (46,0)	2/15 (66,6)	49/98 (54,4)	81/189 (52,3)
<i>Absidia spp.</i>	5/38 (20,0)	9/38 (24,3)	1/15 (33,3)	32/98 (35,5)	47/189 (30,3)
<i>Rhizopus spp.</i>	5/38 (20,0)	0/38	0 /15	0/98	5 /189 (3,2)
<i>Cladosporium spp.</i>	1/38 (4,0)	9/38 (24,3)	0 /15	6 /98 (6,6)	16/189 (10,3)
<i>Phoma spp.</i>	6/38 (24,0)	9/38 (24,3)	1/15 (33,3)	33/98 (36,6)	49/189 (31,6)
<i>Paecilomyces spp.</i>	4/38 (16,0)	4/38 (10,8)	1/15 (33,3)	13 /98 (14,4)	22/189 (14,2)
Total	25/38 (65,7)	37/38 (97,3)	3/15 (20,0)	90/98 (91,8)	155/189 (82,0)

(*) com excepção de *Asp. flavus*

Penicillium, *Mucorales*, *Alternaria* e com menor incidência do género *Fusarium* e *Cladosporium*.

Abramson *et al.* (1983) verificaram que em 51 amostras de alimentos compostos para bovinos, associados à suspeita de micotoxicoses, predominaram sobretudo *Penicillium* e *Aspergillus*. Nessas mesmas amostras estes autores referem a ocorrência de ocratoxina A (4 amostras), toxina T2 e diacetoxiscir-

penol (2 amostras) e esterigmatocistina (1 amostra).

Em Espanha, Sanchis *et al.* (1986), verificaram uma prevalência de 100% de contaminações fúngicas de 100%, em 288 rações, sendo *A. flavus* o bolor encontrado com maior frequência (54.5%). Referem também, que só 17.2% de estirpes de *A. flavus* manifestavam capacidade genética para produzir aflatoxinas.

As amostras a que o presente estudo se refere revelaram contaminações com aflatoxina B1 em 53% das mesmas amostras de rações (Martins e Martins, 2000).

Os indicadores da frequência e teores micológicos obtidos neste trabalho são substancialmente inferiores aos obtidos na África do Sul por Dutton e Kinsey (1995), nos quais o género *Fusarium* é apontado como fungo dominante (>70%), com teores médios da ordem de 10^6 ufc/g.

Noutro trabalho, Martins (1987) encontrou *A. flavus* em 69.0% e 42.6%, *Penicillium* 82.0% e 50.0%, *Fusarium* 66.0% e 30.0%, e *Mucorales* 80.0% e 40.0% respectivamente em 1103 amostras de rações e 303 materias-primas. Em 1989, Martins (1989) tinha verificado que as contaminações naturais em alimentos compostos para animais e matérias-primas por *Ascomycetes* tinham frequências ligeiramente superiores: *Asp. flavus* (40,0%), *Penicillium* (67,0%), *Fusarium* (42,0%) e *Mucorales* (30,0%).

Estes resultados deixam perspectivar uma evolução qualitativa positiva no que concerne aos teores micológicos dos alimentos compostos para bovinos, tendo como referência estudos realizados anteriormente em Portugal (Martins,1987; Martins 1989).

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração dos técnicos Anabela Ramos e Cândida Camejo

Bibliografia

- ABDEL-FATTAH,H.M., KAMEL,Y.Y., MEGALLA, S.E., & HAFEZ,A.,H. (1982). aflatoxin and aflatoxicosis. I. Fungal flora of some food and animal feed with special references to aflatoxin-producing abilities. *Mycopathol.* 19;77(3):129-135.
- ABRAMSON,D., MILS,J.T., & BOYCOTT,B.R.(1983). Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in western Canada. *Can.J. Comp.Med.* 47(1): 23-26.
- BOOTH, C. (1871). The genus *Fusarium* .Ed. by Commonwealth Mycological Institute.U.K. pp 307
- DUTTON,M.F. & KINSEY,A. (1995). Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa ,1994. *Mycopathol.* 131:31-36.
- MARTINS, H. M., (1987). Relatório de Actividades. Prova de concurso para a Categoria de Assistente de Investigação. L. N. I. V. Lisboa- Portugal, pp-
- MARTINS,M. L.(1989). Ocorrência de micotoxinas em materias primas e alimentos compostos para animais. Compostos para animais. Situação actual em portugal. *Rep. Trab. LNI*.,XXI, 123-132.
- MARTINS,M. L. (1989). Capacidade de produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* em substratos naturais. *Rep. Trab. LNI*.,XXI, 123-132.
- MARTINS. M. L., BERNARDO F.M. , & MARTINS H. M., (1999) Moulds and Aflatoxins Contaminations in Swine Feeds (Portugal). 26 th Word Veterinary Congress: WVA. Lyon, França.
- MARTINS,M. L & MARTINS,H.M.(2000). Aflatoxinas em Rações para bovinos *Rev Port. de Zootecnia* (in press).
- NORMA PORTUGUESA NP 3277 - 1(1987). Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras .Parte 1 : Incubação a 25 °C.
- ONIONS, A. H. S., D. ALLSOPP, & H.O. EGGINS. (1981) Smith 's Introduction to Industrial Mycology. 7th edtion Ed by Edward Arnold.,London, Great Britain , pp 398
- QUINTA,M. L. (1982). Contribuição para o Estudo de Fungos Contaminantes dos Alimentos, Publicações do L N E T I, DCEAI, 92, ET- 10 ,Lisboa . Portugal,pp-77
- RAPER, K. B. & FENNELL, D.I. (1965). The Genus *Aspergillus*, Vol I, II e III. Ed. The Williams e Wilkins, Baltimore. USA. pp- 704
- SANCHIS, V., SALA, N., PALOMES, A., SANTAMARINA, P. & BURDASPAL,P.A (1986). Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in foods and feed in Spain. *J. of Food Protec.*, 49, 445-448.
- SMITH, J. & MAURICE MOSS. (1985). Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance. Ed by John Wiley & Sons. USA. pp – 148.

Um caso de dermatofilose em bovino

A case of dermatophilosis in cattle

Maria do Carmo Topa, Karen Iseensee, Gertrude Thompson

Departamento de Clínicas Veterinárias - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar - Largo Prof. Abel Salazar, 2 - 4099-003 Porto

Resumo: O presente artigo descreve uma afecção cutânea num bovino, caracterizada por lesões crostosas localizadas nas paredes ventrais do tórax e abdómen, flancos, membros, pescoço e cabeça; a condição foi diagnosticada como dermatofilose (i. e., infecção causada pela bactéria actinomiceta *Dermatophilus congolensis*). Tanto quanto nos foi possível averiguar, a condição é rara em Portugal e poderá eventualmente ser o primeiro caso descrito em bovinos no nosso país. O artigo faz a descrição do caso clínico assim como os métodos de diagnóstico e tratamento. São ainda incluídos registos fotográficos do caso.

Summary: This article describes a skin condition in cattle, associated with crusted lesions located on the thoracic and abdominal ventral surface, flanks, limbs, neck and head; this condition was diagnosed as dermatophilosis (e. g., infection with the actinomycete *Dermatophilus congolensis*). To the authors knowledge, this is a rare condition in Portugal, if not the first case described in cattle. A clinical description of the case, diagnosis and treatment are discussed. Several photographs are included to illustrate the case.

Introdução

O *Dermatophilus congolensis* (Van Saceghan, 1915) é uma bactéria actinomiceta Gram positiva com um ciclo de vida multifásico e que produz filamentos ramificados. Sob determinadas condições, o *Dermatophilus congolensis* pode provocar infecção cutânea num grande número de espécies animais, incluindo bovinos, pequenos ruminantes, ruminantes selvagens, cavalos, e mais raramente no cão, gato, porco e primatas humanos e não humanos. A infecção caracteriza-se por uma dermatite crostosa superficial e é conhecida pelo nome de dermatofilose ou estreptotricose (Jones *et al.*, 1997).

A doença tem uma distribuição quase mundial e embora se possa tornar endémica em áreas tropicais ou subtropicais com uma estação chuvosa prolongada, a sua ocorrência em climas secos é descrita como esporádica ou rara (Scott *et al.*, 1995; Zaria, 1996; Jones *et al.*, 1997).

As lesões tendem a desenvolver-se após o comprometimento da integridade da epiderme, causada por traumatismo, maceração da pele ou pêlo, ectoparasitas, inflamação ou infecção, permitindo a penetração da mesma por zoosporos infectantes; deste modo, o organismo é usualmente considerado um invasor secundário (Carlton & McGavin, 1995; Scott *et al.*, 1995).

Embora as lesões de dermatofilose possam atingir qualquer região da pele, nos bovinos, iniciam-se usualmente ao longo da linha média dorsal, estendendo-se lateralmente para os flancos, parede torácica, ombros e pescoço. As lesões características bem desenvolvidas consistem em crostas elevadas, arredondadas, espessas, laminadas e de coloração cinzento-acastanhada, que são penetradas por tufo de pêlos aglomerados (Yager *et al.*, 1993).

Caso Clínico

O caso clínico por nós observado foi detectado num bovino, fêmea, de raça Holstein Friesen, com 2.5 anos de idade e gestante de 8 meses. O animal pertencia a uma exploração leiteira localizada em Famalicão e fazia parte de um grupo de dez animais recentemente introduzidos na exploração (há cerca de 1 mês) provenientes da Holanda. Todos os restantes animais se encontravam saudáveis.

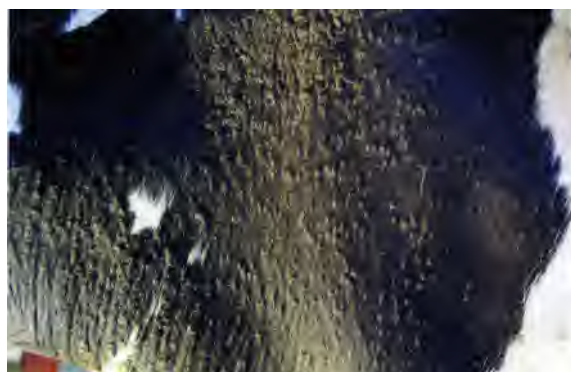
O motivo da consulta prendia-se com a presença de lesões dermatológicas crostosas, não pruríticas, que se iniciaram na região ventral do corpo e face interna dos membros anteriores e posteriores. Este tipo de lesões foram observadas pelo proprietário na altura em que o animal lhe foi entregue, tendo-se depois alastrado para a região ventral do pescoço, cabeça e porções laterais do tórax, abdómen e membros. O animal isolava-se do restante efectivo, apresentando apetite diminuído e apatia.

No exame físico, foi possível confirmar a apatia relatada pelo proprietário. O animal apresentava uma temperatura rectal de 40,5 °C, taquipneia, taquicardia, tempo de repleção capilar normal e mucosas brilhantes e rosadas. O estado de hidratação foi considerado normal. O animal apresentava tremores e eriçamento do pêlo. A avaliação do aparelho gastrointestinal e o exame rectal não revelaram qualquer anomalia. Não foram observados indícios de mastite, claudicação ou outros sinais indicadores de doença.

A inspecção das lesões cutâneas revelou a presença de crostas elevadas, espessas e confluentes, de coloração acastanhada. Quando sujeitas a tracção, as crostas desprendiam-se, deixando uma superfície rosada ou áreas cobertas de pus. As crostas apresentavam superfície inferior côncava, sendo atravessadas por tufo de pêlos que lhes conferiam o aspecto

de «paintbrush» (Figuras 1-4). Estas lesões foram consideradas sugestivas do envolvimento de *Derma - tophilus congolensis*.

O diagnóstico foi definitivamente emitido após exame citológico realizado a partir da impressão de crostas colhidas na altura da consulta. No mesmo dia foi instituído o tratamento, consistindo em penicilina numa dosagem de 22000 U/kg de 12 em 12 horas durante três dias, passando a uma dose diária por mais dois dias. O animal revelou uma evolução positiva do quadro clínico dermatológico, segundo relatos do proprietário. Desconhecemos o período total em que ocorreu remissão das lesões, dado que o animal não voltou a ser por nós observado. Contactado o pro-



Figuras 1-3 - Infecção por *Dermatophilus congolensis* - aspecto das lesões cutâneas sob a forma de crostas elevadas e confluentes. Embora a localização mais característica das lesões nos bovinos seja ao longo da linha média dorsal, podendo estender-se para os flancos e porções laterais do animal, no caso descrito, as lesões tinham predominantemente localização ventral.



Figura 4 - Aspecto mais detalhado das crostas típicas, individualizadas nesta imagem, da infecção por *Dermatophilus congolensis* - crostas espessas, de coloração acastanhada, superfície inferior côncava e atravessadas por tufos de pêlos («paintbrush»).

prietário, não conhecemos, até à data, outros casos de doença na mesma exploração, onde o animal foi mantido.

Material e Métodos

Foram colhidas amostras das lesões crostosas localizadas em diversas regiões do corpo do animal e realizado o exame citológico de preparações obtidas por impressão directa da face inferior das crostas humedecidas em solução salina estéril. As preparações foram coradas com coloração comercial hematológica de rotina (Diff-Quik).

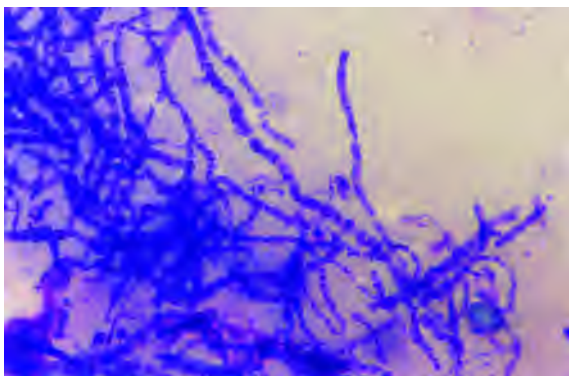
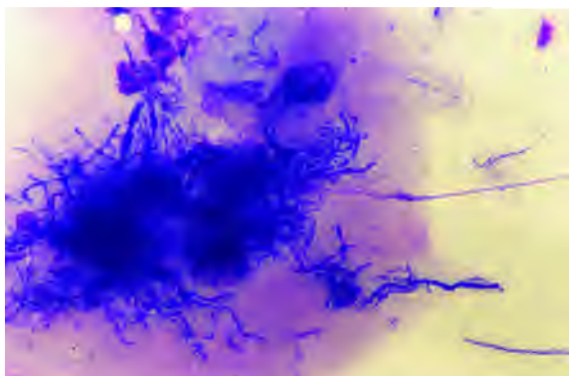
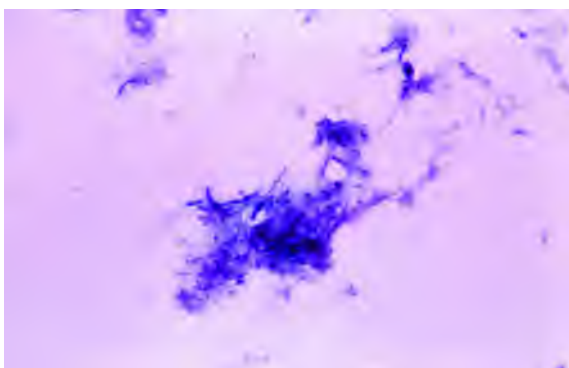
Para isolamento bacteriológico, parte da amostra colhida foi macerada em solução salina estéril. Procedeu-se depois à inoculação com ansa do fluido superficial do macerado em meio Agar Sangue (Columbia + 5% sangue de carneiro, bioMérieux) e Agar Sabouraud (DIFCO). As placas inoculadas foram incubadas em aerobiose e em atmosfera com 10% de CO₂ a 37 °C durante 72 horas. Foram realizados esfregaços a partir das colónias características obtidas em cultura no meio de Agar Sangue os quais foram corados pelo método de GRAM (DIFCO).

Resultados

A observação microscópica das preparações citológicas demonstrou presença de um grande número de organismos sob a forma de estruturas filamentosas, por vezes ramificadas, de coloração basofílica, misturadas com células epiteliais maduras, detritos, material queratinizado e alguns neutrófilos. Em grande ampliação, verificou-se que os filamentos apresentavam o padrão característico em «trilho de comboio» («railroad tracks»), formado por cadeias paralelas de estruturas cocoides com 0.5-1.0 mm de diâmetro. Estes achados foram considerados diagnósticos da infecção por *Dermatophilus congolensis* (Figuras 5-7).

Em relação aos resultados microbiológicos, observou-se, em ambas as condições de cultura, o desenvolvimento de colónias com cerca de 2-3 mm de diâmetro, de aspecto rugoso, seco e de coloração amarelada firmemente aderidas e embebidas no meio, demonstrando actividade hemolítica (Figura 8). Não se verificou desenvolvimento bacteriano em Agar Sabouraud.

Esfregaços realizados a partir das colónias obtidas por cultura demonstraram bactérias Gram positivas com formas predominantemente cocoides.



Figuras 5-7 - Infecção por *Dermatophilus congolensis* – sucessivas ampliações do microorganismo numa preparação citológica obtida por impressão directa da face inferior de uma crosta - notar as cadeias ramificadas de estruturas cocoides (zoosporos) com o aspecto característico de «railroad tracks», típico de *Dermatophilus congolensis*. Diff-Quik, x400; x500; x1250.



Figura 8 - Aspecto das colónias de *Dermatophilus congolensis* obtidas em agar sangue - notar o halo de hemólise e as colónias com aspecto rugoso, seco, amarelo-douradas e firmemente embebidas no meio de cultura.

Discussão

O *Dermatophilus congolensis* é um microorganismo altamente proteolítico e geralmente produtor de urease (Cottral, 1978). A sua actividade proteolítica é considerada importante na patogénese da doença, embora os seus factores de virulência não estejam ainda caracterizados (Ambrose *et al.*, 1998).

A capacidade de sobrevivência do *Dermatophilus congolensis* no ambiente é bastante limitada. A principal fonte de transmissão da doença é provavelmente representada pelos animais infectados que incluem, além dos que apresentam manifestações clínicas, os portadores saudáveis e animais aparentemente recuperados, apontados como responsáveis pela perpetuação da doença nas explorações de uma estação a outra (Bida & Dennis, 1977; Yager *et al.*, 1993). O microorganismo é capaz de sobreviver durante vários meses ou anos no exsudado seco de lesões cutâneas, resistindo à desidratação e temperaturas extremas sob a forma de esporos latentes (zoosporos), activados em condições favoráveis de humidade e temperatura (Scott *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997). Em áreas endémicas, mais de 50% dos bovinos aparentemente saudáveis podem ser portadores da bactéria (Yager *et al.*, 1993).

A epiderme íntegra não parece susceptível à infecção pelo *Dermatophilus congolensis*, a qual está condicionada a uma fragilização da barreira protectora da epiderme (Oduye, 1975; Yager *et al.*, 1993). Os dois factores predisponentes mais importantes na patogenia são representados pelo humedecimento prolongado e lesão mecânica da pele (lesões provocadas por ectoparasitas e/ou insectos, feridas de tosquia, arranhões causados por vegetação grosseira, etc.). Embora a humidade por si só não seja suficiente para desencadear lesões num animal infectado, a saturação profunda da pele afecta a integridade do estrato córneo, provocando tumefacção e destacamento das células, e altera a película sebácea protectora, exercendo um efeito de lavagem ou arrastamento da mesma. Por outro lado, a humidade proporciona condições favoráveis à activação de es-

poros latentes e ao seu transporte para outras áreas da pele que, se traumatizadas, poderão constituir sede para nova colonização bacteriana. Este tipo de efeitos justifica a ocorrência de surtos de dermatofilose em manadas de bovinos sujeitas a banhos de jacto de alta pressão e em ovinos sujeitos a banhos de imersão após tosquia. Um clima excessivamente húmido, com quedas de chuva ou orvalho intensas e/ou prolongadas, pode exercer efeitos semelhantes. Para além disso, o clima exerce uma acção indirecta ao proporcionar condições favoráveis ao aumento das populações de ectoparasitas e insectos; estes, além de constituírem importantes factores de traumatismo cutâneo, são frequentemente vectores do agente, representando um importante meio de transmissão e disseminação dos zoosporos (Yager *et al.*, 1993).

Depois de vencidas as defesas epidérmicas e da germinação dos zoosporos móveis, o microorganismo inicia a invasão da epiderme e bainha externa dos folículos pilosos, onde prolifera, normalmente sem extensão à membrana basal. Desta proliferação resulta a formação de estruturas micelares filamentosas e ramificadas Gram positivas, que se subdividem em sentido longitudinal e transversal para originar cadeias de pequenos esporos cocoides. As células dos epitélios infectados sofrem uma queratinização prematura, causando lesões de hiperqueratose; concomitantemente, ocorre uma resposta inflamatória aguda caracterizada por edema dérmico superficial e infiltração por neutrófilos, com formação de microabscessos na epiderme superficial e bainha externa dos folículos. Esta resposta inflamatória é responsável pela localização da infecção a estruturas superficiais, impedindo a sua penetração profunda. O estabelecimento de uma resposta regenerativa cerca de 24 horas após infecção, com hiperplasia reactiva dos epitélios afectados, produz novas células, que são invadidas por zoosporos móveis, iniciando um novo ciclo de crescimento bacteriano, inflamação e regeneração epitelial. A repetição destes eventos resulta na formação de crostas espessas, elevadas, constituídas por camadas alternadas de hiperqueratose paraqueratótica e ortoqueratótica, com bandas de neutrófilos degenerados (Yager *et al.*, 1993; Carlton & McGavin, 1995; Jones *et al.*, 1997).

A lesão inicial consiste numa pápula pequena, muitas vezes só detectável por palpação; a ocorrência de exsudação serosa envolvendo grupos de pêlos causa a sua aglomeração em tufos erectos. Em condições de humidade e temperatura desfavoráveis ao desenvolvimento do microorganismo, as lesões poderão não progredir, mas em ambientes quentes e húmidos, o desenvolvimento e coalescência de novas lesões pode causar o envolvimento de grandes porções da pele. As lesões bem desenvolvidas características consistem em crostas elevadas, arredondadas, espessas, laminadas e de coloração cinzento-acastanhada, que são penetradas por tufos de pêlos aglomerados; este último aspecto é responsável pela denominação inglesa de «paintbrush». O destacamento forçado destas crostas, relativamente fácil em lesões recentes, provoca o arrancamento conjunto

dos pêlos e revela uma superfície inferior côncava, deixando a descoberto a epiderme húmida e eritematosa, ulcerada e sangrante ou coberta por escamas e com superfície granular em lesões mais antigas. Dado que os folículos pilosos não são geralmente destruídos, ocorre novo crescimento de pêlos (Yager *et al.*, 1993).

As infecções por *Dermatophilus congolensis* elicitam uma resposta serológica variável, que parece depender da gravidade da infecção. A presença de anticorpos detectáveis foi demonstrada em animais natural e experimentalmente infectados (Pulliam *et al.*, 1967; Richard *et al.*, 1976). Desconhece-se, no entanto, se esta reactividade serológica confere um aumento da resistência a re-infecções. Vacinações experimentais em bovinos Zebu evidenciaram a obtenção de um certo grau de protecção vacinal (Provest *et al.*, 1976).

Conclusão

Apesar de constituir uma condição raramente observada em Portugal, o quadro clínico observado no caso que acabámos de descrever, claramente dominado por lesões dermatológicas crostosas típicas, em conjunto com o exame citológico da face inferior das referidas lesões que permitiu a identificação dos microorganismos de morfologia tão característica, tornaram acessível a suspeita e confirmação do diagnóstico de dermatofilose. De acordo com a bibliografia, estes achados são suficientes para o diagnóstico da condição (Scott *et al.*, 1995; Tyler *et al.*, 1999). O exame microbiológico posterior permitiu a identificação inequívoca do agente envolvido no processo, a bactéria actinomiceta Gram positiva denominada *Dermatophilus congolensis*.

Desconhecendo com exactidão o ambiente prévio a que o animal esteve sujeito, torna-se impossível avançar com explicações concretas para a ocorrência desta infecção e posterior desenvolvimento da doença, embora seja provável a contribuição de uma certa debilidade imunitária induzida pelo stress inerente ao processo de transporte e à própria gestação.

Apesar da aparente recuperação e desaparecimento completo das lesões, a bibliografia descreve como comum o estado de portador saudável nos animais recuperados da doença. Esta possibilidade não foi por nós averiguada. Até à data (cerca de 18 meses após o diagnóstico), não temos conhecimento de novos casos na exploração.

Bibliografia

- AMBROSE, N.C.; MIJINYAWA, M.S.; DE MENDOZA, J.H. (1998). Preliminary characterization of extracellular serine proteases of *Dermatophilus congolensis* isolates from cattle, sheep and horses. *Vet. Microb.*, 62 (4): 321-335.
- BIDA, S.A.; DENNIS, S.M. (1977). Sequential pathological changes in natural and experimental dermatophilosis in Bunaji cattle. *Res. Vet. Sci.*, 22 (1): 18-22.
- CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. (1995). Integumentary system. In *Thomson's Special Veterinary Pathology* (2ª Edição).

St. Louis, Mosby Year-Book, pp. 484-485.

COTTRAL, G.E. (1978). IN COTTRAL, G.E. (ED.). *Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology*. New York, Cornell Univ. Press, pp. 559-561.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. (1997). The skin and its appendages. In Jones, T.C.; Hunt, R.D.; King, N.W. (Eds.). *Veterinary Pathology* (6ª Edição). Baltimore, Williams & Wilkins, pp. 833.

ODUYE, O.O. (1975). Effects of various induced local environmental conditions and histopathological studies in experimental *Dermatophilus congolensis* infection on bovine skin. *Res. Vet. Sci.*, 19 (3): 245-252.

PROVOST, A.; TOUADE, M.P.; GUILLAUME, M.; PELETON, H.; DAMSON, F. (1976). Vaccination trials against bovine dermatophilosis in southern Chad. In: Loyd, D.H.; Sellers E.C. (Eds.). *Dermatophilus Infection in Animals and Man*. New York, Academic Press. pp 260-268.

PULLIAM, D.J.; KELLEY, D.C.; COLES, E.H. (1967). Studies of natural and experimental cutaneous streptococcal infections in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 28:447-455.

RICHARD, J.L.; THURSTON, J.R.; PIER, A.C. (1976). Comparison of antigens of *Dermatophilus congolensis* isolates

and their use in serological tests in experimental and natural infections. In: Loyd, D.H.; Sellers E.C. (Eds.). *Dermatophilus Infection in Animals and Man*. New York, Academic Press. pp 216-227.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. (1995). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology* (5ª Edição). Philadelphia, W. B. Saunders Company, pp. 296-298.

TYLER, R.D.; COWELL, R.L.; MEINKOTH, J.H. (1999). Cutaneous & subcutaneous lesions: masses, cysts, ulcers and fistulous tracts. In Cowell, R.L.; Tyler, R.D. (Eds.). *Diagnostic Cytology of the Dog and Cat*. (2ª Edição). Goleta, American Veterinary Publications, Inc., pp. 2; 29-30.

VAN SACEGHEM, R. (1915). Dermatose contagieuse (Impetigo contagieux). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 8: 354- 359.

ZARIA, L.T. (1993). *Dermatophilus congolensis* infection (Dermatophilosis) in animals and man! An update. *Trop. Anim. Health Prod.*, 28 (2 Supl.): pp. 29S-37S.

YAGER, J.A.; SCOTT, D.W.; WILCOCK, B.P. (1993). The skin and appendages. In Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N. (Eds.) *Pathology of domestic animals* (4ª Edição). San Diego, Academic Press, Inc., Volume 1, pp. 648-651.

Estudo comparativo de várias técnicas de colecisto-enterostomia no cão

Comparison of several techniques of cholecysto-enterostomy in the dog

José Manuel Chéu Limão Oliveira*

Faculdade de Medicina Veterinária, Polo Universitário do Alto da Ajuda,
Rua Professor Cid dos Santos, 1300-477 Lisboa

Resumo: O Autor avalia a resposta de 9 cães de ensaio a diferentes formas de colecisto-enterostomia. Neste sentido foi verificado periodicamente a possível ocorrência de alterações clínicas, laboratoriais, radiográficas e ecográficas antes e após as anastomoses bílio-digestivas, até à eutanásia dos animais.

As duas técnicas de colecisto-enterostomia em que não se verificaram complicações pós-operatórias foram a colecisto-duodenostomia e a colecisto-jejunosomia usando uma ansa em Y (Roux), com interposição de uma válvula anti-refluxo entre as anastomoses bílio-digestiva e jejuno-jejunal. Todas as outras técnicas utilizadas [colecisto-jejunosomia simples, colecisto-jejunosomia com jejuno-jejunosomia adicional (Ómega), colecisto-jejunosomia com jejuno-jejunosomia adicional e obstrução da ansa jejunal ascendente e colecisto-jejunosomia usando uma ansa em Y (Roux)] deram origem a mais ou menos problemas, quase sempre relacionados com a colangite ascendente.

Palavras chave: Colecisto-enterostomia; Cão.

Summary: An assessment is made of the reaction of 9 experimental dogs to different methods of cholecysto-enterostomy. To this effect periodical checks were made of clinical, laboratory, radiographic and echographic signs, before and after the bilio-enteric anastomosis.

Cholecystoduodenostomy and Roux-en-Y cholecystojejunosomy on-line instussusceptive antireflux valve are the preferred biliary enteric anastomosis. The other cholecystenterostomy procedures (several techniques of cholecystojejunosomy without a valve) are associated with potential complications because do not avoid ascending cholangitis.

Key words: Cholecysto-enterostomy; Dog.

Introdução

O tratamento definitivo da maior parte da patologia do tracto biliar extra-hepático é cirúrgico, independentemente da lesão ser devida a traumatismo ou a obstrução⁽⁸⁾.

As anastomoses bílio-digestivas estão indicadas nas situações em que se verifique a obstrução total ou parcial das vias biliares ou fuga de bÍlis para a cavidade abdominal^(18, 25). São várias as técnicas cirúrgicas descritas na literatura: colecisto-duodenostomia, colecisto-jejunosomia, colédoco-duodenostomia e colédoco-jejunosomia^(7, 8, 11, 14). Experien-

talmente também já foram realizadas anastomoses do ducto biliar comum e da vesícula ao cólon transversal no Cão, com bons resultados^(8, 28).

A colédoco-duodenostomia foi pela primeira vez executada por Riedel em 1888, mas apenas descrita em 1892^(2, 12, 16, 28).

No Homem a criação de uma via alternativa para o fluxo de bÍlis é feita geralmente através da colédoco-enterostomia^(21, 29, 39). No Cão o diâmetro do ducto biliar comum normal nunca ultrapassa os 3 mm nas raças grandes⁽²⁹⁾, tendo cerca de 1,5 mm num cão médio⁽³⁹⁾. Ao compararmos estes diâmetros com os do Homem, onde o ducto biliar comum normal tem cerca de 10 mm de diâmetro⁽²⁹⁾, facilmente se compreende a dificuldade que há não só em executar colédoco-enterostomias no Cão, como também em fazer reparações simples dos ductos biliares em casos de rotura^(29, 39) ou mesmo a sua canulização com tubos de silicone em T ou Y, prática comum em medicina humana^(29, 36, 39).

A colecisto-enterostomia obvia a necessidade de se recorrer às vias biliares para a promoção do redireccionamento da bÍlis⁽³⁹⁾.

A colecisto-jejunosomia é menos fisiológica do que a anastomose da vesícula ao duodeno uma vez que o fluxo de bÍlis é conduzido directamente para o jejuno^(8, 20, 41). A vantagem que poderá apresentar relativamente à colecisto-duodenostomia é o facto da anastomose bÍlio-digestiva dificilmente ficar sob tensão, já que as ansas do jejuno têm uma grande mobilidade, sendo relativamente fácil a sua aproximação à vesícula⁽²⁵⁾.

Nas colecisto-jejunosomias deve-se usar o jejuno proximal para diminuir a incidência da má digestão de lípidos pós-operatória⁽¹⁸⁾, fenómeno que, juntamente com a perda de peso e a ulceração duodenal, ocorre mais frequentemente como sequela das anastomoses da vesícula ao jejuno comparativamente às colecisto-duodenostomias^(18, 41). Pensa-se que depois das colecisto-jejunosomias pode ocorrer a paragem dos mecanismos duodenais responsáveis pela inibição da secreção gástrica e daqui resultar um incremento fisiológico da secreção de ácido gástrico. Concomitantemente há também um decréscimo mecânico da neutralização das secreções de ácido gástrico no duodeno pela bÍlis, daqui resultando possíveis ulcerações duodenais⁽⁴¹⁾.

* Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária

Uma das desvantagens da colecisto-enterostomia é o facto da vesícula poder perder a capacidade de concentrar a bÍlis e de a libertar intermitentemente para o intestino⁽⁴⁾.

A infecção do tracto biliar (colangite ascendente) é uma complicação frequente das anastomoses bÍlio-digestivas^(1, 3, 4, 7, 21, 25, 26, 29, 43). A sua patogénese tem sido associada ao refluxo de conteúdo intestinal para o sistema biliar. A criação de anastomoses amplas é assim essencial para minimizar este problema^(21, 38, 39). Mesmo que haja refluxo de conteúdo intestinal para o sistema biliar a colangite é controlável na ausência de obstrução e estase^(37, 41), respondendo bem à antibioterapia⁽⁷⁾. O diâmetro da anastomose deve ser pelo menos de 2,5 cm, número empiricamente estabelecido como sendo necessário para prevenir a estenose e a colangite subsequente^(10, 18, 40) e a retenção prolongada de conteúdo intestinal no tracto biliar^(7, 18).

A regurgitação de conteúdo intestinal para o tracto biliar pode ainda ser minimizada usando uma ansa em Y (Roux)^(5, 8, 11, 25, 26) ou pela simples desfuncionalização da ansa jejunal ascendente nas colecisto-jejunostomias associadas a uma entero-enterostomia^(3, 9, 11, 26). São também necessários comprimentos grandes da ansa não funcional para prevenir o refluxo, sendo 45 cm o comprimento mínimo⁽³²⁾. Por último, poder-se-á criar uma válvula anti-refluxo feita a partir da invaginação de parte da ansa de jejuno não funcional ou apenas da sua mucosa^(15, 30, 31, 34, 43). Um dos problemas que se levanta relativamente a esta válvula intestinal artificial é o de quanto tempo ela mantém a sua estrutura e a eficácia do seu mecanismo anti-refluxo⁽³⁴⁾.

Material e Métodos

Foram realizadas nove colecisto-enterostomias em cães de raça indeterminada, 5 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, de idades compreendidas entre os 8 e os 12 anos, variando os seus pesos entre os 14 kg e os 22 kg.

As anastomoses bÍlio-digestivas utilizadas foram as seguintes: colecisto-duodenostomia (cães n.º 1 e 2), colecisto-jejunostomia simples (cães n.º 3 e 4), colecisto-jejunostomia com jejuno-jejunostomia adicional (Ómega) (cão n.º 5), colecisto-jejunostomia

com jejuno-jejunostomia adicional e obstrução da ansa jejunal ascendente (cão n.º 6), colecisto-jejunostomia usando uma ansa em Y (Roux) (cão n.º 7) e colecisto-jejunostomia usando uma ansa em Y (Roux) com válvula anti-refluxo (cães n.º 8 e 9).

A válvula anti-refluxo foi feita a partir da invaginação das camadas muscular e mucosa do segmento não funcional de jejuno (Figura 1).

As anastomoses da vesícula ao jejuno foram executadas de uma forma látero-lateral (Figura 2).

Os animais foram todos submetidos a um exame sumário um a dois dias antes de ter sido realizada a intervenção cirúrgica. Determinou-se o seu peso e a temperatura rectal, observou-se a coloração das mucosas, pele, fezes e urina e a ocorrência ou não de alterações gastro-intestinais. Em seguida colheu-se sangue da veia jugular para análise laboratorial (hemograma, tempo de protrombina e provas bioquímicas) e observou-se ultrasonograficamente o sistema hepato-biliar, antes e depois de ter sido realizada uma colecistografia intra-venosa (colangiografia).

Para as intervenções cirúrgicas, depois da preparação asséptica do campo operatório, procedeu-se à indução anestésica dos canídeos com tiopental sódico ("Pentothal", da Abbott) na dose de 10 miligramas por quilo, à qual se seguiu a intubação traqueal com um tubo de Magill e a manutenção da anestesia com uma mistura de halotano ("Halothane", da Hoechst) e oxigénio através de um sistema circular semi-fechado. Durante a intervenção foi administrado soro glucosado isotónico por venoclise, em gota a gota lenta.

Após o acesso à cavidade abdominal e a libertação da vesícula biliar do leito hepático, procedeu-se à sua anastomose ao duodeno em 2 cães e ao jejuno em 7. Foram depois colocados dois pontos de fio de aço no bordo mesentérico da porção do intestino que se ligou à vesícula, para mais fácil identificação radiográfica do local da anastomose (Figura 3). Em todos os animais aproveitou-se a laparotomia para colher um fragmento de fígado assim como de bÍlis, por aspiração directa da vesícula, para exame bacteriológico.

No final da intervenção foi administrado intra-venosamente um colecistopaco ("Endobil", da Bracco) na dose de meio mililitro por quilo e uma amoxicilina ("Clamoxyl", da Beecham) por via



Figura 1 - Válvula anti-refluxo de 4 centímetros (cão n.º 9).



Figura 2 - Colecisto-jejunostomia látero-lateral aos 63 dias (cão n.º 8).

intra-muscular. A administração do antibiótico manteve-se durante os 4 dias que se seguiram à cirurgia.

Os animais foram acompanhados até à sua eutanásia, feita com tiopental sódico a 10%, tempo que variou entre 42 e 114 dias. Durante este período foi, tri-semanalmente, determinado o seu peso e a temperatura rectal, observadas as colorações do soro sanguíneo, mucosas, pele, fezes e urina, a consistência das fezes e a ocorrência de alterações gastro-intestinais, colhido sangue para análise laboratorial, feitas radiografias abdominais e ecografias ao tracto biliar.

Todos os cães fizeram uma gastro-enterografia com sulfato de bário ("Prontobário" da Bracco), administrado por via oral na dose de 10 mililitros por quilo, cerca de 15 dias após a colecisto-enterosomia (Figura 3). O objectivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de úlceras gástricas e de refluxo entero-biliar.

Os animais foram submetidos a nova colangiografia 30 a 70 dias depois da anastomose bílio-digestiva.

Após a morte dos animais fez-se nova laparotomia para avaliação da permeabilidade da anastomose bílio-digestiva e da ocorrência de úlceras gástricas e duodenais. Procedeu-se também a nova colheita de fígado, parede vesicular e bÍlis para exame bacteriológico.

Para a realização das colecisto-enterosomias o acesso à cavidade abdominal foi sempre paracostal direito. Uma vez feita a laparotomia foi colocado um afastador de Gosset com uma das hastes na última costela e a outra nos músculos abdominais. Depois libertou-se manualmente a vesícula do leito hepático. Nesta fase ocorreram sempre pequenas hemorragias provenientes da face visceral do fígado, as quais foram controladas por compressão e electro-coagulação.

Nas colecisto-jejunosomias tivemos a preocupação de escolher uma ansa jejunal que alcançasse a vesícula biliar sem ficar sob tensão. Quando se utilizou uma ansa em Y (Roux) colocaram-se 2 clamps intestinais na ansa jejunal escolhida, afastados um do outro cerca de 2 centímetros. Em seguida procedeu-se à secção do jejuno e mesentério correspondente no intervalo entre as 2 pinças. O topo proximal da ansa anastomosou-se término-lateralmente ao jejuno distal, 50 a 60 centímetros abaixo do local seccionado (Figura 4). Nesta anastomose jejuno-jejunal fez-se primeiro uma sutura de Schmieden, à qual se sobrepôs uma de Lembert.

O passo seguinte foi o de lavar bem a ansa jejunal previamente seccionada, retirando o clamp que a mantinha encerrada e instilando no seu lume água destilada ou soro fisiológico, primeiramente, e depois uma associação de antibióticos (amoxicilina e gentamicina), eficaz contra bactérias aeróbias e anaeróbias, para minimizar o risco da ocorrência de colangites ascendentes pós-operatórias. Como as colecisto-jejunosomias foram feitas látero-lateralmente a extremidade da ansa jejunal distal foi encerrada com uma sutura oclusiva de Parker-Kerr.

A fixação da vesícula ao intestino (jejuno ou duodeno) foi feita através de uma sutura de Lembert, que se estendeu do fundo ao colo da vesícula.



Figura 3 - Gastro-enterografia realizada 15 dias após colecisto-jejunosomia usando uma ansa em Y (Roux) (cão nº. 7). Não há refluxo de sulfato de bário para a vesícula biliar uma vez que o meio de contraste não se aproxima dos 2 pontos de fio de aço que demarcam o local da colecisto-jejunosomia.

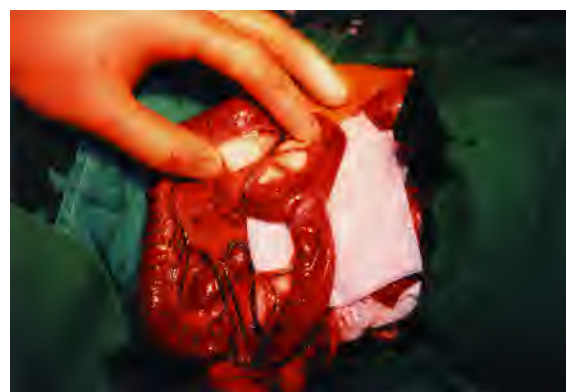


Figura 4 - Anastomose jejuno-jejunal término-lateral aos 63 dias (cão nº. 8).

A vesícula biliar foi depois esvaziada do seu conteúdo por punção com agulha de calibre 20 G, seguida da aspiração da bÍlis com uma seringa de 20 mililitros. Em seguida foi feita uma incisão de cerca de 2,5 centímetros na parede vesicular e a aspiração da bÍlis residual com a cânula do aspirador cirúrgico. Por último colocou-se um rolhão de gase no lume vesicular para impedir a saída de bÍlis para a cavidade abdominal e diminuir desta forma o risco dos animais desenvolverem uma peritonite biliar.

Foi feita depois uma incisão de 2,5 centímetros no bordo anti-mesentérico do intestino, paralelo à que tinha sido feita na parede vesicular. Nas colecisto-duodenostomias instilou-se nesta fase operatória soro fisiológico e depois uma associação de amoxicilina e gentamicina no lume duodenal, à semelhança do que foi descrito em relação ao jejuno. Procedeu-se então à anastomose da vesícula ao intestino através de uma sutura de Schmieden, à qual se sobrepôs uma sutura de Cushing. Para o efeito foi utilizado um fio reabsorvível, sintético, atraumático e fino ("Vicryl" 3-0 ou 4-0, da Ethicon).

Nos cães nº. 8 e 9 foi feita uma válvula anti-refluxo a partir da invaginação isoperistáltica de cerca de 8 centímetros de muscular e mucosa do segmento

jejunal não funcional. Para o efeito libertou-se aquela porção do jejuno do mesentério correspondente após a laqueação dos vasos mesentéricos. Em seguida foi retirada a serosa a este segmento intestinal, procedendo-se depois à invaginação das camadas muscular e mucosa no sentido da anastomose jejuno-jejunal. A extremidade da válvula foi depois fixada à parede intestinal, após enterotomia, com 2 pontos simples de um fio de sutura reabsorvível 2-0 (“Vicryl”).

Nos cães n.º 5 e 6 foi feita uma colecisto-jejunosomia com jejuno-jejunostomia adicional. Para este efeito levou-se uma ansa jejunal até à vesícula e executou-se a anastomose látero-lateral das 2 estruturas. Cerca de 15 centímetros abaixo fez-se uma jejuno-jejunostomia látero-lateral. No cão n.º 6 procedeu-se ainda ao encerramento da ansa jejunal ascendente com uma sutura oclusiva em bolsa de tabaco, a cerca de 3 centímetros de distância da vesícula biliar. Para o efeito utilizou-se um fio de seda 3-0 (“Mersilk black”, da Ethicon).

Uma vez terminada a anastomose bílio-digestiva a cavidade abdominal foi então lavada com soro fisiológico morno e o abdómen encerrado em 4 planos: peritoneu e músculo transverso abdominal, músculos oblíquos abdominais interno e depois o externo e, por último, a pele. Para a sutura dos planos internos utilizou-se “Vicryl” n.º 1 e na pele usou-se seda n.º 0.

Resultados

Os exames que os 9 canídeos fizeram antes de terem sido submetidos à colecisto-enterostomia não revelaram alterações dignas de registo. Também não se registaram alterações clínicas significativas desde a intervenção cirúrgica até à morte dos animais. Por outro lado, à excepção da alanina amino-transferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FAL), não houve variações dos outros parâmetros bioquímicos laboratoriais mensurados (gama-glutamil transferase, colesterol total, bilirrubinas total e directa, desidrogenase láctica, ácido úrico, ureia, creatinina, glucose, proteínas totais, albumina, cálcio e amilase pancreática).

Em 7 dos animais (cães n.º 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 9) a FAL sofreu um ligeiro incremento até ao sétimo dia do pós-operatório (média de 170 Ui/l) em relação aos valores que apresentava no dia anterior ao da cirurgia (média de 58 Ui/l), sem, contudo, ter ultrapassado os valores considerados normais (10 a 190 Ui/l). A partir do 7.º dia do pós-operatório os níveis séricos desta enzima voltaram novamente a diminuir, tendo atingido os valores iniciais no 13.º dia. A partir daqui não se verificaram mais alterações em seis dos animais. No entanto, no cão n.º 6 verificou-se um novo incremento da FAL no 33.º dia (216 Ui/l), ao qual se seguiu uma rápida diminuição até às 190 Ui/l logo no 41.º dia. Nos cães n.º 3 e 4 a FAL subiu continuamente até ao 35.º dia do pós-operatório, altura em que atingiu 1700 Ui/l. A partir deste dia sofreu nova quebra, sem que nunca tivessem sido atingidos os valores considerados normais.

A ALT manteve-se estacionária durante todo o estudo nos canídeos n.º 1, 2, 5, 7, 8 e 9. Nos cães n.º 3 e 4 sofreu um incremento até ao 35.º dia (1100 Ui/l), para depois diminuir até às 370 Ui/l, valor atingido no 41.º dia. A partir daqui manteve-se estacionária, embora já não viesse a atingir os valores considerados normais (10 a 80 Ui/l). Por último, no cão n.º 6 não se verificaram alterações da ALT até ao 33.º dia do pós-operatório, altura em que se registou um ligeiro incremento desta enzima (120 Ui/l). No entanto, no 41.º dia os níveis séricos da ALT voltaram novamente à normalidade.

Os canídeos n.º 3, 4 e 6 foram submetidos a uma terapêutica antibiótica (amoxicilina mais gentamicina) durante uma semana (a partir do 33.º dia no cão n.º 6 e do 35.º dia nos cães n.º 3 e 4). Os resultados foram excelentes uma vez que nos 3 animais se verificou uma rápida descida dos valores da FAL e da ALT. A gentamicina utilizada foi o “Garalone”, da Shering.

Em todos os cães verificou-se uma leucocitose na contagem de glóbulos efectuada no 7.º dia do pós-operatório (média de 25.000 leucocitos por mm³), para no 13.º dia a média do número de glóbulos brancos já ter sido de 14,3 x 10³/mm³ e no 20.º dia de 11,2 x 10³/mm³.

Os resultados das colangiografias realizadas 30 a 70 dias após a anastomose bílio-digestiva foram similares. Nos 9 cães o meio de contraste foi normalmente eliminado pelas vias biliares para o intestino sem que, contudo, se tivesse verificado a opacificação da vesícula biliar.

Os exames bacteriológicos dos fragmentos de fígado colhidos no dia da eutanásia dos 9 animais foram todos negativos. No entanto, no que respeita à parede vesicular e à bÍlis, só no canídeo n.º 9 os resultados foram negativos. Nos restantes animais foi identificado o *Clostridium perfringens* por 8 vezes, a *Escherichia coli* por 7, o *Streptococcus faecalis* por 6, o *Citrobacter freundii* por duas e o *Proteus morgani* e o *Corynebacterium* sp. por uma vez.

Em nenhum dos animais se verificou a presença de úlceras gástricas e duodenais nas gastro-enterografias realizadas 15 dias após a colecisto-enterostomia. No entanto, só nos cães em que se utilizou uma ansa em Y (Roux) podemos afirmar com toda a segurança que não houve refluxo de sulfato de bário para a vesícula, uma vez que este nunca se aproximou dos 2 pontos de fio de aço colocados no bordo mesentérico do segmento intestinal que se ligou à vesícula (Figura 3).

A necropsia dos animais confirmou a ausência de úlceras gástricas e duodenais. As anastomoses intestino-intestinais apresentaram-se sempre permeáveis e sem qualquer tipo de alteração, à semelhança do que aconteceu com os colecisto-enterostomias. Todavia, na maioria dos animais verificou-se uma certa redução do diâmetro da anastomose bílio-digestiva em relação aos 2,5 centímetros deixados inicialmente.

No canídeo n.º 6, submetido a uma colecisto-jejunosomia com jejuno-jejunostomia adicional e obstrução da ansa jejunal ascendente, observou-se a presença de bÍlis não só na vesícula biliar como também no segmento jejunal entre a vesícula e o

local onde se promoveu a obstrução intestinal.

Verificaram-se em todos os animais múltiplas aderências de epíploon e ansas intestinais ao fígado.

Discussão

Os exames bacteriológicos do fígado dos 9 animais utilizados neste trabalho, respeitantes ao dia em que foi feita a colecisto-enterostomia, foram todos negativos uma vez que a bÍlis do Cão é estéril na ausência de patologia hepato-biliar^(6, 8, 24, 26, 27, 39).

O facto de não ter havido variações dos parâmetros bioquímicos laboratoriais mensurados, à excepção da ALT e da FAL, prova que estas duas enzimas são as mais relevantes no que respeita à detecção de alterações hepato-biliares.

No cão nº. 6, submetido a uma colecisto-jejunostomia com jejuno-jejunostomia adicional e obstrução da ansa jejunal ascendente, verificou-se um ligeiro incremento da FAL no 33º. dia do pós-operatório, altura em que esta enzima registou 216 Ui/l. Por sua vez, nos cães nº. 3 e 4, submetidos a uma colecisto-jejunostomia simples, a FAL subiu continuamente durante os 35 dias que se seguiram à cirurgia, altura em que atingiu 1700 Ui/l. A ALT acompanhou as variações da FAL nos 3 animais referidos. Podemos atribuir esta elevação dos níveis séricos das 2 enzimas a uma colangite ascendente, uma vez que a terapêutica antibiótica (amoxicilina e gentamicina) instituída a estes 3 canídeos resultou numa rápida descida dos valores então alcançados. No entanto, enquanto no cão nº. 6 os níveis séricos destas enzimas voltaram à normalidade após a antibioterapia, nos canídeos nº. 3 e 4 nunca chegaram a atingir os valores considerados normais.

Uma das ilações que se pode tirar destes resultados é que a uma colecisto-jejunostomia simples é uma das técnicas de colecisto-enterostomia em que se verificam mais complicações pós-operatórias, uma vez que é relativamente fácil haver refluxo de conteúdo intestinal para a vesícula. Poder-se-ia dizer o mesmo acerca da colecisto-duodenostomia. No entanto, como o diâmetro do duodeno é bastante superior ao do jejuno, a abertura criada entre a vesícula e o duodeno é mais ampla e está menos sujeita a estenoses cicatriciais. Assim, o material que por refluxo entre na vesícula é facilmente libertado novamente para o intestino.

A colecisto-jejunostomia é menos fisiológica do que a anastomose da vesícula ao duodeno uma vez que o refluxo de bÍlis é conduzido directamente para o jejuno^(8, 20). Por outro lado, a colecisto-duodenostomia é uma técnica de fácil execução^(20, 42), sendo uma forma simples e efectiva de redireccionar a bÍlis nas obstruções das vias biliares extra-hepáticas^(3, 20).

Na necropsia do cão nº. 6, submetido a uma colecisto-jejunostomia com jejuno-jejunostomia adicional e obstrução de ansa jejunal ascendente, observou-se a presença de bÍlis retida no segmento jejunal entre a vesícula e o local onde se promoveu a obstrução intestinal. Uma vez que a estase biliar promove a colangite⁽³⁾, este poderá ter sido um factor contribu-

tivo para o aparecimento de uma colangite e a consequente elevação da FAL e da ALT neste animal.

Os resultados dos exames bacteriológicos da parede vesicular e da bÍlis confirmaram que só a válvula anti-refluxo interposta entre a vesícula biliar e a anastomose jejuno-jejunal pode prevenir a colangite ascendente. Assim, estes exames apenas foram negativos no cão nº. 9. Nos restantes animais o *Clostridium perfringens*, a *Escherichia coli* e o *Streptococcus faecalis* foram as bactérias mais frequentemente isoladas. À semelhança da *Escherichia coli* o *Streptococcus faecalis* aparece na flora normal do tubo digestivo do Cão. Os *Streptococcus* sp. são microrganismos Gram positivos e aero-anaeróbios facultativos⁽²²⁾.

A variedade de bactérias isoladas leva-nos a pensar que terá sido importante a administração de uma associação de antibióticos eficaz contra aeróbios e anaeróbios para os bons resultados obtidos por esta terapêutica. Por outro lado, a presença na bÍlis e na vesícula biliar de hospedeiros habituais do tracto digestivo, na ausência de obstrução biliar, permite-nos concluir que o refluxo entero-biliar foi a principal causa da colangite ascendente observada.

As gastro-enterografias não confirmaram o refluxo entero-biliar uma vez que nunca se observou a presença de sulfato de bário dentro da vesícula. No entanto, só nos cães em que se utilizou uma ansa em Y (Roux) podemos afirmar com toda a segurança que não houve refluxo de contraste para a vesícula, uma vez que este nunca se aproximou dos 2 pontos de fio de aço aplicados no bordo mesentérico do segmento intestinal que se ligou à vesícula. Talvez que se os fios de aço tivessem sido aplicados na própria linha de sutura da vesícula ao intestino, à semelhança do que fizeram Yeh e col. (1990)⁽⁴³⁾, este exame tivesse dado outros resultados, uma vez que em muitos casos ficámos com bastantes dúvidas em relação à localização do meio de contraste. Nos trabalhos desenvolvidos por Moran e col. (1985)⁽³⁰⁾ e Tangner (1984)⁽³⁹⁾ foi possível observar-se radiograficamente o refluxo de bário para as vias biliares após a realização de algumas técnicas de anastomose bÍlio-digestiva.

Verificou-se uma leucocitose na contagem de glóbulos efectuada no 7º. dia após a anastomose bÍlio-digestiva (média de 25.000 leucocitos por milímetro cúbico), para no 13º. dia a média do número de glóbulos brancos já ter sido de $14,3 \times 10^3/\text{mm}^3$ e no 20º. dia de $11,2 \times 10^3/\text{mm}^3$. Esta leucocitose transitória pode ser atribuída à destruição tecidual da cirurgia.

As colangiografias realizadas 30 a 70 dias após a colecisto-enterostomia confirmaram a permeabilidade das vias biliares e o bom funcionamento hepático, uma vez que em todos os cães o meio de contraste foi normalmente eliminado para o intestino. No entanto não se verificou a opacificação da vesícula porque esta estrutura perdeu a sua capacidade de armazenamento e de concentração após a anastomose bÍlio-digestiva.

As gastro-enterografias realizadas 15 dias após as colecisto-enterostomias não revelaram a presença de úlceras gástricas e duodenais, facto que foi confir-

mado na necropsia. Esta constatação está em desacordo com a opinião da maioria dos Autores ao referirem que a colédoco-jejunostomia dá frequentemente origem a lesões da mucosa das porções mais altas do tracto gastro-intestinal⁽²³⁾, nomeadamente ao desenvolvimento de úlceras pépticas^(5, 8, 23, 35). Esta tendência é também observada em canídeos sujeitos a colecisto-jejunostomia usando uma ansa em Y (Roux)⁽³⁵⁾. A incidência da hipersecreção de ácido gástrico e da úlcera péptica após colecisto-jejunostomia pode estar relacionada com a paragem pós-operatória da função pancreática exócrina, a qual não se verifica nas anastomoses da vesícula ao duodeno^(8,23).

Embora pouco frequentes estão descritos no Homem alguns casos de complicações associadas à prática da ansa em Y (Roux)⁽¹⁹⁾. Podem verificar-se alterações motoras ao nível da ansa jejunal em Y^(13,33) ou seja, alterações da sua contractilidade normal⁽¹⁷⁾ por interrupção da actividade mioeléctrica⁽¹⁹⁾, fenómeno que dá origem à atonia, estase e dilatação do segmento de jejuno^(17,19) e a possíveis invaginações jejuno-jejunais retrógradas⁽¹⁹⁾. São os segmentos de jejuno excessivamente longos que mais predis põem à estase⁽¹³⁾.

Na necropsia verificaram-se múltiplas aderências de epíloon, mesentério e ansas intestinais ao fígado. Este facto, associado à libertação contínua de bílis para o intestino após a colecisto-enterostomia, não permitiu a visualização ultrasonográfica da vesícula depois da cirurgia.

Conclusões

As duas técnicas de colecisto-enterostomia em que não se verificaram complicações pós-operatórias foram a colecisto-duodenostomia e a colecisto-jejunostomia usando uma ansa em Y (Roux), com interposição de uma válvula anti-refluxo entre as anastomoses bílio-digestiva e jejuno-jejunal. Todas as outras técnicas utilizadas dão origem a mais ou menos problemas.

A colangite ascendente é a principal complicação das anastomoses bílio-digestivas e só a válvula anti-refluxo a pode prevenir na totalidade. A alternativa é criar-se uma abertura bastante ampla entre a vesícula biliar e o intestino de modo a que todo o material que, por refluxo, alcance a vesícula, seja facilmente libertado novamente para o intestino, não se verificarem estenoses cicatriciais ao nível da anastomose e a resposta à antibioterapia, caso necessária, seja óptima. Segundo Walshaw (1996)⁽⁴¹⁾ a contaminação bacteriana da bílis na ausência de obstrução não causa problemas clínicos. Ainda a este propósito Fossum e col. (1997)⁽¹⁸⁾ referem que as aberturas pequenas entre a vesícula e o intestino resultam mais facilmente em colecistites ascendentes ou crónicas do que os estomas mais amplos. Walshaw (1996)⁽⁴¹⁾ aconselha até a fazerem-se aberturas entre 2,5 e 8 centímetros no acto cirúrgico da colecisto-duodenostomia.

A colecisto-duodenostomia revelou-se uma técnica muito eficaz, de fácil e rápida execução e muito menos morosa do que a colecisto-jejunostomia usando

uma ansa Y (Roux). Van Sluijs (1994)⁽⁴⁰⁾ refere que o tamanho da abertura entre a vesícula e o intestino tem mais importância do que o comprimento da ansa de Roux.

As bactérias que mais frequentemente são responsáveis pela colangite ascendente são o *Clostridium perfringens*, a *Escherichia coli* e o *Streptococcus faecalis*. A variedade de bactérias isoladas leva-nos a pensar que é importante a administração de uma associação de antibióticos eficaz contra aeróbios e anaeróbios para que se obtenham bons resultados com esta terapêutica, após colangite ascendente.

A FAL e a ALT foram os dois parâmetros bioquímicos que se revelaram mais importantes na detecção da colangite ascendente.

Não se verificou em nenhum animal a ocorrência de úlceras gástricas ou duodenais. Este facto veio provar que esta possível complicação de algumas anastomoses bílio-digestivas, nomeadamente das colecisto-jejunostomias, ocorre com pouca frequência no Cão.

Nos nossos animais também não ocorreram outras possíveis complicações das colecisto-enterostomias descritas por Walshaw (1996)⁽⁴¹⁾, como a desvitalização da vesícula biliar resultante da torção da artéria cística ou mesmo a obstrução do ducto cístico também devido à sua torção.

Após a colecisto-enterostomia a vesícula biliar perde quase sempre a capacidade de armazenar e de concentrar a bílis, facto que no entanto não se traduz em manifestações clínicas.

Bibliografia

- 1 - ARCHIBALD, J.; HOLT, J.C. E SOKOLOVSKY, V. (1981). Abdominal injuries. Em Catcott, E.J. (editor): "Management of trauma in dogs and cats". Cap. 9, American Veterinary Publications, Inc.
- 2 - AKIYAMA, H.; IKEZAWA, H.; KAMEYA, S.; IWASAKI, M.; KURODA, Y. E TAKESHITA, T. (1980). Unexpected problems of external choledochoduodenostomy. Amer. Jour. Surg., 140, 660 - 665.
- 3 - BARNER, H.B. (1966). Choledochoduodenostomy with reference to secondary cholangitis: 15 - year review of 24 cases. Annals Surg., 163 (1), 74 - 78.
- 4 - BELLENGER, C.R. (1973). Surgery for bile duct rupture and obstruction in the dog. Aust. Veter. Jour., 49, 298 - 306.
- 5 - BISMUTH, H.; FRANCO, D.; CORLETTE, M.B. E HEPP, J. (1978). Long term results of Roux-en-y hepaticojejunostomy. Surg. Gynec. Obstet., 146 (2), 161 - 167.
- 6 - BJORLING, D.E.; PRASSE, W.M.P. E HOLMES, R.A. (1985). Partial hepatectomy in dogs. Comp. Contin. Educ. Pract. Veter., 7 (3), 257-265.
- 7 - BJORLING, D.E. (1991). Surgical management of hepatic and biliary disease in cats. Comp. Contin. Educ. Pract. Veter., 13 (9), 1419 - 1425.
- 8 - BLASS, C.E. (1983). Surgery of the extrahepatic biliary tract. Comp. Contin. Educ. Pract. Veter., 5 (10), 801-808.
- 9 - BOLEY, S.J.; MCKINNON, W.M.P. E WRIGHT, A.R. (1961). Surgical fact or fancy. I. Fate of choledochoduodenostomy in the absence of common bile duct obstruction. Surgery, 50 (4), 676 - 677.
- 10 - BRADLEY, E.L. (1982). Choledochoduodenoplasty, a technique for choledochoduodenostomy. Amer Surgeon, 48, 599 - 600.
- 11 - BREZNOCK, E.M. (1983). Surgery of hepatic parenchymal and biliary tissues. Em Bojrab, M.J. (editor): "Current techniques in small animal surgery". 2ª. edição, cap. 14, Lea e Febiger, Philadelphia.

- 12 - DEGENSHEIN, G.A. (1974). Choledochoduodenostomy: an 18 year study of 175 consecutive cases. *Surgery*, 76 (2), 319 - 324.
- 13 - DELCORE, R. E CHEUNG, L.Y. (1991). Surgical options in postgastrectomy syndromes. *Surg. Clin. Nor. Amer.*, 71 (1), 57-75
- 14 - DINGWALL, J.S. (1978). Foie, appareil biliaire et pancréas. Em Bojrab, M.J. (editor): "Techniques actuelles de chirurgie des petits animaux". Cap. 12, Editions Vigot Frères.
- 15 - DONAHOE, P.K. E HENDREN, W.H. (1983). Roux-en-y on-line intussusception to avoid ascending cholangitis in biliary atresia. *Arch. Surg.*, 118, 1091 - 1094.
- 16 - FARRAR, T.; PAINTER, M.W. E BETZ, R. (1969). Choledochoduodenostomy. *Arch. Surg.*, 98, 442 - 446.
- 17 - FERGUSON, G.H.; ROSE, M.; MACLENNAN, I.; TAYLOR, T.V. E TORRANCE, H.B. (1990). Vomiting after Roux-en-y biliary diversion: relationship to surgical technique. *Brit. Jour. Surg.*, 77 (5), 548- 550.
- 18 - FOSSUM, T.W.; HEDLUND, C.S.; HULSE, D.A.; JOHNSON, A.L.; SEIM, H.B.; WILLARD, M.D. E CARROLL, G.L. (1997). Surgery of the extrahepatic biliary system. Em Fossum, T.W. (editor): "Small animal surgery". Cap. 18, Mosby-Year Book, Inc.
- 19 - GERST, P.H. (1991). Retrograde intussusception as a complication of Roux-en-y anastomosis. *Surgery*, 110 (5), 917 - 919.
- 20 - HOERR, S.O. E HERMANN, R.E. (1973). Side to side choledochoduodenostomy. *Surg. Clin. Nor. Amer.*, 53 (5), 1115 - 1122.
- 21 - JENKINS, C.C.; LEWIS, D.D.; BROCK, K.A.; HAGER, D.A. E MEYER, D.J. (1988). Extrahepatic biliary obstruction associated with Platynosomum concinnum in a cat. *Comp. Contin. Educ. Pract. Veter.*, 10 (5), 628 - 632.
- 22 - JOURDAIN, M.L.O. (1990). Bacteriologie medicale chez le chien. Analyse systematique et interpretation des resultats. These pour le doctorat veterinaire, Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse.
- 23 - KAJIWARA, T. E SUZUKI, T. (1978). Effect of biliary diversion on exocrine pancreas. *Surg. Gynec. Obstet.*, 147, 343 - 349.
- 24 - KIRPENSTEIJN, J.; FINGLAND, R.B.; ULRICH, T.; SIKKEMA, D.A. E ALLEN, S.W. (1993). Cholelithiasis in dogs: 29 cases (1980 - 1990). *Jour. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 202 (7), 1137-1142.
- 25 - LIMÃO OLIVEIRA, J.M.C. E LIMÃO OLIVEIRA, P.M.C. (1992). Indicações e técnica da colecisto-jejunoostomia usando uma ansa em Y (Roux). *Veter. Téc.*, ano 2, nº. 5, 34 - 39.
- 26 - LIMÃO OLIVEIRA, J.M.C. (1995). Diagnóstico da icterícia obstrutiva no Cão e sua terapêutica pela colecisto-enterostomia. Contribuição para o seu estudo. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.
- 27 - LIMÃO OLIVEIRA, J.M.C. (1997). Estudo experimental sobre a microflora hepato-biliar do Cão em situações normais e na presença de estase biliar. *Veter. Téc.*, ano 7, nº. 6, 48-50.
- 28 - MADDEN, J.L.; CHUN, J.Y.; KANDALAF, S. E PAREKH, M. (1970). Choledochoduodenostomy. *Amer. Jour. Surg.*, 119, 45 - 54.
- 29 - MARTIN, R.A.; MACCOY, D.M. E HARVEY, H.J. (1986). Surgical management of extrahepatic biliary tract disease: a report of eleven cases. *Jour. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, 22, 301 - 307.
- 30 - MORAN, J.M.; NOGUERALE, F.; DOPENA, M.; SANJUAN, S.; CUADRI, A.; REQUENA, F.; SANTAMARIA, J.S. E GARCIA - SANCHO, L. (1985). Portoenterostomy diversion, experimental study in antireflux technique. *Amer. Jour. Surg.*, 149, 248 - 251.
- 31 - NAKAJO, T.; HASHIZUME, K.; SAEKI, M. E TSUCHIDA, Y. (1990). Intussusception - type antireflux valve in the Roux - en - y loop to prevent ascending cholangitis after hepatic porto-jejunoostomy. *Jour. Pediat. Surg.*, 25 (3), 311 - 314.
- 32 - PAYNE, W.S. (1983). Prevention and treatment of biliary - pancreatic reflux esophagitis, the role of long - limb Roux - y. *Surg. Clin. Nor. Amer.*, 63 (4), 851 - 858.
- 33 - PEILLON, C.; DUCROTTE, P.; DUHAMEL, C.; DENIS, P. E TESTART, J. (1990). Étude manométrique de deux anses en Y d'hépatocojéjunostomie. *Annales Chirurg.*, 44 (9), 733 - 738.
- 34 - SAEKI, M.; NAKANO, M.; HAGANE, K. E SHIMIZU, K. (1991). Effectiveness of an intussusceptive antireflux valve to prevent ascending cholangitis after hepatic porto-jejunoostomy in biliary atresia. *Jour. Pediat. Surg.*, 26 (7), 800 - 803.
- 35 - SATO, T.; IMAMURA, M.; SASAKI, I. E KAMEYAMA, J. (1983). Gastric acid secretion and gastrointestinal hormone release after biliary reconstruction procedures. *Amer. Jour. Surg.*, 146, 245 - 249.
- 36 - SCHALL, W.D. E GREINER, T.P. (1983). Diseases of the gallbladder. Em Ettinger, S.J. (editor): "Textbook of Veterinary Internal Medicine, diseases of the dog and cat". 2ª edição, vol. II, cap. 62, W.B. Saunders Company.
- 37 - STEFANINI, P.; CARBONI, M.; PATRASSI, N.; BASOLI, A.; BERNARDINI, C. E NEGRO, P. (1975). Roux-en-y hepaticojéjunostomy, a reappraisal of its indications and results. *Annals Surg.*, 181 (2), 213-219.
- 38 - TANGNER, C.H.; TURREL, J.M. E HOBSON, H.P. (1982). Complications associated with proximal duodenal resection and cholecystoduodenostomy in two cats. *Veter. Surg.*, 11, (2), 60 -64.
- 39 - TANGNER, C.H. (1984). Cholecystoduodenostomy in the dog, comparison of two techniques. *Veter. Surg.*, 13, 126 - 134.
- 40 - VAN SLUIJS, F.J. (1994). Chirurgie du système biliaire extra-hépatique. *Prat. Méd. Chir. Anim. Compag.*, 29, 759-763.
- 41 - WALSHAW, R. (1996). Hepato-biliary, pancreatic, and splenic surgery. Em Lipowitz, A.J.; Caywood, D.D.; Newton, C.D. e Schwartz, A. (editores): "Complications in small animal surgery, diagnosis, management and prevention". Cap. 14, Williams e Wilkins.
- 42 - YADEGAR, J.; WILLIAMS, R.A.; PASSARO, E. E WILSON, S.E. (1980). Common duct stricture from chronic pancreatitis. *Arch. Surg.*, 115, 582 - 586.
- 43 - YEY, T.J.; CHIN, T.W.; TSAI, W.C. E WEI, C.F. (1990). Mucosal intussusception to avoid ascending cholangitis. *Brit. Jour. Surg.*, 77 (9), 989 - 991.