

# DETERMINAÇÃO ATRAVÉS DE MÉTODO FLUORIMÉTRICO MODIFICADO, DA PERDA DE TIAMINA (VITAMINA B<sub>1</sub>) NA PASTEURIZAÇÃO COMERCIAL DE LEITE TIPO B<sup>1</sup>

JOSÉ GLAUCO GRANDI<sup>2</sup>  
CARMEN CECÍLIA TADINI<sup>2</sup>

GRANDI, J.G.; TADINI, C.C. Determinação através de método fluorimétrico modificado, da perda de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) na pasteurização comercial de leite tipo B. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.15, n.1, p.48-52, março 1994.

**RESUMO:** O objetivo do trabalho foi avaliar pelo método fluorimétrico a perda de tiamina devida ao aquecimento no processo de pasteurização comercial (72 a 75°C por 15 a 20 segundos) do Leite tipo B, através de método fluorimétrico da Association of Official Analytical Chemists – AOAC com modificações quanto a determinação da massa de amostra e o emprego, para leite in natura, da resina trocadora de cátions normalmente usada para leite em pó e em produtos lácteos enriquecidos. Foram feitas determinações em leite tipo B, cru e pasteurizado e os resultados obtidos com o leite cru são compatíveis com os da literatura. Para o leite tipo B pasteurizado, verificou-se uma perda de 18,5 a 50,0% de tiamina como consequência do processo térmico.

**PALAVRAS-CHAVE:** tiamina, perda de vitamina B<sub>1</sub>, leite, pasteurização.

## 1 – INTRODUÇÃO

Segundo HADDAD & LOEWENSTEIN (1983) a Associação Americana de Ciência dos Laticínios publicou, em 1965, uma revisão por HARTMAN e DRYDEN intitulada "Vitaminas no leite e em seus derivados", onde relatam que a tiamina e o ácido ascórbico são termosensíveis.

Sob o aspecto nutricional do leite, a vitamina B<sub>1</sub> é considerada um fator antineurítico, e sua ausência na dieta alimentar é responsável pelo beribéri humano, grave enfermidade nervosa. Chamada também de aneurina ou tiamina, a vitamina B<sub>1</sub> toma parte na constituição da cocarboxilase, uma enzima que regula em parte o metabolismo dos açúcares no organismo (VEISSEYRE, 1972).

O conteúdo natural de vitamina B<sub>1</sub> no leite está estritamente relacionado com o processo térmico ao qual o produto foi submetido. A importância desta vitamina para a saúde humana leva a necessidade de sua determinação quantitativa no leite e em outros produtos alimentícios tanto antes quanto depois do processamento.

Métodos químicos e microbiológicos tem sido largamente utilizados para estas análises. Os métodos microbiológicos são altamente específicos mas são demorados consumindo tempo e não apresentam precisão. Os métodos químicos são mais simples, rápidos, específicos e na maioria dos casos sensíveis.

O método químico mais amplamente utilizado para a análise da vitamina B<sub>1</sub> é a "reação do tiocromo". Em determinadas condições, este método fluorimétrico é

altamente específico exigindo cuidadosa padronização, bem como um conhecimento aprofundado dos interferentes.

HADDAD & LOEWENSTEIN (1983) adaptaram e aplicaram o método fluorimétrico descrito pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1980) para determinar tiamina em leite, com modificações necessárias, particularmente na preparação da amostra para torná-lo um método mais simples, rápido e sensível.

O principal objetivo do trabalho foi avaliar pelo método fluorimétrico da AOAC (1990); NESTLÉ, a perda de tiamina devido ao aquecimento no processo de pasteurização comercial (72 a 75°C por 15 a 20 segundos) do leite tipo B, utilizando para purificação da vitamina o uso de uma resina trocadora de cátions normalmente utilizada para análise de tiamina em leite em pó e em produtos lácteos enriquecidos (BRASIL, 1962).

## 2 – MATERIAL E MÉTODO

Matéria-prima: leite tipo B, cru e pasteurizado, fornecidos por uma indústria no período de fevereiro a abril de 1992, na quantidade de 2 litros cada para os ensaios.

Reagentes:

(1) Solução padrão de vitamina B<sub>1</sub> (cloridrato de tiamina:

1.1 – preparo da solução estoque – 100 µg B<sub>1</sub>/ml HCL: foram pesados exatamente 10,0 mg de vit. B<sub>1</sub> (Ref.: MERCK 8181), previamente seca até peso constante em

1. Trabalho apresentado na forma de poster no XIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos em São Paulo.  
2. Escola Politécnica da USP - Departamento de Eng. Química - Área de concentração: Engenharia de Alimentos - Caixa Postal, 61548 - São Paulo SP - CEP 05424-970 - Fone: (011) 818-5758 - Ramal 5629 ou 5758 - Profa. Carmen - Fax: (011) 211-3020.

Agradecimentos: à NESTLÉ Ind. e Com. Ltda; à Coop. Central de Laticínios do Estado de São Paulo e ao Instituto Adolfo Lutz.

dessecador com  $\text{CaCl}_2$  e foi completado o volume a 100 ml, em balão volumétrico, com HCl 0,1 N. Esta solução foi conservada em geladeira pelo prazo máximo de 1 mês (NESTLÉ).

1.2 — preparo da solução intermediária — 5  $\mu\text{g}$   $\text{B}_1/\text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ : Foram pipetados 5,0 ml da solução estoque e foi completado o volume a 100 ml, em balão volumétrico, com água destilada.

1.3 — preparo da solução padrão — 0,25  $\mu\text{g}$   $\text{B}_1/\text{ml}$ : Foram pipetados 5,0 ml da solução intermediária para um balão volumétrico de 100 ml, foram adicionados 75,0 ml de HCl 0,1 N e 5,0 ml de acetato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{C-COO}$ ) 2,5 M e o volume foi completado com água destilada.

As soluções 1.2 e 1.3 foram preparadas para cada ensaio.

(2) Ácido clorídrico 1 N

(3) Ácido clorídrico 0,1 N

(4) Acetato de sódio 2,5 M

(5) Solução ácida de cloreto de potássio.

Foram dissolvidos 250 g de KCl p.a. em água destilada e o volume foi completado a 1 litro em balão volumétrico. Foram adicionados, então, 8,5 ml de ácido clorídrico a 37% e a solução final foi bem misturada.

(6) Resina trocadora de íons: Ref: Amberlite CG-50. Tipo I (ROHM & HAAS) - Trata-se de uma resina catiônica levemente ácida, tendo uma estrutura funcional carboxílica na forma hidrogeniônica.

6.1 Foram hidratados em um erlenmeyer aproximadamente 50 g da resina em água durante 24 horas. Em seguida, as partículas finas foram eliminadas por decantações sucessivas.

6.2 A resina foi então ativada, tratando-a duas vezes com 100 ml de HCl 1 N, sob agitação vigorosa, cada tratamento com duração de 1 hora.

6.3 Após a ativação, a resina foi lavada sobre uma placa de vidro sinterizado com água destilada até pH neutro. A resina foi conservada então imersa em água destilada.

(7) Solução de oxidação

7.1 Solução de ferricianeto de potássio 1% — Foi dissolvido 1,0 de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  p.a. em água destilada e o volume foi completado a 100 ml em balão volumétrico.

7.2 Solução de hidróxido de sódio 15% — Foram dissolvidos 15,0 g de NaOH p.a. em pastilhas em água destilada e o volume foi completado a 100 ml em balão volumétrico.

7.3 Álcool isobutílico p.a.

(8) Colunas cromatográficas

Foram utilizados tubos de vidro de 8 mm de diâmetro externo e 150 mm de comprimento, com um reservatório superior de capacidade aproximada de 50 ml e capilar no final preenchido com algodão de tal forma a permitir, quando o tubo está cheio com a resina, um fluxo de aproximadamente 30 gotas/minuto.

#### Procedimento:

A extração da vitamina  $\text{B}_1$  deve ser feita em meio ácido devido a sua instabilidade em solução neutra ou alcalina.

A tiamina é estável em meio ácido mesmo quando submetida a aquecimento prolongado (STROHECKER & HENNING, 1967).

Em um erlenmeyer de 250 ml, foram pesados 120 g de leite e lentamente, sob agitação, foram adicionados 10 ml de HCl 1N, para evitar a formação de grumos. O erlenmeyer tampado com papel alumínio foi aquecido a  $100^\circ\text{C}$  por 30 minutos em autoclave. Após seu resfriamento à temperatura ambiente, a amostra teve o pH ajustado para 4,6 com solução de acetato de sódio 2,5 M. A seguir, a amostra foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 200 ml e o volume completado com água destilada. O material foi então filtrado em papel de filtro plissado.

O filtrado clorídrico, no qual vai ser determinada a vitamina  $\text{B}_1$  por fluorimetria, contém normalmente substâncias que interferem na análise, quer pela fluorescência que produzem ou por compostos redutores que consomem o ferricianeto de potássio levando a um excesso de agente oxidante para a conversão quantitativa da tiamina em tiocromo (STROHECKER & HENNING, 1967).

Entre os vários processos de purificação do filtrado podemos citar: resina trocadora de cátions, cromatografia em camada delgada e sobre papel. A passagem do filtrado por um leito de resina catiônica é um processo de purificação que leva a resultados satisfatórios. A vitamina  $\text{B}_1$ , se une a resina junto com outros cátions, enquanto os ânions e as substâncias não iônicas passam e são eliminadas na lavagem da coluna. A tiamina retida é substituída por íons de potássio da solução ácida de cloreto de potássio (EWING, 1972; KING, 1980; STROHECKER & HENNING, 1967).

As colunas foram preparadas enchendo-se os tubos de vidro (item 8) com uma suspensão aquosa de resina (item 6). Para cada ensaio foram preparadas duas colunas para tratamento de 25 ml de amostras do leite cru e do leite pasteurizado, respectivamente e duas para tratamento de 20 ml da solução padrão com 5  $\mu\text{g}$  de tiamina (item 1.3) cada uma. Cada coluna foi submetida a adsorção com o volume especificado acima; a solução fluía lentamente (fluxo de aproximadamente 30 gotas/min) através da coluna, seguida de lavagem com três porções sucessivas de 10 ml de água destilada e posterior eluição com duas porções sucessivas de 10 ml de solução ácida de cloreto de potássio.

Os efluentes correspondentes a cada eluição foram recolhidos em balões volumétricos de 25 ml e os volumes foram completados com solução ácida de cloreto de potássio. A resina trocadora de cátions deve ser utilizada somente uma vez (NESTLÉ).

Em cada um de dois tubos de centrífuga de 50 ml procedeu-se a oxidação de 5,0 ml do eluído pela adição de 0,3 ml de solução de ferricianeto de potássio e 2,0 ml de solução de hidróxido de sódio. No outro tubo não foi adicionado a solução de ferricianeto de potássio para não se ter a oxidação.

A seguir, os tubos foram agitados durante 1 minuto e logo após foram adicionados em cada tubo 15 ml de álcool isobutílico. Os tubos tampados foram então agitados vigorosamente durante 1,5 minuto. (O tempo e o modo de agitação deve ser o mesmo para todos os tubos, para que o tio-

como seja extraído nas mesmas condições). Após centrifugação (700 X G) por 5 minutos cerca de 10 ml do sobrenadante de cada tubo foi transferido para o seu respectivo tubo do fluorímetro.

Por ser o tiocromo sensível a luz, as soluções foram protegidas por um pano preto.

No fluorímetro Coleman com filtro primário (excitação) com comprimento de onda de 365 nm e com filtro secundário (emissão) de comprimento de onda de 436 nm, o zero do aparelho foi ajustado com álcool isobutílico. A leitura da solução padrão oxidada foi fixada em 50. Em seguida, foi feita a leitura da sua solução paralela (repetição) e de todas as outras soluções.

A quantidade de tiamina foi calculada pela expressão 1, abaixo (NESTLÉ; KING, 1980):

$$T = 4 \times 10^4 (P_{OX} - P_{NOX}) / M_p (50 - \bar{S}_{NOX}) \quad (1)$$

onde:

- T : quantidade de vitamina B<sub>1</sub> em µg/l de produto  
P<sub>OX</sub> : leitura da solução oxidada do produto  
P<sub>NOX</sub> : leitura da solução não-oxidada do produto  
 $\bar{S}_{NOX}$  : leitura média das soluções padrões não-oxidadas  
M<sub>p</sub> : massa inicial do produto em g

Para cada ensaio, o pH era medido no leite cru e no leite pasteurizado, conforme a metodologia descrita na A.P.H.A. (1985).

### 3 -- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leituras obtidas no Fluorímetro Coleman referentes aos produtos e as soluções padrões encontram-se na Tabela 1.

Os teores de tiamina calculados, utilizando a expressão 1, a partir das leituras no Fluorímetro Coleman, encontram-se na Tabela 2.

Com relação as leituras obtidas da Tabela 1, verificamos que as soluções padrões oxidadas, entre dois resultados individuais da mesma amostra, houve reprodutibilidade dos mesmos. Para as soluções padrões não oxidadas, a maior diferença entre os resultados individuais da mesma amostra foi de 12,5%.

Na Tabela 2, os valores obtidos para o leite tipo B cru foram compatíveis com os encontrados na literatura. HADDAD & LOEWENSTEIN (1983) encontraram o valor médio de 202 µg/l para 5 lotes de leite cru no período de 7 meses. VEISSEYRE (1972) e CHEFTEL & CHEFTEL (1976) relatam que o teor de tiamina no leite cru pode variar de 400 a 1000 µg/l devido a variação que ocorre na composição de leite de vaca em função da alimentação, período de lactação, estação do ano, raça, etc. do animal. A Tabela 3, a seguir, compara cada resultado encontrado para o leite tipo B cru com o valor médio, e indica que não houve uma diferença superior a 10,4% entre estes valores, confirmando para o leite tipo B cru a reprodutibilidade do método.

A Tabela 2 mostra também que o pH medido no leite cru variou de 6,64 a 6,73 e no leite pasteurizado variou de 6,65 a 6,73. Como a tiamina é estável em meio ácido (STROHECKER & HENNING, 1967), a perda encontrada não foi devida ao pH.

As Tabelas 2 e 3 indicam diferenças significativas entre os resultados, oscilando de 3,9% a 30,0% em relação ao valor médio, e da ordem de 18,5% a 50,0% de perda da tiamina no leite tipo B pasteurizado devido ao tratamento térmico.

Essas diferenças devem-se sobretudo a própria coleta da amostra e ao efeito das variações do binômio temperatura/tempo (72 a 75°C por 15 a 20 segundos) que ocorrem no processo em escala industrial onde não se tem as condições de controle padronizadas à maneira que se obtém em ensaios de laboratório ou até a nível de escala de planta-piloto.

**TABELA 1 - LEITURAS REALIZADAS NO FLUORÍMETRO COLEMAN CORRESPONDENTES AOS TEORES DE TIAMINA NO LEITE CRU E NO LEITE PASTEURIZADO TIPO B E RESPECTIVAS SOLUÇÕES PADRÕES.**

Amostra	Solução padrão		Leite cru		Leite pasteurizado	
	S <sub>OX</sub>	S <sub>NOX</sub>	P <sub>OX</sub>	P <sub>NOX</sub>	P <sub>OX</sub>	P <sub>NOX</sub>
1	50,0	48,7	50,0	48,2	51,8	50,7
	50,0	48,9				
2	50,0	48,5	49,2	47,1	49,2	48,5
	50,0	49,0				
3	50,0	23,0	57,0	21,0	46,0	19,0
	50,0	21,0				
4	50,0	27,5	64,0	26,0	51,0	20,0
	50,0	22,0				
5	50,0	17,0	60,0	9,5	53,0	13,0
	50,0	15,5				

S<sub>OX</sub> : Leitura com a solução padrão oxidada

P<sub>OX</sub> : Leitura com a solução oxidada do produto

S<sub>NOX</sub> : Leitura com a solução padrão não-oxidada

P<sub>NOX</sub> : Leitura com a solução não-oxidada do produto

**TABELA 2 – PH E TEOR DE TIÂMINA NO LEITE TIPO B, CRU E PASTEURIZADO, E PORCENTAGEM DE PERDA DA TIÂMINA DEVIDO A PASTEURIZAÇÃO.**

Amostra	pH		Tiamina ( $\mu\text{g/l}$ de leite)		% Perda de Tiamina
	Cru	Past.	Cru	Past.	
1	6,64	6,65	500	306	38,8
2	6,73	6,67	467	233	50,0
3	6,63	6,65	430	320	25,6
4	6,73	6,73	503	410	18,5
5	6,73	6,67	500	396	20,8

**TABELA 3 – RELAÇÃO ENTRE O TEOR DE TIÂMINA NO LEITE TIPO B E O SEU VALOR MÉDIO, PARA O CRU E O PASTEURIZADO**

Amostra	Leite cru		Leite pasteurizado	
	tiamina (Tc) ( $\mu\text{g/l}$ leite)	Tc / $\bar{T}_c$	tiamina (Tp) ( $\mu\text{g/l}$ leite)	Tp / $\bar{T}_p$
1	500	1,042	306	0,919
2	467	0,973	233	0,700
3	430	0,896	320	0,961
4	503	1,048	410	1,231
5	500	1,042	396	1,189
Média	$\bar{T}_c =$ 480	1,000	$\bar{T}_p =$ 333	1,000

#### 4 – CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos podemos concluir que o método utilizado empregando a resina trocadora de cátions normalmente usada para leite em pó e para produtos lácteos enriquecidos, é viável para a determinação do conteúdo de tiamina em leite in natura.

O método apresentou uma sensibilidade da ordem de 200  $\mu\text{g/litro}$  de leite para determinar tiamina em leite in natura submetido a tratamento térmico.

O método apresentou reprodutibilidade dos resultados não havendo diferença superior a 12,5% para a solução padrão e 10,0% para o leite tipo B cru.

GRANDI, J.G.; TADINI, C.C. Determination by modified fluorometric method, of Thiamine Loss in commercial pasteurization of whole milk. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.15, n.1, p.48-52, march 1994.

**ABSTRACT:** *This research was undertaken, to check by fluorometric method, the loss of thiamine (Vitamin B<sub>1</sub>) of whole milk by commercial pasteurization. Analytical technique was the fluorometric assay method of the Association of Official Analytical Chemists – AOAC, with some modification, particularly in sample preparation and its purification with cation exchange resin normally used for dried milk or enriched dairy products. Samples of whole, raw and pasteurized milk were analysed and the obtained results for raw milk were comparable to those of literature. For pasteurized milk, there was a loss from 18,5 up 50,0% of thiamine as a result of heat treatment.*

**KEY WORDS:** *thiamine, loss of vitamin B<sub>1</sub>, milk, pasteurization.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 13. ed. Washington, 1980, p. 740-741.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of dairy products*. 15. ed. Washington, 1985, 412 p.

———. *Official methods of analysis*. 15. ed. Washington, 1990. v. 2, p. 1049-1051.

BRASIL. Decreto no. 1255 de 25 de junho de 1962. Inspeção industrial e sanitária do leite e derivados. Capítulo 1: Leite em natureza.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. *Introduction a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1976. v. I, 333 p.

EWING, G.W. *Métodos instrumentais de análise química*. São Paulo: EDUSP, 1972. v. 1.

HADDAD, G.S.; LOEWENSTEIN, M. Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamina, riboflavin and ascorbic acid content of milk. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 66, n. 8, p. 1601-1606, 1983.

KING, R.D. (ed) *Developments in food analysis techniques*. London: Applied Science Publishers, 1980. v. 2, 268p.

NESTLÉ. *Determinação de vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina)*. São Paulo: [s.d.], 8 p.

ROHM and HAAS COMPANY. *Amberlite ion exchange resins Laboratory guide*. Philadelphia: PA 19105, s.d., 45 p.

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. *Análisis de vitaminas; métodos comprobados*. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428 p.

VEISSEYRE, R. *Lactologia técnica [Thechiques Laitières]*. Zaragoza: Acribia, 1972. 643 p.

Recebido para publicação em 27/10/92

## CRYPTOSPORIDIUM SP. EM HUMANO NA REGIÃO RURAL DE LONDRINA - PARANÁ RELATO DE CASO

MARCIA DE AGUIAR FERREIRA BARROS<sup>1</sup>  
ITALMAR TEODORICO NAVARRO<sup>2</sup>  
MARIA CLÁUDIA DE NORONHA DUTRA MENEZES<sup>3</sup>  
SILVIA CRISTINA OSAKI<sup>4</sup>  
CARLA FRANCIS SOUZA<sup>4</sup>

BARROS, M.A.F.; NAVARRO, I.T.; DUTRA-MENEZES, M.C.N.; OSAKI, S.C.; SOUZA, C.F. *Cryptosporidium sp.* em humano na região rural de Londrina-Paraná - Relato de caso. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.15, n.1, p.52-54, março 1994.

**RESUMO:** Foram colhidas 20 amostras de fezes de habitantes de uma propriedade leiteira situada na região rural da cidade de Londrina, Paraná, com faixa etária variando de 02 a 71 anos, no período de Fevereiro a Março de 1993, para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium sp.* e ovos e cistos de outros parasitas. Através de técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen modificada e de Concentração e Flutuação em Sacarose, verificou-se 01 amostra (5%) positiva para *Cryptosporidium sp.*, e pelos Métodos de Faust e cols., e de Hoffman, observou-se a presença dos seguintes parasitas: *Schistosoma mansoni* (5%), *Ascaris lumbricoides* (20%), *Hymenolepis nana* (10%), *Entamoeba coli* (15%), *Endolimax nana* (15%), *Trichocephalus trichiuris* (5%), *Ancylostomatidae* (5%).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cryptosporidium sp.*, *Criptosporidiose*, *Criptosporidiose humana*.

### 1 – INTRODUÇÃO

*Cryptosporidium sp.* é um protozoário atualmente reconhecido como causa de gastroenterites em pessoas imuno-competentes, principalmente crianças, e imunocomprometidos especialmente pacientes aidéticos, nos quais a infecção pode ser crônica e fatal. Uma clara associação entre criptosporidiose animal e infecção criptosporidial em humanos, tem sido estabelecida por vários autores (ANDERSON & BULGIN, 1982; REESE et al., 1982; RAHAMAN et al., 1984; LEVINE et al., 1988; CASEMORE, 1989; NAGY et al., 1989; REIF et al., 1989; EL-AHRAF et al., 1991; MIRON et al., 1991; NOURI et al., 1991), que reconhecem nos animais infectados especialmente bovinos, uma fonte de

infecção em potencial para humanos.

Assim sendo, o presente trabalho objetivou observar a ocorrência do *Cryptosporidium sp.* em amostras fecais de habitantes de uma propriedade leiteira da cidade de Londrina, através das técnicas de Coloração de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981) e de Concentração e Flutuação em Sacarose (SHEATHER, 1923), tendo em vista a ocorrência de diarreia em bezerros causada pelo protozoário na mesma propriedade (FREIRE, 1993 - Comunicação Pessoal).

As amostras foram ainda submetidas a exames coprológicos de rotina para pesquisa de ovos e cistos de outros parasitas.

1 - Mestranda do Curso de Sanidade Animal e Saúde Pública Veterinária - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/CCA - Universidade Estadual de Londrina - Caixa Postal 6001 - Londrina-Paraná, Brasil, CEP 86051-970 - Fone: (043) 321-2000 - Ramal: 4485

2 - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/CCA - Universidade Estadual de Londrina.

3 - Departamento de Patologia Geral/CCB - Universidade Estadual de Londrina

4 - Bolsistas Iniciação Científica CNPq - Medicina Veterinária