

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA
Diretor: Prof. Fonseca Ribeiro

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
Diretor: Prof. Interino Paulo M. G. de Lacerda Junior

NEUTRALIZAÇÃO DA TOXINA TETÂNICA PELA CLOROFILA HIDROSSOLÚVEL

(NEUTRALIZATION OF TETANIC TOXINE BY HYDRO-SOLUBLE
CHLOROPHYLL)

FONSECA RIBEIRO

PAULO M. G. LACERDA JR.

Em 1942, FONSECA RIBEIRO e GUIMARÃES ⁽¹⁾ apresentaram suas primeiras observações sobre a neutralização da toxina tetânica e do veneno crotálico, pelo clorofilinato de potássio.

Para a toxina tetânica, verificaram uma proteção contra 3 D.M.M., injetando a toxina misturada com solução aquosa de clorofilinato de potássio, admitindo também a possibilidade de permanência do poder antigênico.

Procurando ampliar essas observações, resolvemos verificar:

- a) Se uma toxina tetânica poderia ser desintoxicada “in vitro” e em que tempo.
- b) Se na desintoxicação “in vitro” a toxina seria destruída ou somente neutralizado sem poder tóxico, conservando-se o caráter antigênico.

PARTE EXPERIMENTAL

Para verificar quantas D.M.M. seriam neutralizadas por uma quantidade fixa de clorofila, utilizamos cobaias de 350 gramas. Partindo de uma toxina seca, foi preparada uma solução em glicerina a 50%, a qual diluiu-se de modo a conter 10, 100, 500, 750 e 1000 D.M.M. em um volume de 0,75 cm³; juntou-se, a cada uma dessas doses, 0,5 cm³ de uma solução a 1% de clorofila hidrossolúvel de May and Baker Ltd.. Após contacto de 15 minutos, ao abrigo da luz, os animais eram injetados com a mistura, por via intramuscular.

Com a mesma toxina, foi feita uma diluição, sem clorofila, de modo a conter 1 D.M.M., com a qual foram injetadas as cobaias testemunhas. Os resultados obtidos estão expressos no quadro I.

QUADRO I

Ação desintoxicante da clorifila sobre a toxina tetânica

Cobaia de 350 g	D.M.M.	R e s u l t a d o			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1	10	0	0	0	0
2	10	0	0	0	0
3	100	0	0	0	0
4	100	0	0	0	0
5	500	0	0	0	0
6	500	0	0	0	S
7	500	0	0	0	S
8	500	0	0	0	0
9	500	0	0	0	0
10	500	0	0	0	0
11	500	0	0	0	0
12	750	S	S	S	+
13	750	S	S	S	+
14	750	S	S	S	+
15	750	S	S	S	+
16	750	S	S	S	+
17	1000	S	S	+	
18	1000	S	+		
19	1000	S	S	+	
20	1000	S	+		
21	1000	S	+		
22		S	S	S	+
23		S	S	S	+
24	Testemunhos	S	S	S	+
25	(1 D.M.M.)	S	S	S	+
26		S	S	S	+
27		S	S	S	+

Nota: 0 = ausência de sintomas; S = sintomas de tétano; + morte.

Verifica-se, por êste quadro, que 0,5 cm³ da solução aquosa de clorofilinato de potássio a 1% foi suficiente para neutralizar o efeito tóxico de 500 D.M.M.

de toxina tetânica; para 750 D.M.M., o efeito protetor da clorofila não mais se manifestou, nas mesmas condições.

Tendo consignado êstes resultados, decidimos verificar a possibilidade de desintoxicar uma toxina tetânica, pelo contacto com clorofila hidrossolúvel, em estufa.

Tomamos então 100 cm³ de toxina tetânica (D.M.M. para cobaia = 1/15.000) e adicionamos 1 grama de clorofila hidrossolúvel, prèviamente esterilizada em autoclave, por 20 minutos, a 115°C.

Essa mistura de toxina com clorofila foi conservada em estufa a 37°C e amostras diárias eram tiradas para acompanhar a desintoxicação. Depois de têrmos obtido a desintoxicação de mais de uma partida, verificamos que a desintoxicação total era obtida após uma permanência de 8 a 10 dias, na estufa.

A toxina tetânica assim tratada, inoculada em cobaias de 350-400 gramas, na dose de 1 cm³, não mais foi capaz de provocar sinais de tétano.

Obtido assim um número razoável de animais injetados nessas condições, 30 dias após, mais ou menos, receberam os mesmos de 5 a 10 D.M.M., injetadas por via subcutânea, cujos resultados estão expressos no quadro II.

QUADRO II

Conservação do poder antigênico da mistura toxina tetânica e clorofila hidrossolúvel

Cobaias injetadas com 1 cm ³ de toxina-clorofila	Reinjetadas com 5 D.M.M. (19 cobaias)		Reinjetadas com 10 D.M.M. (13 cobaias)	
	sobrevivem	morrem	sobrevivem	morrem
32	13	6	6	7

4 cobaias testemunhas injetadas com 1 D.M.M. morrem em 96 horas

Êstes resultados indicam que, dos animais que receberam a injeção de toxina tetânica desintoxicada pela clorofila hidrossolúvel, 68,4% resistiram à subsequente inoculação de 5 D.M.M. e 46,1% resistiram a 10 D.M.M..

Com o fim de verificar se a desintoxicação da toxina tetânica pela clorofila poderia depender mais do fator luz do que do fator temperatura (estufa a 37°C, escuro), foram preparados dois frascos com 0,5 g de clorofila e 100 cm³ de toxina tetânica (0,25 cm³ da diluição a 1:50.000 = 1 D.M.M. camundongo). Um dos frascos foi conservado na estufa a 37°C (escuro) e o outro foi mantido na luminosidade e temperatura ambientes.

De ambos os frascos foram retiradas amostras em tempos sucessivos, a fim de testar a toxicidade em camundongos, como se vê no quadro III.

QUADRO III

Comparação da ação desintoxicante da clorofila sobre a toxina tetânica na luz em condições ambiente, e no escuro a 37°C (as doses injetadas em cada animal foram 0,25 cm³ das diluições correspondentes)

Tempo de contacto da mistura	N.º de ordem dos animais		Diluição	Sobrevida dos animais			
	Material da estufa	Material em ambiente		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
2 horas	1	—	1:50.000	0	S	S	+
	2	—		0	S	S	+
	—	3		0	S	S	+
	—	4		0	S	S	+
24 horas	5	—	1:50.000	0	0	0	0
	6	—	1:50.000	0	0	0	0
	7	—	1:40.000	0	0	0	0
	8	—	1:40.000	0	0	0	0
	—	9	1:50.000	0	S	S	+
	—	10	1:50.000	0	S	S	+
	—	11	1:40.000	0	S	S	+
	—	12	1:40.000	0	S	S	+
48 horas	13	—	1:30.000	0	0	0	0
	14	—	1:30.000	0	0	0	0
	15	—	1:20.000	0	0	0	0
	16	—	1:20.000	0	0	0	0
	—	17	1:50.000	0	0	S	S
	—	18	1:50.000	0	0	S	S
	—	19	1:40.000	0	S	S	S
	—	20	1:40.000	0	S	S	S

Nota: 0 = ausência de sintomas; S = sintomas de tétano; + morte.

O quadro III evidencia que a desintoxicação da toxina tetânica pela clorofila hidrossolúvel se processa com mais velocidade na mistura colocada a 37°C no escuro do que na mistura mantida na luz e temperatura ambiente. É assim que se verifica que, com 48 horas de contacto, a mistura conservada a 37°C já não mostrava toxicidade a 1:20.000, enquanto no mesmo espaço de tempo, a mistura deixada no ambiente ainda possuía efeitos tóxicos na diluição a 1:50.000.

DISCUSSÃO

A desintoxicação de toxinas microbianas, assim como de venenos ofídicos por intermédio de várias substâncias dotadas de ação fotoquímica, tem sido amplamente descrita na literatura; as substâncias tóxicas, perdendo o caráter letal, perdem também a propriedade antigênica. A simples irradiação dos venenos de cobra determina a destruição dos mesmos, como foi demonstrado por ARTHUS⁽²⁾, talvez pela coexistência, nestes venenos, de substâncias fluorescentes, conforme verificaram TABORDA e TABORDA⁽³⁾. Um detalhe interessante, no particular, foi acrescentado por EIDINOW⁽⁴⁾; trabalhando com o veneno de naja, observou que sua destruição só ocorre nos comprimentos de onda compreendidos entre 300 e 2.800 Å, a não ser que a solução do veneno seja misturada com eosina, antes da irradiação, passando então a ser destruído com maiores comprimentos de onda.

Para todos êsses casos, como também nas verificações de SHORTT e MALLICK⁽⁵⁾ com o azul de metileno, existe necessidade da irradiação do veneno puro ou misturado com a substância fotossensibilizadora, para que haja destruição do poder tóxico, destruindo-se também o poder antigênico.

Nas nossas experiências com a clorofila hidrossolúvel, o fenômeno se passa de maneira diferente, não só porque não há necessidade de irradiação da mistura toxina-clorofila, como também porque a toxina desintoxicada conserva ainda a propriedade antigênica. Não se pôde, até o presente, estabelecer um paralelo entre a toxina desintoxicada pela clorofila e a anatoxina (desintoxicação pelo aldeído fórmico), mas não resta dúvida em que o processo da clorofila é muito mais rápida, exigindo aproximadamente um terço do tempo necessário para a obtenção da anatoxina.

RESUMO

Confirmando o trabalho de FONSECA RIBEIRO e GUIMARÃES, os AA. demonstraram mais que, com 15 minutos de contacto, 0,5 cm³ de clorofila hidrossolúvel a 1% neutraliza 500 D.M.M. de toxina tetânica; que 100 cm³ de toxina tetânica (1 cm³ = 15.000 D.M.M. cobaia) em contacto com 1,0 g de clorofila hidrossolúvel, na estufa a 37°C, perde totalmente sua toxicidade, ao cabo de 8-10 dias, conservando o poder antigênico: 32 cobaias injetadas com 1 cm³ cada, da toxina desintoxicada pela clorofila, são injetadas 30 dias depois, com 5 e 10 D.M.M. de toxina, sobrevivendo, respectivamente, 68,4% e 46,1%; demonstraram ainda que o fator luz é menos importante do que o fator temperatura (estufa 37°C) na desintoxicação da toxina tetânica pela clorofila hidrossolúvel.

SUMMARY

Confirming the studies of FONSECA RIBEIRO and GUIMARÃES, the authors showed besides that with a contact for 15 minutes, 0.5 ml. of hydro-soluble chlorophyll at 1% neutralizes 500 M.L.D. of tetanic toxine; that 100 ml. of tetanic toxine (concentration of 1 ml. = 15,000 M.L.D. guinea pigs) in contact with 1,0 g. of hydro-soluble chlorophyll in the incubator at 37°C. loses completely its toxicity in from 8 to 10 days, while still keeping its antigenic quality: 32 guinea pigs injected with 1 ml. each of this toxin, detoxicated by chlorophyll, were injected 30 days after with 5 and 10 M.L.D. of toxine, and 68.4% and 46.1%, respectively, survived; the light factor is of less importance than the temperature factor (incubator 37°C.) in the detoxication of tetanic toxine by the hydro-soluble chlorophyll process.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — FONSECA RIBEIRO, D. e GUIMARÃES, I. M. — 1942 — Estudo sôbre a ação anti-tóxica da clorofila: Primeiros resultados com o veneno crotálico (*Crotalus terrificus terrificus*) e toxina tetânica — *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, 2, 3-11.
- 2 — ARTHUS, A. — 1930 — Le venin de cobra rendu inoffensif par l'action des rayons ultra-violets a perdu son pouvoir immunisant. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 103, 130-2
- 3 — TABORDA, A. R. e TABORDA, L. C. — 1941 — Da relação entre o corante dos venenos de cobra e a sua fluorescência. *Mem. Inst. Butantan*, 15, 47-55
- 4 — EIDINOW, A. — 1930 — The effect of irradiation on cobra venom and antivenin. *British Jour. Exp. Path.*, 11, 64-72
- 5 — SHORTT, H. E. and MALLICK, S. M. K. — 1935 — Detoxication of snake venom by the photodynamic action of methylene blue. *Ind. Jour. Med. Res.*, 22, 529-36