

1507

INSTITUTO DE BUTANTAN
SERVICO SANITARIO DO ESTADO DE S. PAULO

Das pseudo-globulinas especificas dos Sôros

(ANTI-TOXINAS),
SEU PREPARO E SEU EMPREGO EM THERAPEUTICA

MEMORIA APRESENTADA AO 1º CONGRESSO MEDICO PAULISTA,
REALISADO EM S. PAULO EM 1916.

PELO

DR. VITAL BRASIL

DIRECTOR DO INSTITUTO



SECÇÃO DE OBRAS DO
"O ESTADO DE S. PAULO"
SÃO PAULO-1917

INSTITUTO DE BUTANTAN
SERVIÇO SANITÁRIO DO ESTADO DE S. PAULO

Das pseudo-globulinas específicas dos Sôros

(ANTI-TOXINAS).

SEU PREPARO E SEU EMPREGO EM THERAPEUTICA

MEMÓRIA APRESENTADA AO I.º CONGRESSO MÉDICO PAULISTA
REALISADO EM S. PAULO EM 1916.

PELO

DR. VITAL BRASIL

DIRECTOR DO INSTITUTO



SECÇÃO DE OBRAS DO
"O ESTADO DE S. PAULO"
SÃO PAULO-1917

DAS PSEUDO-GLOBULINAS ESPECÍFICAS (ANTI-TOXINAS) DOS SÓROS SEU PREPARO E SEU EMPREGO EM THERAPEUTICA

Pelo Dr. Vital Brazil, director
do Inst. Sorotherapico do E. de
São Paulo (Butantan).

Admittida a importancia da anti-toxina na função terapeutica dos sôros específicos, era natural que se procurasse isolá-la das outras proteínas contidas no plasma. Este problema tem preocupado um grande numero de investigadores e tem constituido objecto de inumeros trabalhos.

Ehrlich e Brileger tentaram isolar em 1893 a anti-toxina do leite dos animaes imunes. Foi Smirnow quem primeiro, em 1895, procurou isolar a anti-toxina do sôro do cavalo, mostrando que a substancia activa era precipitada com as globulinhas, quando se tratava o sôro, até a saturação, pelo sulfato de magnesio. Brileger e Böer, em 1896, precipitaram as globulinhas ajuntando ao sôro saes neutros dos metais pesados e encontraram a anti-toxina nessa proteína.

Aronson, em 1897, estabeleceu que a globulina precipitada por dialyse continha anti-toxina. Dieudonné constatou que as globulinhas precipitadas pelo ácido carbonico eram des-

provistas de anti-toxinas. O precipitado proteinico obtido por estes dois ultimos experimentadores corresponde à substancia do soro actualmente classificada com a designação de euglobulina. Brodl, em 1897, separou as globulinas em 4 fracções pela adição progressiva do sulfato de ammonio a mela saturação, verificando em todas elas a presença de anti-toxina.

Belfanti e Carbona, Freund e Steuburf, Marcus, Hiss, Atkinson e outros confirmaram os resultados de Brodl e Dieudonné Atkinson, em 1900, que, saturando pelo chiorureto de sodio uma solução de globulina e tratando-a pelo calor, conseguiram diferenciar em varias fracções contendo anti-toxina.

Pick, em 1901, tentou diferenciar a porção activa do soro por precipitação fracionada com sulfato de ammonio. Pröscher tentou isolar e estabelecer a natureza não proteinica da anti-toxina, fazendo digerir soro pela trypsinia, acreditando que deste modo obtinha uma solução contendo anti-toxina livre de proteína. Banzhaf e Melamby, procurando separadamente repetir as pesquisas de Pröscher, não puderam confirmar os seus resultados. A medida que a digestão da proteína se fazia a anti-toxina era destruída. Sem ter conhecimento dos trabalhos anteriores, o Instituto de Butantan ocupou-se desde 1906 do assumpto, conseguindo preparar soluções de globulinas anti-toxicas pelo metodo de precipitação do soro pelo sulfato de magnesio. Os protelos dos sors anti-pegonamentos, do anti-diphterico e do anti-pestoso foram separados em dois grupos. De um lado as globulinas e de outro as serinas ou sero-albuminas. Enquanto que as globulinas conservaram todo o poder anti-toxico e therapeutico, as sero-albuminas eram completamente inactivas. Verificamos, além disso, que enquanto as soluções de globulina eram perfeitamente supportadas pelos animaes, por injecções endovenosas em doses exageradissimas, as de sero-albumina revelaram-se eminentemente toxicas, podendo determinar a morte em prazo mais ou menos longo conforme a dose empregada. Esses resultados foram consignados em uma memoria, sob o título "Das globulinas e serinas dos sors anti-toxicos", que tivemos a honra de apresentar ao Sexto Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia, reunido nesta Capital, em 1907.

Nesse trabalho chegámos às seguintes conclusões: 1.^a As globulinas dos sors anti-toxicos possuem exclusiva e integralmente a actividade destes. 2.^a A serina, bem como outros elementos que entram na composição dos sors, são inutels

e até prejudiciais; 3.º O emprego total do sôro em therapêutica deverá ser substituído pelo da globulina correspondente.

Estas conclusões ainda podem ser sustentadas. O método porém, que então empregavamos para separação não era prático e tinha o grave defeito de aproveitar proteínas que ainda podiam ser eliminados sem prejuízo das anti-toxinas contidas nas globulinas.

Foi Gibson quem separou das globulinas uma parte inativa — a euglobulina e outra contendo a anti-toxina — a pseudoglobulina. Tratando o precipitado de globulinas, obtido pelo sulfato de amônio a meia saturação, por solução saturada de clorureto de sódio, verificou que a parte insolúvel era constituída por euglobulina, enquanto que a que se dissolvia era a pseudoglobulina, que podia ser precipitada pelo ácido acético e dialysada em seguida.

Este processo que já realizava um grande progresso na purificação dos sôros anti-toxicos, permitindo um aumento de cerca de 2 e meia vezes a potência original, ainda foi aperfeiçoado por Gibson e Banzhaf, que conseguiram por precipitações fracionadas pelo sulfato de amônio separar completamente a pseudoglobulina ativa. Este último método deu resultados tão satisfatórios que substituiu completamente os outros que o precederam.

Banzhaf, aperfeiçoando ainda o seu método de purificação dos sôros, estabeleceu a seguinte técnica que lhe permite aumentar de 5 a 7 vezes o valor anti-toxico do sôro:

Método de Banzhaf — O plasma citratado é diluído em metade do seu volume d'água e a cada 7 partes desta diluição adicionam-se 3 partes de solução saturada de sulfato de amônio. Isto dilui o plasma de sorte que a solução possa conter um pouco menos da metade da quantidade de proteínas do plasma original.

O plasma dos cavalos immunizados contém de 8 a 10 % de proteínas.

O plasma diluído do modo indicado conterá de 4 a 5 % de proteínas.

Com esta quantidade de proteína a adição de 30 % da solução saturada de sulfato de amônio precipitará, quando a mistura for aquecida, toda a fibrina e toda a euglobulina. Se o plasma original conter 10 % de proteínas, uma pequena quantidade de pseudoglobulina e de anti-toxina serão tam-

bem precipitadas. A quantidade de anti-toxina perdida é tão pequena, que poderá ser desprezada.

Em via de regra, quando grandes partidas de plasma, de diferentes sanguinas e diferentes cavalos, são empregadas, a quantidade media de proteinas não excederá a 9 %, não se dando a precipitação de anti-toxina, nem se verificará a presença de euglobulina na solução. O plasma diluído contendo 30 % da solução saturada de sulfato de ammonio é aquecido até 60° C. em vasos esmaltados de 30 litros de capacidade. O banho maria em que se collocam estes vasos pode ser mantido a 66° C. A duração do aquecimento da solução plasma-sulfato de ammonio, isto é, o tempo necessário a elevar a 60° C., deve ser de cerca de 2 horas para se conseguir o melhor resultado. É indispensável manter-se coberto os vasos durante o aquecimento, afim de evitar a perda de agua por evaporação. Se isto ocorresse, a concentração de sulfato de ammonio seria augmentada e certa porção de anti-toxina seria precipitada. É também indispensável agitar a mistura frequentemente para que o aquecimento se dê uniformemente. Logo que a mistura alcance a temperatura de 60° C., os vasos devem ser removidos do banho e o conteúdo filtrado imediatamente. Os funis de vidro e os vasos de precipitação, se estes são usados para filtração, devem ser aquecidos préviamente, para não se quebrarem em contacto com a mistura quente do plasma e sulfato de ammonio. A filtração deve ser muito rápida. Oitenta litros distribuídos em 10 funis são filtrados em menos de duas horas. O precipitado que contém a fibrina e a euglobulina pode reter ainda quantidade considerável de líquido, tendo em dissolução pseudo-globulina e anti-toxina. Há varios methodos para se aproveitar esse líquido. Um methodo muito pratico é comprimir o precipitado do mesmo modo que o precipitado final de pseudo-globulina e anti-toxina, mas neste caso recolhendo o líquido que corre. Este methodo dá bons resultados, é muito rápido, mas requer uma certa prática para se aproveitar todo o líquido com a necessaria limpidez. Este líquido limpidão é naturalmente adicionado ao filtrado principal. Outro meio de se aproveitar o líquido do precipitado, quando não houver as mesmas facilidades de pressão, consiste em adicionar agua contendo 33 % de solução saturada de sulfato de ammonio aos funis, que contêm os precipitados, com o fim de lavá-los. Melhor seria colocar o precipitado na agua contendo sulfato de ammonio, misturar bem os filtros. O filtrado resultante pôde então

ser adicionado ao filtrado principal. Convém lembrar que esta lavagem deve ser feita com água contendo 33 % de solução saturada de sulfato de amônio e não 30 %. A razão desta prática é que a solubilidade de euglobulina é aumentada pelo facto de haver menos proteína na solução. A porcentagem de sulfato de amônio na mistura dos filtrados pode ser tomada como sendo de 30 %. Adiciona-se agora à mistura dos filtrados, a quantidade de solução saturada de sulfato de amônio suficiente para elevar a 50 % a sua porcentagem na mistura. O precipitado resultante conterá toda a pseudo-globulina e a anti-toxina. Depois da filtração este precipitado é comprimido para remover-se o excesso de líquido. A massa resultante da compressão é dialysada até a eliminação completa de sulfato de amônio. Ao líquido dialysado, constituído por solução pura de pseudo-globulina anti-toxica, junta-se 8 por mil de clorureto de sódio e 0,4 % de tricresol.

Methodo de P. G. Heinemann — Inicia, como no methodo de Banzhaf, diluindo o plasma citratado ou oxalatado, em metade do seu volume de água e ajoutando 3 partes da solução saturada de sulfato de amônio para 7 partes do plasma diluído. A mistura é lentamente aquecida num banho maria a 60° C e mantida nessa temperatura durante 30 minutos, sendo então filtrada ainda quente. Depois da filtração os filtros com o precipitado são collocados em vásos apropriados e cobertos por quantidade medida de água. Por agitação frequente, obtém-se um líquido espesso bem homogêneo. A este líquido adiciona-se uma quantidade de solução saturada de sulfato de amônio igual à metade do volume de água empregada. Depois de uma agitação, completa a mistura, é colocada em filtros e o filtrado misturado com o primeiro filtrado.

Finalmente os filtros são cheios duas vezes com solução saturada de sulfato de amônio, diluída no duplo do seu volume de água. O filtrado contém os últimos restos da anti-toxina e pode ser misturado com os filtrados anteriores. A esta mistura de filtrados é adicionada a solução saturada de sulfato de amônio suficiente para elevar a sua saturação a 50 %.

Não é necessário misturar-se os diferentes filtrados. Cada um pode ser precipitado, separadamente, com vantagem. Desde que os últimos filtrados são mais diluidos que o

primeiro, podem servir para retirar, por lavagens das proteínas não anti-toxicas do precipitado retido nos filtros, o restante das anti-toxinas. Este precipitado é amarellado ou pardo amarellado e o filtrado de igual cor. Depois de cessada a filtração, os filtros com os precipitados são agitados numa quantidade medida de agua; depois da solução o líquido é coado em pano de espremer queijo e a polpa restante do papel espremida. Esta polpa espremida é outra vez misturada com uma quantidade medida de agua, coada ou espremida; sendo este processo repetido uma terceira vez. Todas as globulinas são lavadas do papel por este método. Os líquidos coados são misturados e a mistura adicionada de um volume de solução saturada de sulfato de ammonio igual à quantidade total da agua usada para solução dos precipitados. O precipitado resultante desse tratamento é de novo recolhido em filtros. O precipitado e o filtrado são agora de cor muito mais clara do que depois da primeira precipitação. O precipitado deve ser dissolvido e precipitado uma 2.^a ou mesmo uma 3.^a vez, até que seja verde azulado e o filtrado sem cor. Enquanto o filtrado for amarelo ou pardo amarellado é que existem proteínas não anti-toxicas. O precipitado pode agora ser comprimido e dialysado. Na maior parte dos casos obtém-se melhores resultados quando o aquecimento é aplicado segunda vez. Para este fim o precipitado é dissolvido numa quantidade medida de agua, coado, comprimida a polpa como acima e o líquido medido. Este é certamente de maior volume que a quantidade de agua adicionada para a solução do precipitado, por causa do volume ocupado pelo precipitado e pela presença de certa quantidade de solução de sulfato de ammonio a 50 % no precipitado húmido. Pode-se admittir que a diferença em volume seja representada pela existência de metade de solução saturada de sulfato de ammonio no volume total do líquido coado, ainda que essa quantidade seja realmente um pouco menor, e sobre esta base adiciona-se a quantidade de solução saturada de sulfato de ammonio necessária para elevar a saturação do líquido a 30 %. Um precipitado muito leve se formará se a quantidade de sulfato de ammonio for suficiente. Se não aparece este precipitado, deve-se adicionar mais solução de sulfato de ammonio até que se produza a leve turvação. Esta mistura é então aquecida a 60° C outra vez e conservada nesta temperatura durante 15 minutos. É então filtrada enquanto quente e o precipitado lavado como acima. Os filtrados misturados são ad-

dicionados de solução de sulfato de amônio até 50 % deste sal e o precipitado recolhido em filtros finos. A cor do precipitado é agora verde azulada. Separada por compressão de toda a porção de líquido que ainda possa reter, a massa resultante é levada ao dialysador e tratada como no método Banzhaf.

A pseudoglobulina assim obtida é muito anti-toxica e passa com facilidade no filtro Berkefeld, porque não é muito viscosa. Por este processo obteve o autor sôros dosando 800 a 900 unidades e num caso 1.000 unidades, partindo de um plasma dosando menos de 200 unidades e provavelmente apenas um pouco mais de 100 unidades.

Frequentemente a solução de pseudoglobulina nesta fase é turva. Isto parece ocorrer quando o sangue é obtido de cavalos velhos ou de cavalos sangrados a branco. Um sôro deste gênero pode ser clarificado completamente pelo seguinte método: É diluído no duplo do seu volume de água e adicionado da solução saturada de sulfato de amônio na proporção de 7 para 3. A mistura é aquecida a 60° C e filtrada ainda quente. O precipitado que fica no filtro é dissolvido em água, adicionando-se depois solução saturada de sulfato de amônio até 1/3 de saturação. A mistura é filtrada e os filtrados ajuntados como no primeiro processo. As pseudoglobulinas são precipitadas pela solução saturada de sulfato de amônio até 50 % de saturação. O precipitado quando recolhido nos filtros finos é intensamente verde azulado e depois da dialise a solução é sempre perfeitamente limpida. Por este método de dupla concentração obteve Helmemann sôros de 1.200 a 1.400 — e num caso de 2.000 unidades, partindo de plasmas que dosavam menos de 300 unidades.

Método de Annie Homer — O plasma ou sôro, diluído em 1/3 ou mesmo 1/5 do seu volume de água é adicionado de clorureto de sódio (1,5 a 2 %) e aquecido a 56° - 57° C durante 15 horas ou a 57° - 58° C durante 8 horas. O plasma aquecido é então adicionado de sulfato de amônio até 30 % da saturação e a mistura é aquecida a 61° C e conservada nessa temperatura apenas por alguns minutos. A mistura depois de resfriada a 40°-45° C é filtrada. O precipitado lavado com solução de sulfato de amônio a 33 % da saturação. O líquido de lavagem depois de filtrado é adicionado ao precedente filtrado e o todo adicionado de sulfato de am-

monio até 50 % de saturação. O precipitado resultante é re-colhido no filtro, espremido e dialysado. O precipitado comprimido tem uma cor amarellada e não a cor verde azulada do producto de Banzhaf. Ao producto de dialyse são adicionadas as quantidades necessarias de chlorureto de sodio e de preservativo. O producto é pardo amarellado e não apresenta traços de suspensões opalescentes.

A autora diz ter conseguido, por esse methodo, uma concentração equivalente até nove vezes o valor anti-toxico original.

O methodo de Helmemann não differe essencialmente do de Banzhaf, senão pela insistencia com que repete as operações de dissolução e precipitação dos proteïdos, com o fim de aproveitar no maximo a anti-toxina scarretada pela pseudoglobulina.

O Instituto só tem empregado até aqui o methodo de Banzhaf. Os resultados têm sido satisfactorios. Partindo de um sôro anti-diphterico dosando pouco mais de 200 unidades conseguimos elevar-o a 1.100 unidades por centímetro cubico; noutro caso com um sôro de 300 unidades elevamo-lo a 1.200 unidades. Com sôros mais elevados os resultados não foram tão bons. Na comutado em todos os casos elevação do valor anti-toxico. Pelo mesmo methodo temos concentrado o sôro anti-tetânico, o anti-crotalico, o anti-ophidico, o anti-bothropico e o anti-pestoso. Quanto ao methodo de Anuie Homer ainda não foi experimentado no Instituto. E' entretanto, de uma grande simplicidade, parecendo-nos que deve ser o preferido se der o resultado pratico indicado pela autora, porque, além de tudo é mais economico por exigir menor quantidade de sulfato de ammonio.

Baseando-se todos os methodos de purificação ou concentração dos sôros na separação da pseudoglobulina, por acarretar essa substancia em sua precipitação de plasma, a anti-toxina nesse contida, era natural que se pesquisasse qual a variação dessa e de outras proteinas no sangue dos animaes durante o periodo de immunisaçao. Atkinson, Ledingham, Reng e Joachim observaram que durante o periodo de immunisaçao ha certas mudanças quantitativas características

nas proteinas do plasma sanguíneo. As globulinas nesse conteúdo são notavelmente aumentadas mesmo até o duplo da quantidade normal, enquanto que há uma diminuição de albumina. Atkinson mostrou que esse aumento de globulina é até certo ponto proporcional à potência anti-toxica do soro. Ledingham estudou o soro obtido a curtos intervalos, de dois cavalos de capacidade diferente na produção da anti-toxina, verificando que naquele que dava soro fraco, fraco era o aumento de globulinas, enquanto no produtor de soro alto o aumento de globulinas se fazia progressivamente na relação do aumento do poder anti-toxico. Ledingham e Joachim estabeleceram que o aumento das globulinas se verificava principalmente nas euglobulinas. Banzhaf fez a crítica dos trabalhos destes últimos experimentadores, mostrando que as conclusões a que haviam chegado não podiam ser aceitas, porquanto o método que empregaram para diferenciação das euglobulinas e pseudoglobulinas dava resultados errôneos. Acompanhou as mudanças quantitativas de proteína no plasma de 11 cavalos, estabelecendo que o aumento se verificava sempre na pseudoglobulina na proporção variável de 45 a 120 por cento; que a perda de albumina era de 25 a 85 por cento; que o aumento de proteína atingia o mais alto grau, cerca de 2 meses depois do tratamento, não guardando uma relação directa com o número de unidades contidas no soro. Constatou mais que tres meses depois do tratamento, as proteinas decresciam, sem baixarem contudo à quantidade normal, ainda mesmo que se fizessem grandes sangrias semanais. No animal que produziu soro mais anti-toxico — 850 unidades — a albumina se apresentou 75 % mais baixa do que a quantidade normal e a pseudoglobulina 95 % mais alta.

Há um outro que não alcançou senão 125 unidades o decrescimento de albumina foi de 55 % e o aumento da pseudoglobulina de 85 %.

Ficou assim demonstrado que o decrescimento da albumina e o aumento da pseudoglobulina não guardam uma relação directa com o poder anti-toxico do soro. É preciso considerar aqui que durante o processo de imunização não é só a anti-toxina que se produz no organismo animal, mas que outros anti-corpos se formam à custa do mesmo estímulo e podem igualmente influir sobre a variação das proteinas no plasma. Em via de regra os antigenos empregados na imunização são extremamente complexos no ponto de vista

chímico e desta complexidade resulta naturalmente a multiplicidade de anti-corpos, que podem influir sobre a variação das proteinas.

Sendo scarretadas as anti-toxinas pelas pseudoglobulinas, nas precipitações para concentração dos sôros e verificando-se o aumento dessas proteinas em proporção às vezes superior a cento por cento, esse aumento foi um grande embarraco para a concentração da actividade anti-toxica, visto ficar muito reduzida a quantidade de proteinas a serem eliminadas por inactivas. De facto, as proteinas do sôro normal de cavalo contém em média 42 % de pseudoglobulina, 18 % de euglobulina e 40 % de albumina. Se essa proporção de proteinas fosse conservada no plasma do animal immune, teríamos a eliminação de 58 % de substancias albuminoides inactivas. Infelizmente esse facto não se verifica, porque, como dissemos, dá-se uma alteração quantitativa na composição proteínica do sangue dos animaes submettidos ao processo de immunisaçao, alteração que se traduz por um aumento notável da substancia activa que deve ser conservada, e uma diminuição das inactivas que devem ser eliminadas. Assim o plasma de um cavalo immunizado apresenta em media 78 % de pseudoglobulina, 10 % de euglobulina e 12 % de albumina, o que nos autoriza a avaliar em 15 % a 25 % o maximo de proteinas elimináveis.

Foi uma observação de Stark relativa à influencia do aquecimento sobre a albumina do ovo que forneceu mais um elemento precioso na purificação dos sôros. Stark constatou, com effeito, que quando se aquece a albumina do ovo durante uma hora a 56°, uma parte dela era convertida em globulina. Banshaf applicando esta noção ao aquecimento do sôro anti-toxico verificou as seguintes mudanças: a albumina que era 12 %, ficou reduzida a 9 %; a pseudoglobulina em vez de 78 % ficou reduzida a 50 % e a euglobulina ao invés de 10 % elevar-se a 41 %.

Iesta sorte com a elevação do coefficiente de euglobulina eliminável, foi possível obter-se um grão de concentração anti-toxica muito mais elevado do que pelo mehodo de sim-
ples precipitações fraccionadas pelo sulfato de ammonio.

Foi o Dr. Park quem primeiro ensaiou no tratamento de doentes de diphtheria a solução de pseudoglobulina anti-

toxica. O primeiro producto ensaiado foi o obtido pelo metodo Gibson-Banzhaf.

Comparando esse producto com o soro completo, não só com relação à ação curativa, como com relação aos fenômenos de intoxicação pelo soro, Park chegou à conclusão de que diferença alguma sensível poderia ser estabelecida entre um e outro.

Posteriormente outras experiências foram levadas a efeito com solução de pseudoglobulinas mais puras, obtidas pelo metodo aperfeiçoado de Banzhaf. Os resultados foram tão satisfatórios que o Instituto de Pesquisas de New-York, dirigido pelo Dr. Park, resolveu entregar ao consumo exclusivamente aquele producto, em vez do soro completo. O seu exemplo foi seguido por outros institutos do país, e dentro de pouco tempo generalizou-se. Hoje quasi que não se empregam nos Estados Unidos senão sors concentrados, quer se trate dos sors anti-toxicos, quer se trate dos anti-bacillares. Na Inglaterra, o Instituto de Lister prepara soluções de globulinas para o aproveitamento dos sors baixos. Na Dinamarca Madsen também concentra os sors inferiores.

Sors anti-diphtericos concentrados no Instituto de Buntan están sendo empregados, nesta Capital, no Hospital de Isolamento, ao mesmo tempo que sors completos de valores anti-toxicos comparáveis. Estas experiências, feitas sob a criteriosa observação do Dr. Arantes, medico interno do estabelecimento, serão relatadas por aquele distinto collega. Podemos, entretanto, adiantar que os resultados têm sido satisfatórios.

Quando se trata de indagar se haverá vantagens em substituir-se definitivamente os sors therapeuticos completos por sors refinados ou soluções de globulinas, verifica-se que a questão poderá ser examinada sob um triplice ponto de vista. Em primeiro lugar a questão da actividade em relação ao volume. Pelos methodos de concentração é sempre possível ter, em um volume mínimo, muito maior numero de unidades anti-toxicas do que com os sors completos. Do soro anti-diphterico é corrente conseguirem-se soluções concentradas de globulinas, de 2 a 3 mil unidades por centímetro cubico, partindo-se de um plasma original de 400 a 600 unidades. Com os sors completos, esta actividade ainda não foi alcançada; mesmo os sors de 1.000 unidades não ex-

cepcionaes. O metodo de concentração permite assim disso aproveitar os sôros fracos, que na pratica não seriam utilisaveis.

O segundo aspecto da questão diz respeito à toxidez normal dos sôros. Pelo metodo de concentração é eliminada não pequena quantidade de proteïnos inuteis. Destes, um pelo menos, a sero-albumina é eminentemente toxica, conforme tivemos occasião de provar experimentalmente. Este facto é confirmado pelas observações feitas em larga escala nos hospitais americanos que estabeleceram que os phenomenos de intoxicação são muito menos frequentes com os sôros concentrados, do que com os sôros completos.

O terceiro e ultimo ponto de vista é a questão da absorção. Os sôros refinados serão absorvidos com a mesma rapidez dos sôros completos? É preciso considerar que estes têm ordinariamente de 8 a 10 % de proteinas, enquanto que a porcentagem destas nos sôros concentrados é de 18 a 20 %, encontrando-se mesmo certas preparações commerciales de anti-toxina, contendo até 3 1/2 vezes mais proteinas do que o sôro original. Para resolver esta questão Park, Famulener e Banzhaf estudaram experimentalmente em homens, cabras e coelhos o tempo de absorção da anti-toxina diphtherica em relação ao grau de concentração de proteinas nas soluções de pseudoglobulinas empregadas, chegando à conclusão que o grau de concentração das soluções de globulina ou não tinha effeito algum retardante no tempo normal de absorção ou tinha muito pequena influencia sobre aquele phenomeno. Verificaram mais que as reacções inflammatórias locaes exerciam uma decisiva influencia sobre o tempo de absorção, podendo-se dizer que este guarda uma relação directa com as reacções locaes provocadas pelas injecções de diferentes soluções de globulina.

Conclusões

Do exposto podemos, em resumo, concluir:

- 1.º — As pseudoglobulinas acarretam em suas precipitações dos sôros therapeuticos as substancias activas destes.

- 2.* — Pela separação, aproveitamento e purificação das pseudoglobulinas podem-se conseguir soluções destas substâncias de 5 a 9 vezes mais activas do que o sôro original.
 - 3.* — Esta concentração de actividade se obtém por eliminação de proteídos inuteis e pela redução do veículo aquoso.
 - 4.* — Ha vantagens no emprego dos sôros concentrados, em vez dos sôros completos. Estas vantagens podem ser resumidas:
 - a) Na redução do volume a injectar-se;
 - b) Na diminuição dos accidentes toxicos atribuíveis ao sôro;
 - c) No aproveitamento dos sôros fracos.
 - 5.* — Os methodos de concentração de sôros se aperfeiçoam constantemente e tendem a generalizar-se.
-