

AÇÃO DA VITAMINA C (ACIDO 1-ASCORBICO) SOBRE AS TOXINAS DA GANGRENA GAZOSA

POR

A. BÜLLER SOUTO & C. LIMA

INTRODUÇÃO

A gangrena gazosa é essencialmente uma toxemia. Em sua patogenese, a resistencia organica individual desempenha um papel capital.

E' bem conhecida a influencia da vitamina C sobre a resistencia organica, bem como suas propriedades neutralizantes sobre as toxinas e poder de inativação sobre o virus. A ação da vitamina C sobre a toxina difterica foi observada por Harde (1) que atribui àquela substancia o poder de neutralizar a toxina *in vitro* e, *in vivo*, fixa-a *in loco*, protegendo desta maneira o organismo. Harde e Philippe (2) encontraram certo poder antigenico das misturas de toxina neutralizada pela vitamina C; este poder antigenico seria ligado não somente à capacidade oxi-redutora, como ao poder estimulante da produção de adrenalina pelo organismo. Harde e Greenwall (3) acharam que a vitamina C aumenta a resistencia das cobaias contra 1 D. M. M. de toxina difterica padrão, tornando menos toxicos os solutos de toxinas e não destruindo as propriedades anti-toxicas da anti-toxina difterica. Jungeblut e Zwemer (4) concluíram que a vitamina C *in vitro* inativa a toxina difterica; *in vivo*, pequenas doses preventivas tornariam as cobaias temporariamente resistentes ou menos sensiveis a pequenas doses de toxina, o que se póde apreciar pelas provas intracutaneas. Grooten e Bezssonoff (5) puderam demonstrar que a vitamina C, após neutralização quimica (pH), injetadas em cobaias simultaneamente com a toxina difterica, lhes aumenta a resistencia à intoxicação contra fraca quantidade desta toxina; não puderam, porém, demonstrar a ação direta sobre ela acreditando antes que a vitamina C estimula certas reações do organismo, as quais aumentam a resistencia á intoxicação. Zilva (6) não encontrou ação protetora *in vivo* da vitamina C sobre a intoxicação difterica. Sobre a toxina tetanica, Jungeblut (7) observou notavel poder incenti-

vante da vitamina C, não tendo, porém, conseguido demonstrar a ação protetora. A ação da vitamina C (acido 1-ascorbico) sobre esta toxina foi estudada por Schulze e Hecht (8), que lhe observaram também, e simultaneamente com Diechoff (9) a ação sobre a anatoxina difterica. A ação antivirulenta ou virucida da vitamina C foi verificada sobre os virus da poliomielite, da encefalite, do mosaico e do herpes.

O aspecto pratico desse estudo estaria no seguinte: é sabido que o organismo da criança necessita de uma "dóse quotidiana minima" de 0,003 gs. de acido 1-ascorbico, ou sejam 60 unidades internacionais, ao passo que um adulto necessita da "dóse quotidiana minima" de 0,009 gs. ou sejam 180 unidades. No periodo de paz essas "dóses quotidianas minimas" são facilmente obtidas na ração alimentar, nos periodos de guerra o mesmo não se dá, resultando das deficiencias nutritivas tão comuns durante os mesmos, todos os gráus de carencia vitaminica que explicam, talvez, a insolita frequencia e a gravidade então manifestada pelas infecções gangrenosas. Ela é segundo Aperlo (1) um: "processo che ha il triste privilegio di comparire ogni volta che una guerra piu o meno lunga ed atroce viene impegnata da popoli fra loro belligeranti e, solo rarissimamente in tempo di quiete e di pace insorge a minaciare l'esistenza di qualche ferito accidentale".

"Eppure la gangrene gassosa costituisce l'affezione piú commune e terribile che minacci la vita dei feriti di guerra e quali sempre essa aggredisce e, se tavola no uccide, molto apesso tragicamente munifica delle piú estese e deturpanti mutilazione".

Por isso e tendo em vista a literatura acima referida, resolvemos investigar a ação da vitamina C (acido 1-ascorbico) sobre as toxinas gangrenosas. No presente trabalho descreveremos uma serie de verificações que fizemos sobre a ação preventiva, curativa in vivo e neutralizante in vitro, da vitamina C sobre as toxinas do *C1. welchii*, *C1. oedematimaligni* (vibrion septique), *C1. oedematiens* e do *C1. histolyticum*.

AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO *CLOSTRIDIUM WELCHII*

Tecnica

Toxina utilizada — Toxina seca, preparada pela precipitação, por meio de sulfato de amonio, do filtrado isento de germes; proveniente de uma cultura de 18 a 20 horas a 37° C. O sobrenadante era recolhido e seco em baixa temperatura, em vacuo sulfurico e, depois, sobre anidrido fosforico até peso constante. A dóse minima letal da toxina era de 0,0004.

Vitamina C — A vitamina (acido 1-ascorbico) foi-nos fornecida pela Casa Bayer, a quem agradecemos. Usamos um soluto de vitamina C, que continha 50 miligramas por cc. e com pH 6,6 (\pm 0,1).

Animais de prova — Usamos camundongos, que, além de serem os animais sensíveis recomendados pela Comissão Permanente de Padronização Biologica da Liga das Nações (10) para doseamento das toxinas *welchii* (em vista da sua capacidade uniforme de sintetizar a vitamina), nos poderiam fornecer resultados mais constantes. Foram utilizados 4 lotes, tão padronizados quanto possível, e em geral da mesma idade com peso variante entre 17 a 20 gs..

Como a D. M. L. das toxinas gangrenosas é aquela que mata alguns, mas não todos os camundongos inoculados, foi necessario utilizar sempre lotes muito numerosos. Só com um lote de 70 animais é que conseguimos determinar a D. M. L.. Com um segundo lote de 168 camundongos, determinamos a ação preventiva; com um lote de 152, determinamos a ação curativa; e, com um de 118, determinamos a ação neutralizante. As inoculações da toxina *welchii* foram feitas por via venosa. As injeções da vitamina C o foram por via muscular, excéto nas experiencias sobre a ação neutralizante. Nestas, injetamos por via venosa as misturas de vitamina C e toxina *welchii*. A cada serie de pesquisas corresponderam testemunhos paralelos.

Foram feitos ensaios preliminares afim de verificar: 1.º, si a toxina suportava bem a diluição em salina de pH 6,6 (\pm 0,1), pois este era o pH da diluição da vitamina C; 2.º, si doses de 25 mgs. de vitamina C eram bem suportadas pelos camundongos e pela via venosa, não obstante as experiencias de Rohmer, Bezssonoff, Stoer e Perrier (11) já terem provado que os mamiferos suportam doses massiças de vitamina C; 3.º, si os solutos de toxina continham cobre, pois, conforme Barron, De Meio e Klemperer (12), este metal é catalizador da oxidação do acido ascorbico, exercendo ação em concentração de 46 microgramas. Esta pesquisa do cobre adquiria grande importancia, porque nossas diluições foram feitas em salina fisiologica. Conforme Mawson (13), Kellie e Zilva (14), "The oxydation catalysed by Cu was very much slower when NaCl present", embora Barron, De Meio e Klemperer não tivessem podido notar este efeito inhibitorio do cloreto de sodio sobre a autoxidação da vitamina C. E sobretudo porque o cobre, além de oxidar a vitamina C, conduz á formação de peróxido de hidrogenio (15), cuja ação sobre as toxinas anaerobias é sobejamente conhecida.

As rigorosas analises dos solutos das toxinas, realizadas na secção de Quimica pelo nosso colega, Carlos Slotta, mostraram que os solutos estavam praticamente livres de cobre. Slotta empregou "o metodo indicado por Fischer, que consiste em adicionar na concavidade de uma placa de Tuppel, para cada 3 gotas de soluto, 3 gotas de um soluto de 1 mgs. de difeniltiocarbazona em 10 cs.

de tetracloreto de carbono. Segundo Feigl (Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, Leipzig 1935, 175), dá-se a viragem do soluto reagente para o amarelo castanho ainda com a presença de 0,2 gamas de cobre”.

AÇÃO PREVENTIVA

Um lote de 168 camundongos foi utilizado: 112 animais receberam, durante 3 dias, 10 miligramas de vitamina C por via muscular; este lote foi repartido em 2, um de 55 animais, que receberam 1 D.M.L. de toxina e outro de 50 animais, que receberam 2 D.M.L. Como testemunhos foram utilizados 56 camundongos, dos quais 26 receberam 1 D. M. L. e 30, 2 D. M. L..

Os resultados obtidos estão resumidos no quadro I e grafico I.

QUADRO I

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO *CL. WELCHII*

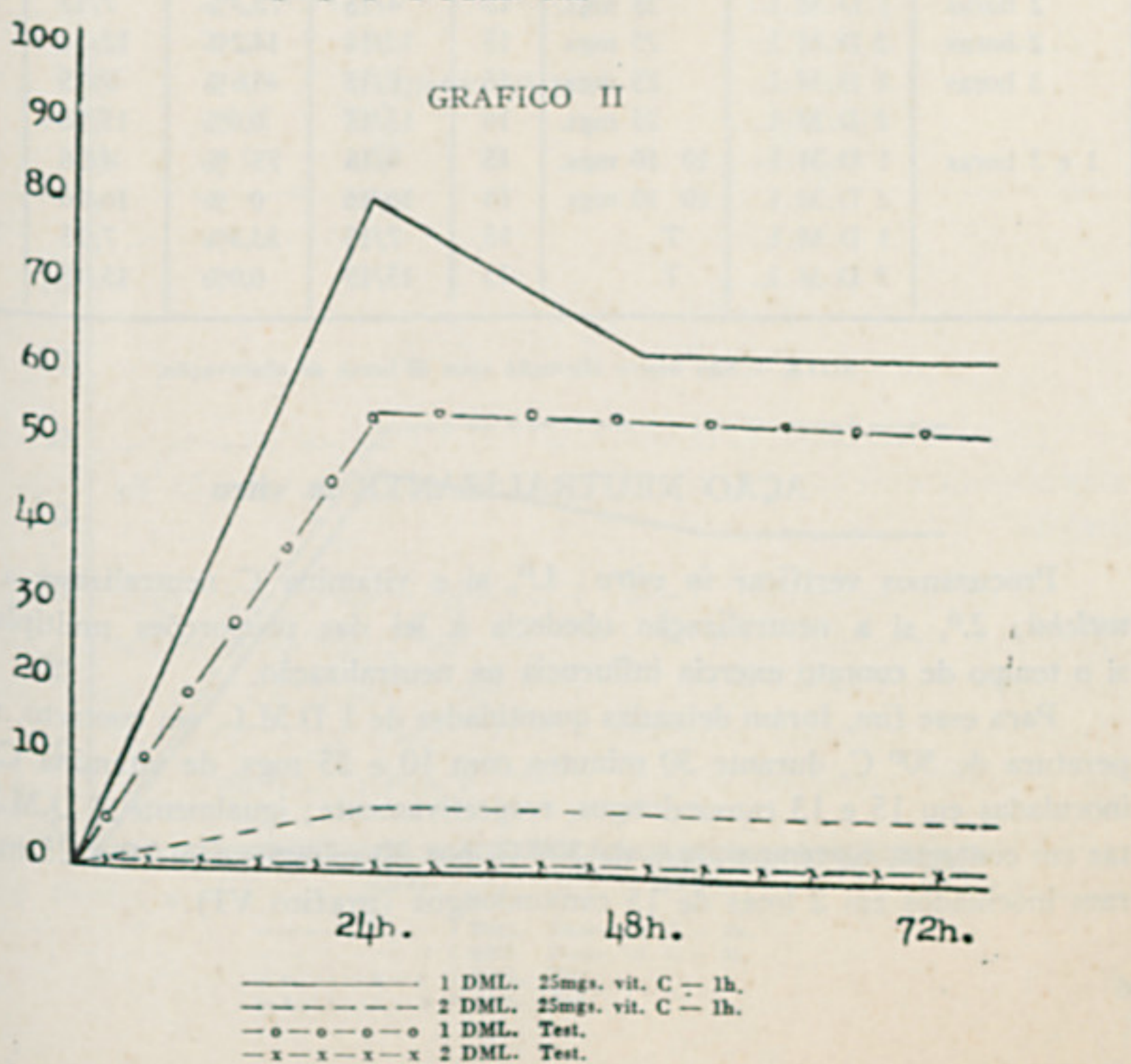
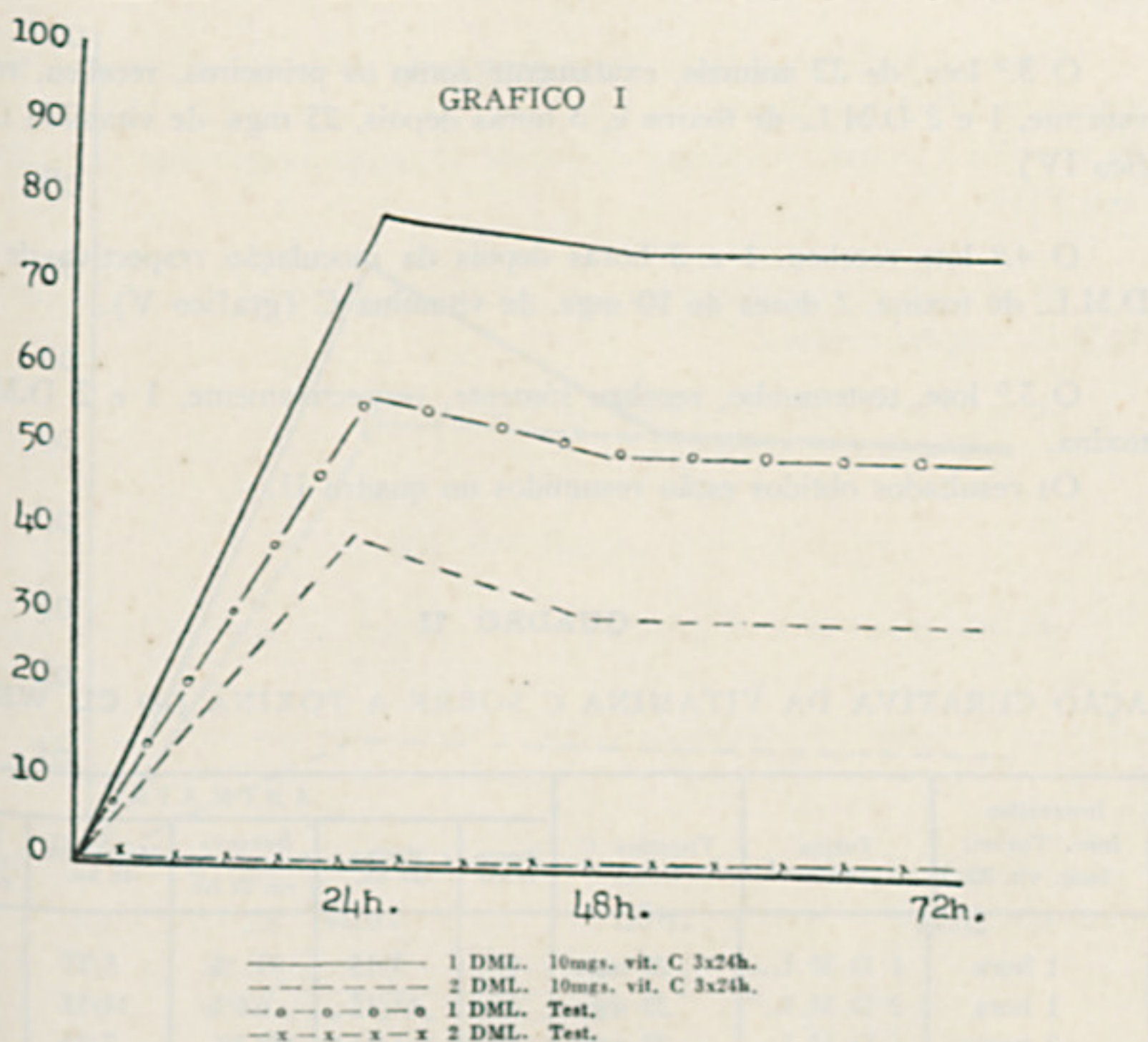
VITAMINA C						Toxina Doses	ANIMAIS				
Intervalos das inoculações			Doses				Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviven- tes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviven- tes % em 48 hs.
24 hs.	24 hs.	24 hs.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D.M.L.	55	11/55	80%	14/55	74%
			10 mgs.	10 mgs.	19 mgs.	3 D.M.L.	57	35/57	38,5%	38/57	33,3%
				T		1 D.M.L.	26	11/26	57,6%	13/26	50%
				T		2 D.M.L.	30	30/30	0%	30/30	0%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.º, qual o periodo maximo em que a vitamina C poderia exercer sua atividade contra 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. welchii*; 2.º, si doses de 10 mgs., repetidas com intervalo de 1 e 3 horas, teriam ação curativa maior do que doses unicas. Para esse fim, 152 animais foram divididos em 5 lotes: o primeiro lote, de 30 animais, que foi subdividido em 2 outros de 15 animais, que receberam, respectivamente, 1 D. M. L. e 2 D. M. L., sendo a vitamina C dada, uma hora depois, a cada animal, na dose de 25 mgs. (grafico II).

2.º, o lote de 29 animais foi tambem subdividido em 2 outros, respectivamente, de 15 e 14 animais, dos quais um recebeu 1 D.M.L., e o outro, 2 D.M.L. e, 2 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico III).



O 3.º lote, de 32 animais, exatamente como os primeiros, recebeu, respectivamente, 1 e 2 D.M.L. de toxina e, 3 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico IV).

O 4.º lote recebeu, 1 e 3 horas depois da inoculação respectiva de 1 e 2 D.M.L. de toxina, 2 doses de 10 mgs. de vitamina C (grafico V).

O 5.º lote, testemunho, recebeu somente, respectivamente, 1 e 2 D.M.L. de toxina.

Os resultados obtidos estão resumidos no quadro II.

QUADRO II

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO *CL. WELCHII*

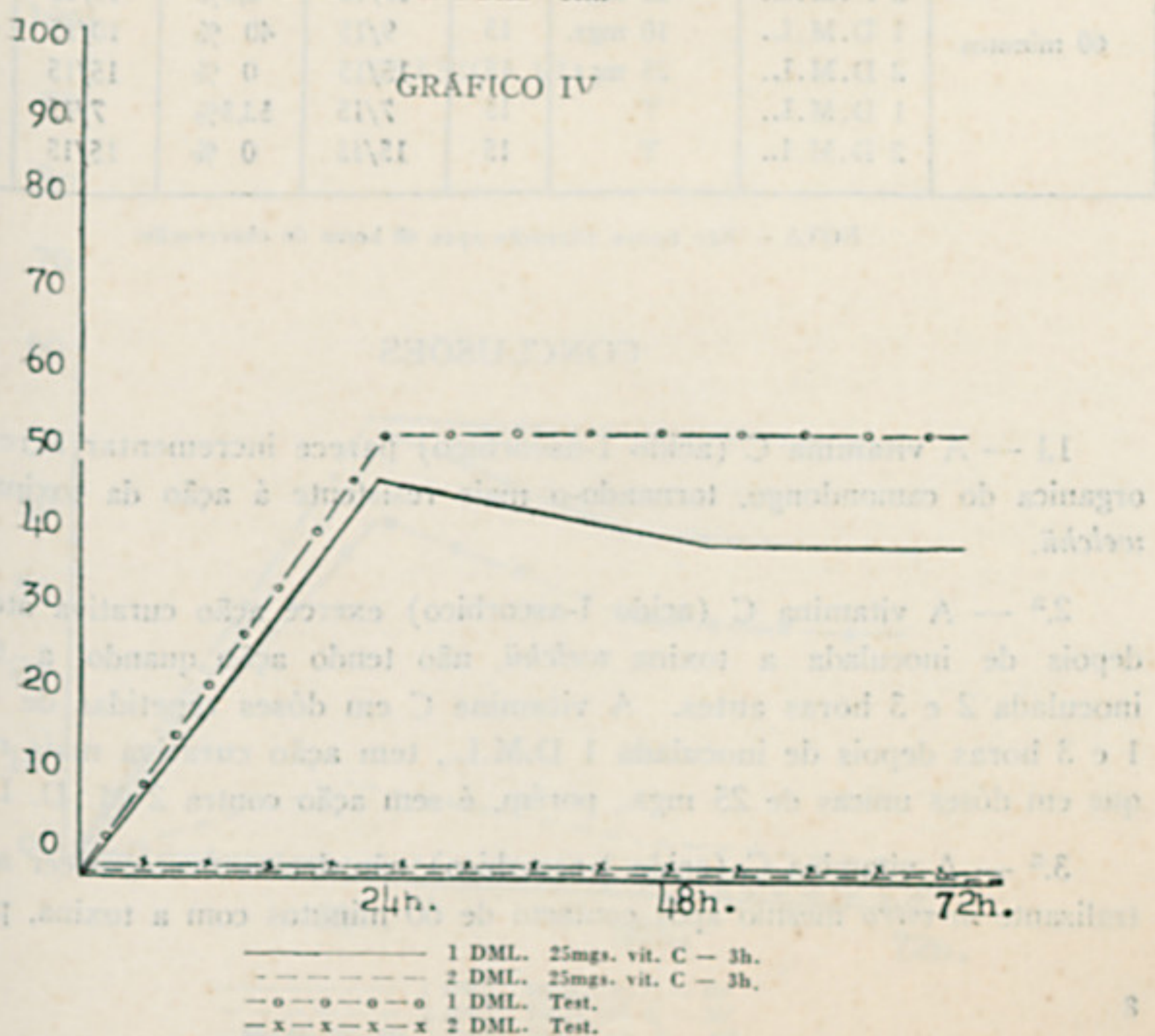
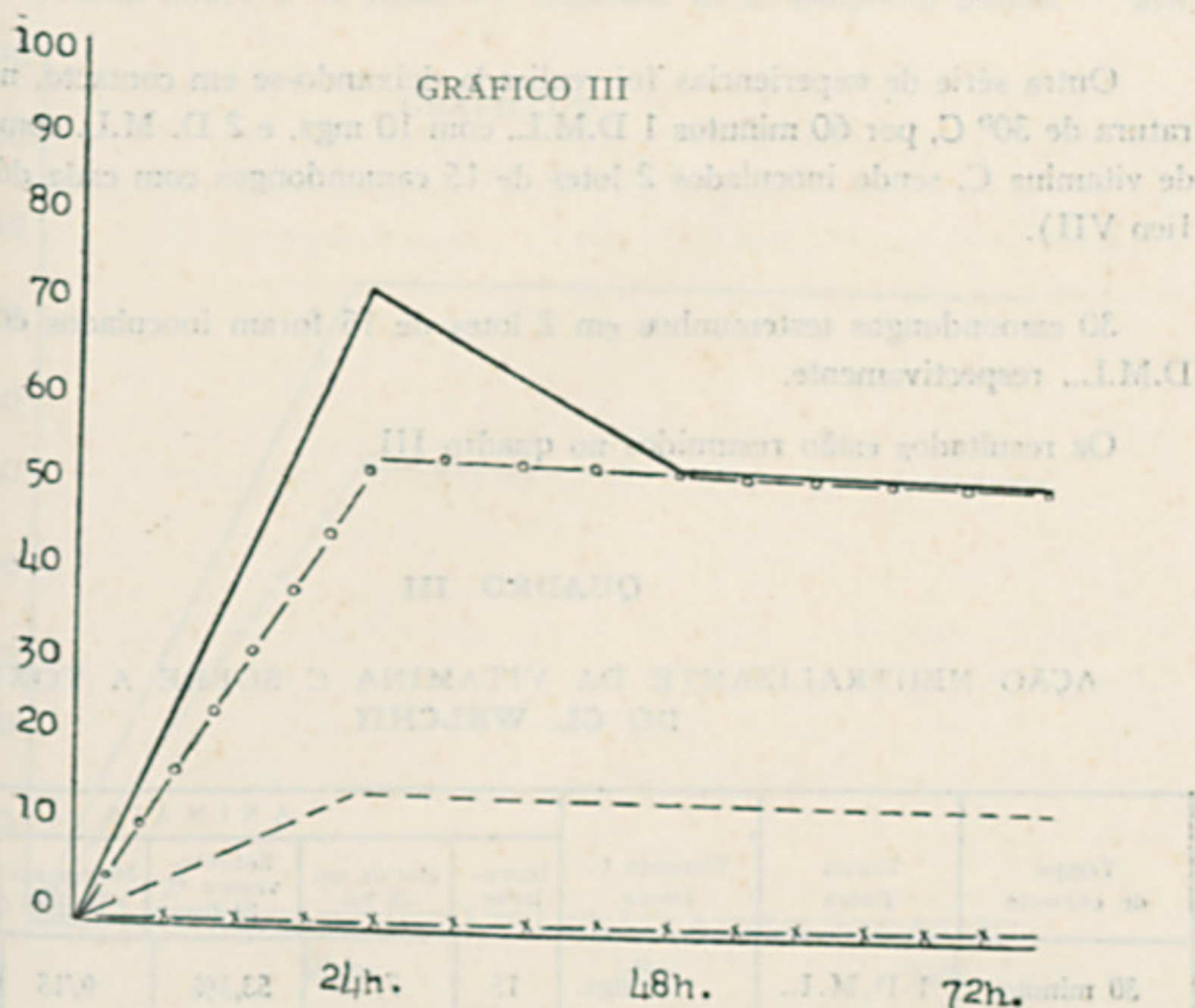
Intervallos Inoc. Toxina: Inoc. vit. C	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inocu- lados	Mortos 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.
1 hora	1 D.M.L.	25 mgs.	15	3/15	80 %	5/15	66,6%
1 hora	2 D.M.L.	25 mgs.	15	14/15	6,6%	14/15	6,6%
2 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	15	4/15	73,3%	7/15	53,3%
2 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	15	12/14	14,2%	12/14	14,2%
3 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	15	8/15	46,6%	9/15	40,0%
	2 D.M.L.	25 mgs.	16	15/15	0,0%	15/15	0,0%
1 e 3 horas	1 D.M.L.	10 10 mgs.	15	4/16	75 %	4/16	75 %
	2 D.M.L.	10 10 mgs.	16	16/16	0 %	16/16	0 %
	1 D.M.L.	T	15	7/15	53,3%	7/15	53,3%
	2 D.M.L.	T	15	15/15	0,0%	15/15	0,0%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

AÇÃO NEUTRALIZANTE *in vitro*

Procuramos verificar *in vitro*: 1.º, si a vitamina C neutralizava a toxina *welchii*; 2.º, si a neutralização obedecia à lei das proporções multiplas; 3.º, si o tempo de contato exercia influencia na neutralização.

Para esse fim, foram deixadas quantidades de 1 D.M.L. em contacto, na temperatura de 30º C, durante 30 minutos com 10 e 25 mgs. de vitamina C, sendo inoculadas em 15 e 13 camundongos, respectivamente; igualmente 2 D.M.L. postas em contacto, na temperatura de 30º C, por 30 minutos com 10 e 25 mgs., foram inoculados em 2 lotes de 15 camundongos (grafico VI).



Outra série de experiencias foi realizada deixando-se em contacto, na temperatura de 30° C, por 60 minutos 1 D.M.L. com 10 mgs. e 2 D. M.L. com 25 mgs. de vitamina C, sendo inoculados 2 lotes de 15 camundongos com cada dose (grafico VII).

30 camundongos testemunhos em 2 lotes de 15 foram inoculados com 1 e 2 D.M.L., respectivamente.

Os resultados estão resumidos no quadro III.

QUADRO III

AÇÃO NEUTRALIZANTE DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CL. WELCHII

Tempo de contacto	Toxina Doses	Vitamina C. Doses	ANIMAIS				
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
30 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	15	7/15	53,3%	9/15	40 %
	1 D.M.L.	25 mgs.	13	7/13	46,1%	9/13	30,7%
	2 D.M.L.	10 mgs.	15	13/15	13,3%	14/15	6,6%
	2 D.M.L.	25 mgs.	15	15/15	0,0%	15/15	0,0%
60 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	15	9/15	40 %	10/15	33,3%
	2 D.M.L.	25 mg s.	15	15/15	0 %	15/15	0 %
	1 D.M.L.	T	15	7/15	53,3%	7/15	53,3%
	2 D.M.L.	T	15	15/15	0 %	15/15	0 %

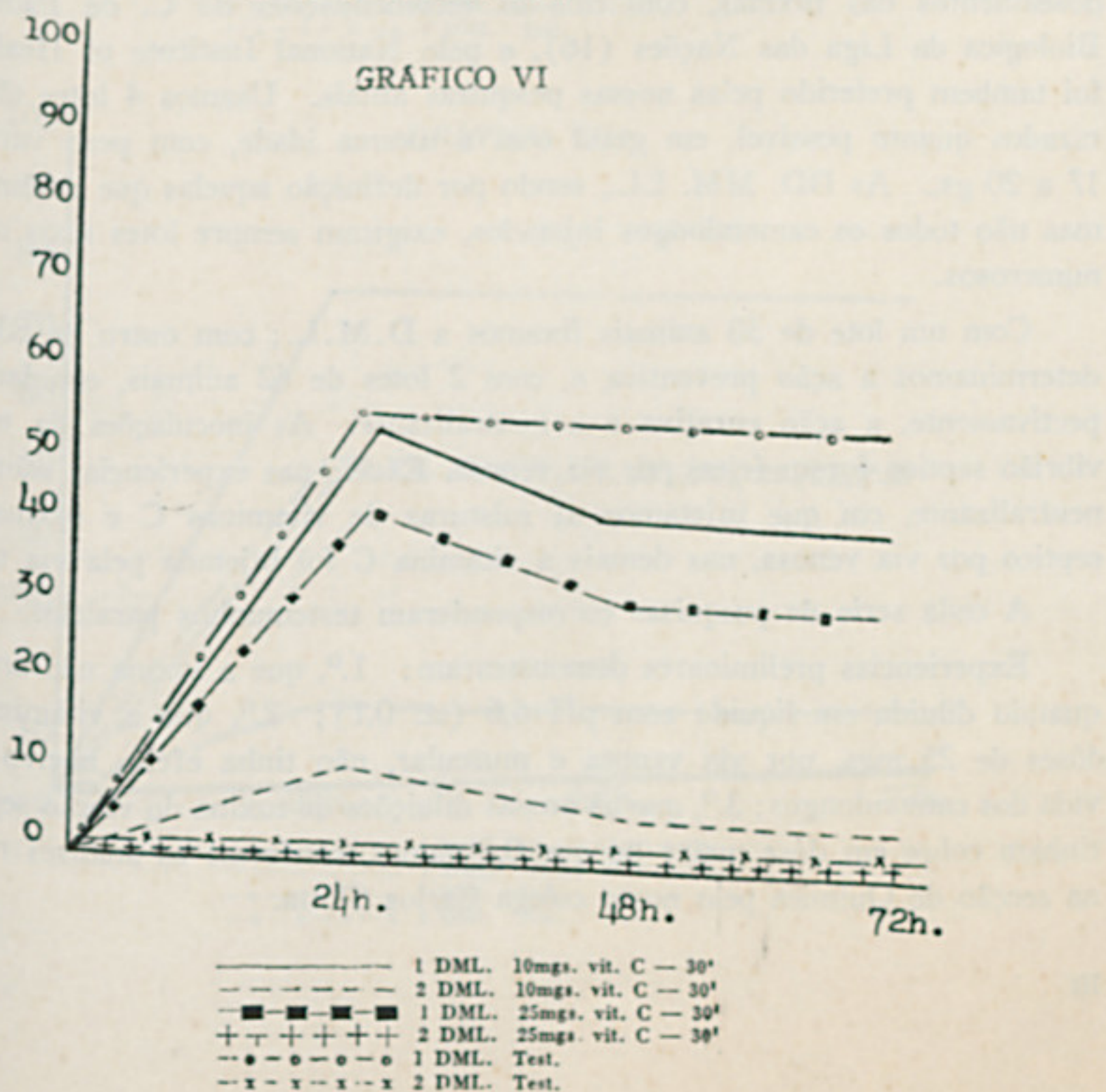
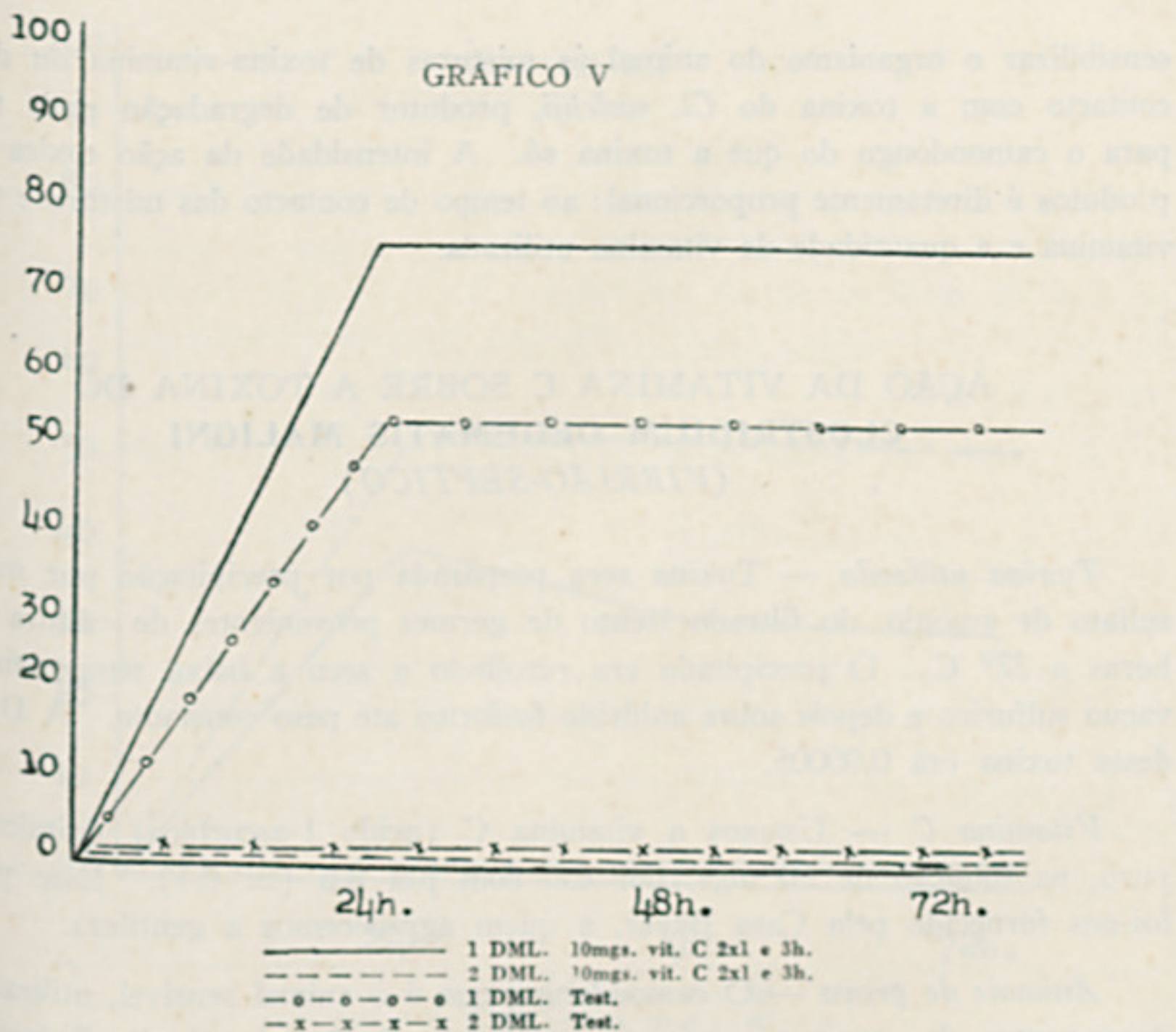
NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

CONCLUSÕES

1.1 — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece incrementar a resistencia organica do camundongo, tornando-o mais resistente á ação da toxina do *Cl. welchii*.

2.^a — A vitamina C (acido 1-ascorbico) exerce ação curativa até 1 hora depois de inoculada a toxina *welchii*, não tendo ação quando a toxina é inoculada 2 e 3 horas antes. A vitamina C em doses repetidas de 10 mgs. 1 e 3 horas depois de inoculada 1 D.M.L., tem ação curativa mais nitida do que em doses unicas de 25 mgs., porém, é sem ação contra 2 M. D. L..

3.^a — A vitamina C (acido 1-ascorbico) não demonstrou exercer ação neutralizante *in vitro* mesmo após contacto de 60 minutos com a toxina, parecendo



sensibilizar o organismo do animal ás misturas de toxina-vitamina ou dar em contacto com a toxina do *Cl. welchii*, produtor de degradação mais toxicos para o camondongo do que a toxina só. A intensidade da ação toxica destes produtos é diretamente proporcional: ao tempo de contacto das misturas: toxina-vitamina e a quantidade de vitamina utilizada.

AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CLOSTRIDIUM OEDEMATIS MALIGNI (VIBRIÃO-SEPTICO)

Toxina utilizada — Toxina seca preparada por precipitação por meio do sulfato de amonio, do filtrado isento de germes provenientes de cultura de 48 horas a 37° C.. O precipitado era recolhido a seco a baixa temperatura em vacuo sulfurico e depois sobre anidrido fosforico até peso constante. A D.M.L. desta toxina era 0,00005.

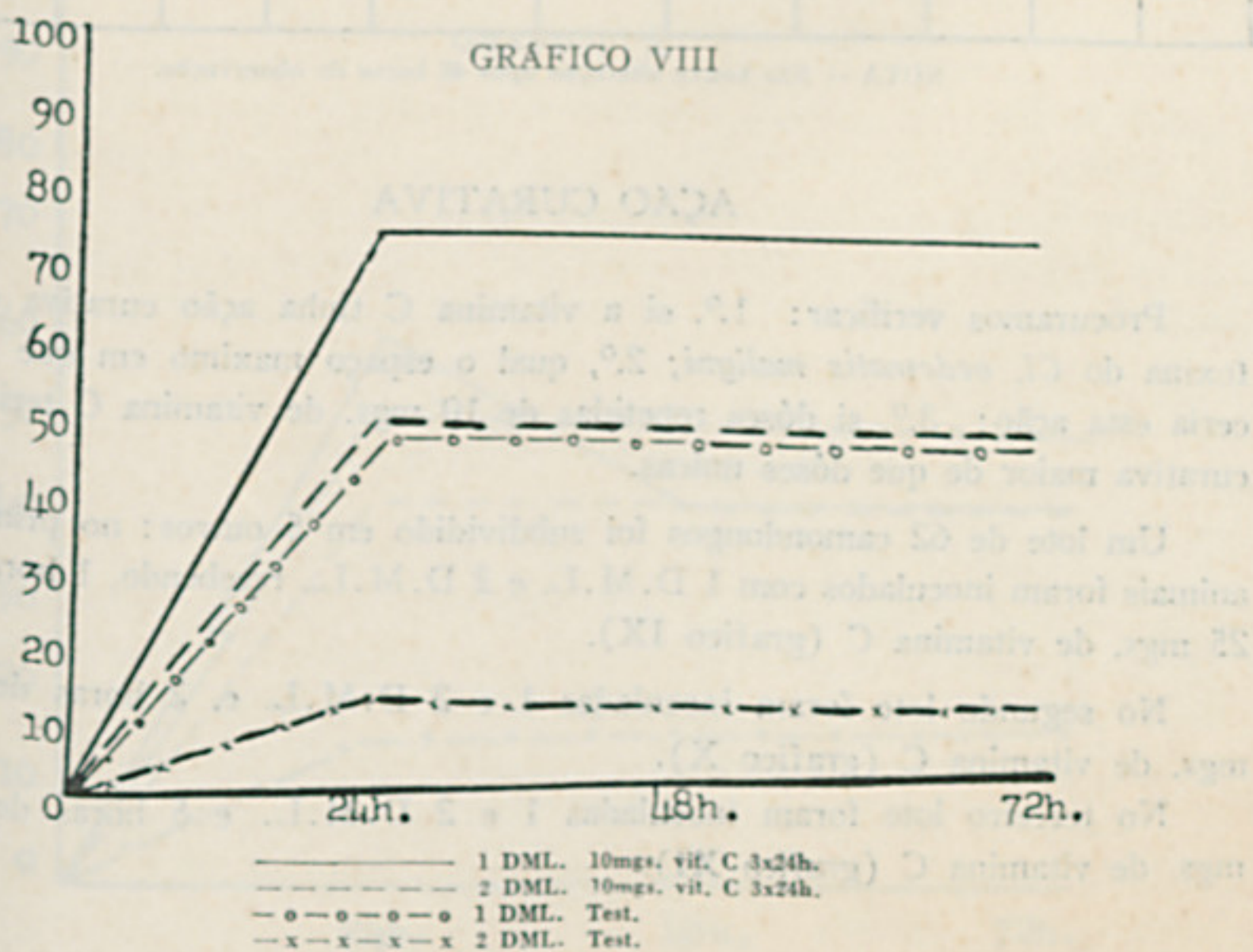
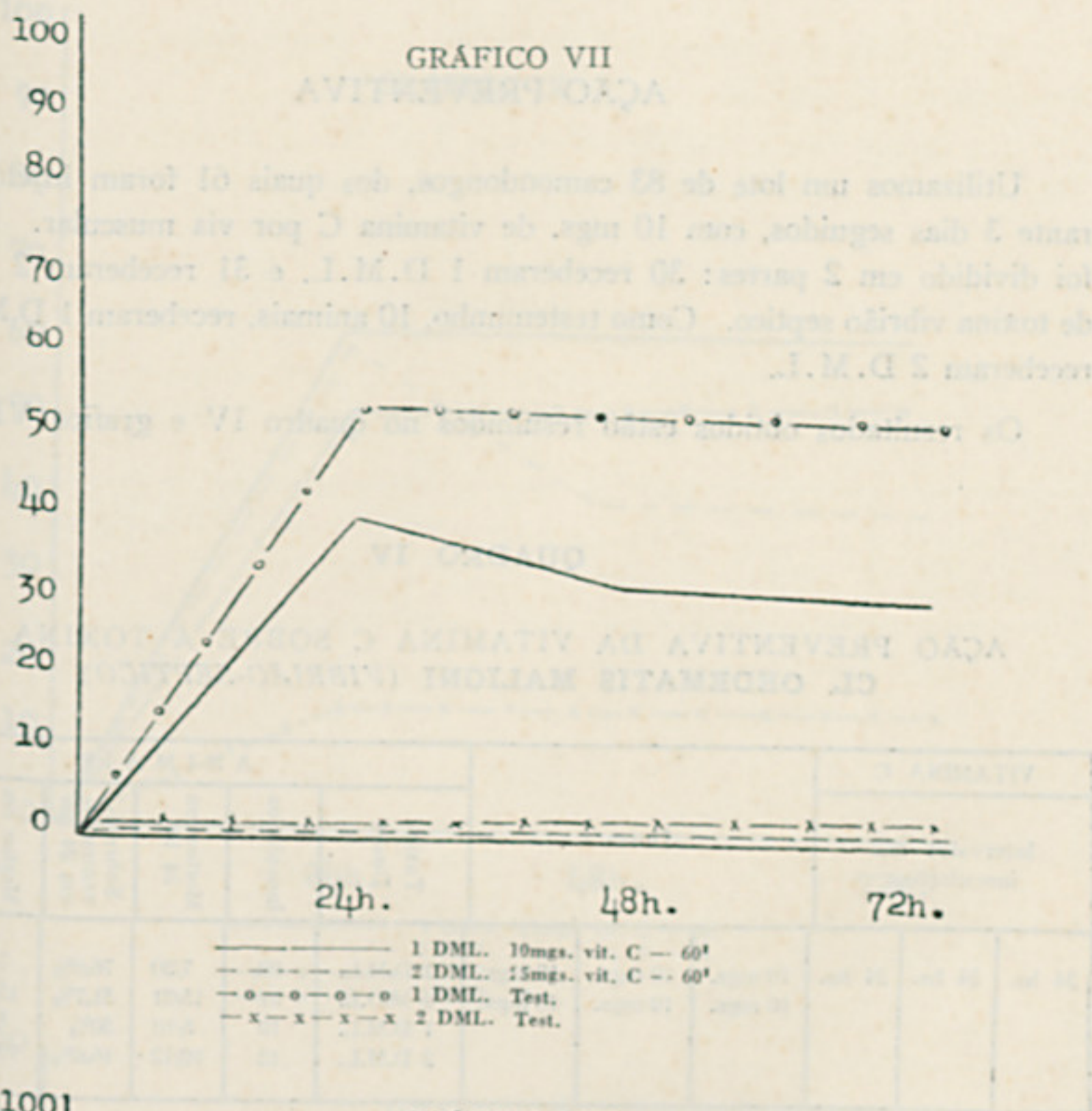
Vitamina C — Usamos a vitamina C (acido 1-ascorbico) quimicamente puro, na diluição de 50 mgs. por c.c. com pH 6,6 (\pm 0,1). Esse produto foi-nos fornecido pela Casa Bayer, a quem agradecemos a gentileza.

Animais de prova — O camondongo, que é o animal sensível, utilizado nos doseamentos das toxinas, conforme as recomendações do C. de Padronização Biologica da Liga das Nações (16), e pelo National Institute of Health (17), foi tambem preferido pelas nossas pesquisas atuais. Usamos 4 lotes tão padronizados quanto possivel, em geral com a mesma idade, com peso variando de 17 a 20 gs.. As DD. MM. LL., sendo por definição aquelas que matam alguns, mas não todos os camondongos injetados, exigiram sempre lotes mais ou menos numerosos.

Com um lote de 50 animais fixamos a D.M.L.; com outro de 83 animais determinamos a ação preventiva e, com 2 lotes de 62 animais, estudamos, respectivamente, a ação curativa e a neutralizante. As inoculações da toxina do vibrão septico foram feitas por via venosa. Exceto nas experiencias sobre a ação neutralizante, em que injetamos as misturas de vitaminas C e toxina vibrão septico por via venosa, nas demais a vitamina C foi injetada pela via muscular.

A cada serie de pesquisas corresponderam testemunhos paralelos.

Experiencias preliminares demonstraram: 1.º, que a toxina não era afetada quando diluida em liquido com pH 6,6 (\pm 0,1); 2.º, que a vitamina C, em doses de 25 mgs. por via venosa e muscular, não tinha efeito nocivo sobre a vida dos camondongos; 3.º, que as nossas diluições de toxina do vibrão septico não tinham cobre em dose maior do que 0,2 gamas, conforme as analises realizadas na secção de Quimica pelo nosso colega Carlos Slotta.



AÇÃO PREVENTIVA

Utilizamos um lote de 83 camundongos, dos quais 61 foram injetados, durante 3 dias seguidos, com 10 mgs. de vitamina C por via muscular. Este lote foi dividido em 2 partes: 30 receberam 1 D.M.L. e 31 receberam 2 D.M.L. de toxina vibrião septico. Como testemunho, 10 animais, receberam 1 D.M.L. e 12 receberam 2 D.M.L.

Os resultados obtidos estão resumidos no quadro IV e grafico VIII.

QUADRO IV

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO
CL. OEDEMATIS MALIGNI (VIBRIÃO-SEPTICO)

VITAMINA C			ANIMAIS								
Intervalos das inoculações			Doses			Toxina Doses	Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobrevidentes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevidentes % em 48 hs.
24 hs.	24 hs.	24 hs.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D.M.L.	30	7/30	76,6%	7/30	76,6%
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	2 D.M.L.	31	15/31	51,7%	15/31	51,7%
						1 D.M.L.	10	5/10	50%	5/10	50%
						2 D.M.L.	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

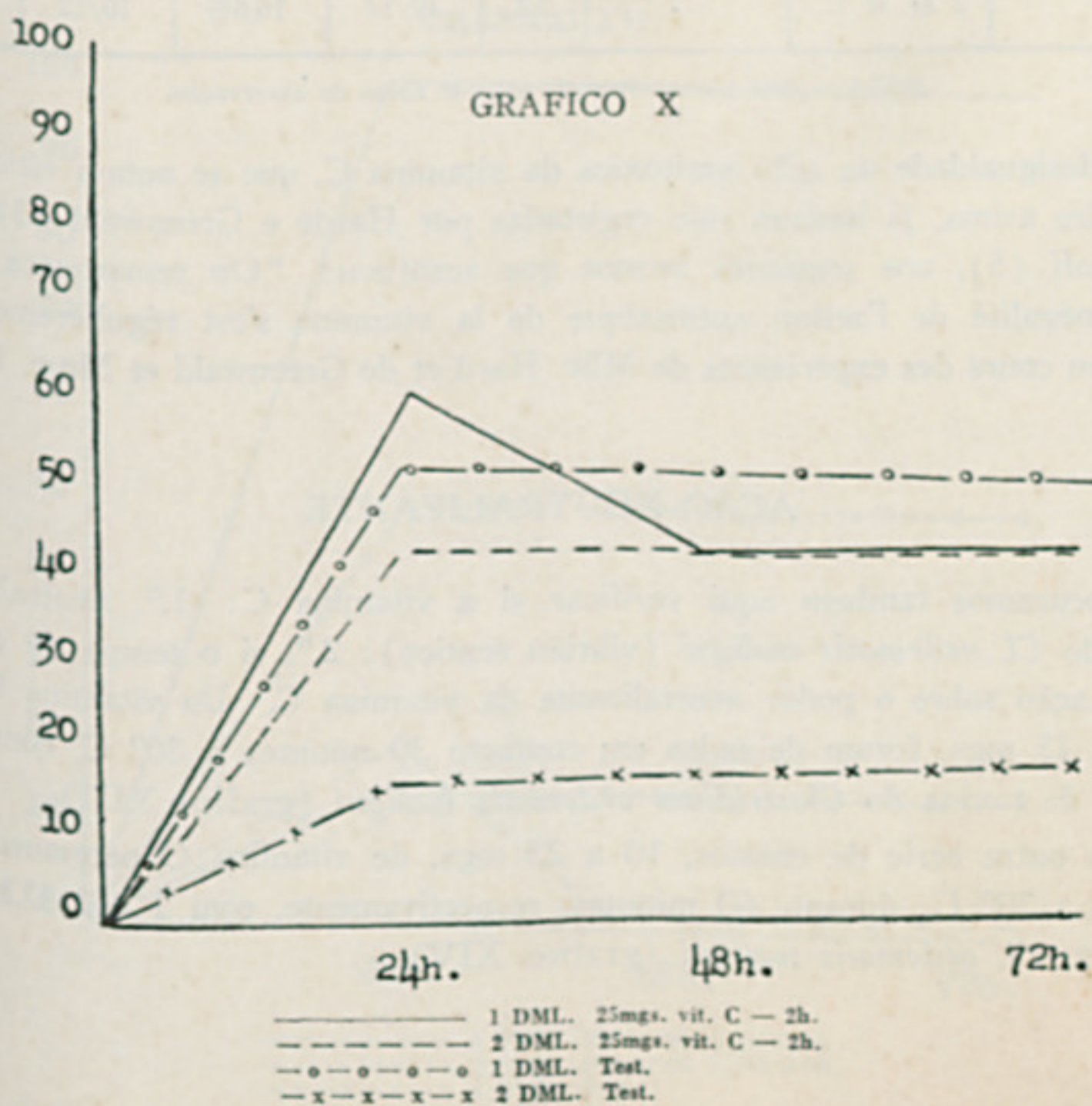
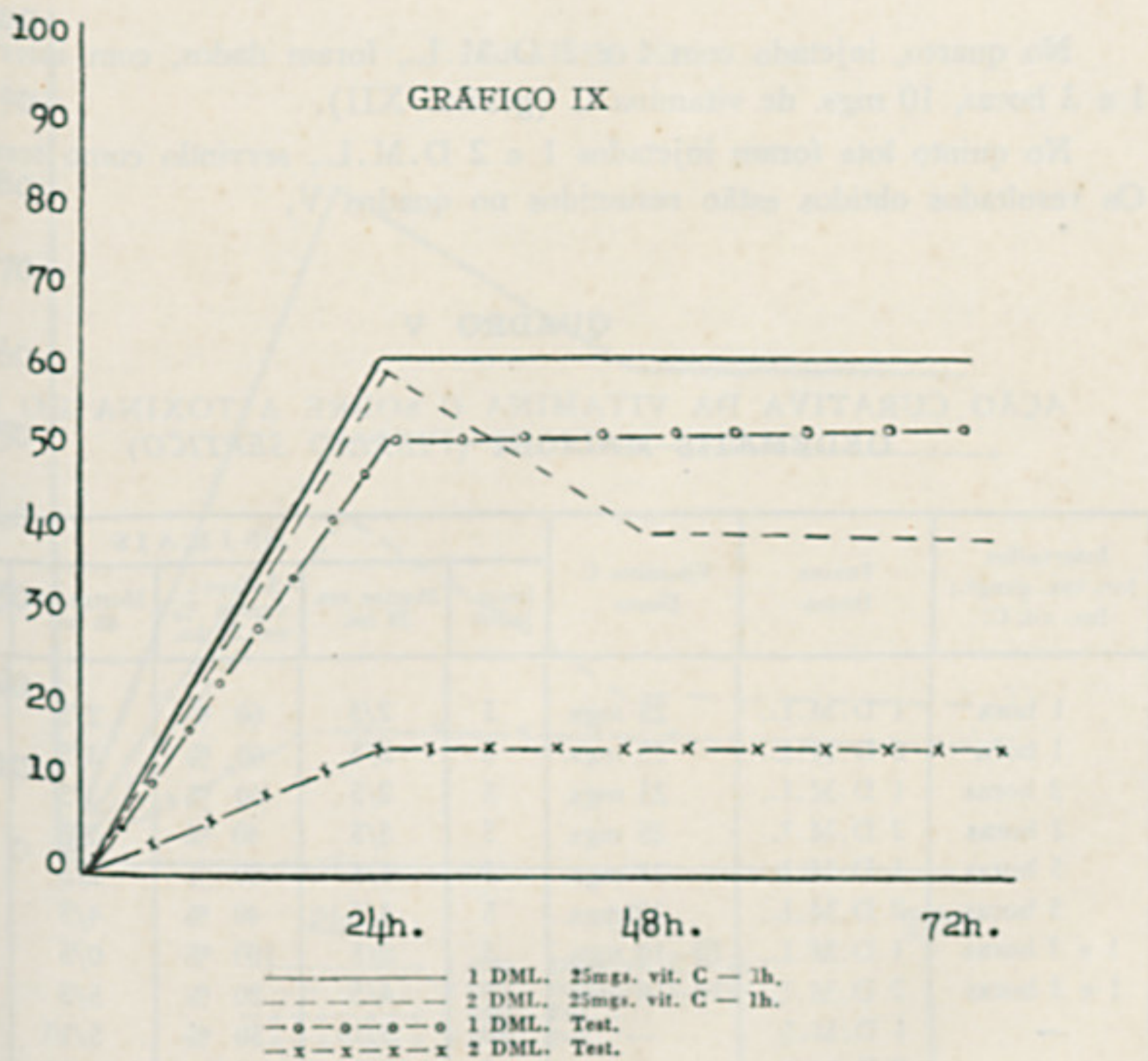
AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.º, si a vitamina C tinha ação curativa contra a toxina do *Cl. oedematis maligni*; 2.º, qual o espaço maximo em que se exerceria esta ação; 3.º, si doses repetidas de 10 mgs. de vitamina C teriam ação curativa maior de que doses unicas.

Um lote de 62 camundongos foi subdividido em 5 outros: no primeiro, os animais foram inoculados com 1 D.M.L. e 2 D.M.L., recebendo, 1 hora depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico IX).

No segundo lote foram inoculadas 1 e 2 D.M.L. e, 2 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico X).

No terceiro lote foram inoculadas 1 e 2 D.M.L. e 5 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico XI).



No quarto, injetado com 1 e 2 D.M.L., foram dados, com intervalos de 1 e 3 horas, 10 mgs. de vitamina C (grafico XII).

No quinto lote foram injetados 1 e 2 D.M.L., servindo como testemunho. Os resultados obtidos estão resumidos no quadro V.

QUADRO V

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO *CL. OEDEMATIS MALIGNI* (*VIBRIÃO SEPTICO*)

Intervallos Inc. tox. gangr.; Inc. vit. C.	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inocu- lados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.
1 hora	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	2/5	60 %
1 hora	2 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	3/5	40 %
2 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	3/5	40 %
2 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40 %	3/5	40 %
5 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	1/5	80 %	2/5	60 %
5 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40 %	4/5	20 %
1 e 3 horas	1 D.M.L.	10—10 mgs.	5	0/5	100 %	0/5	100 %
1 e 3 horas	2 D.M.L.	10—10 mgs.	5	4/5	20 %	5/5	0 %
—	1 D.M.L.	—	10	5/10	50 %	5/10	50 %
—	2 D.M.L.	—	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

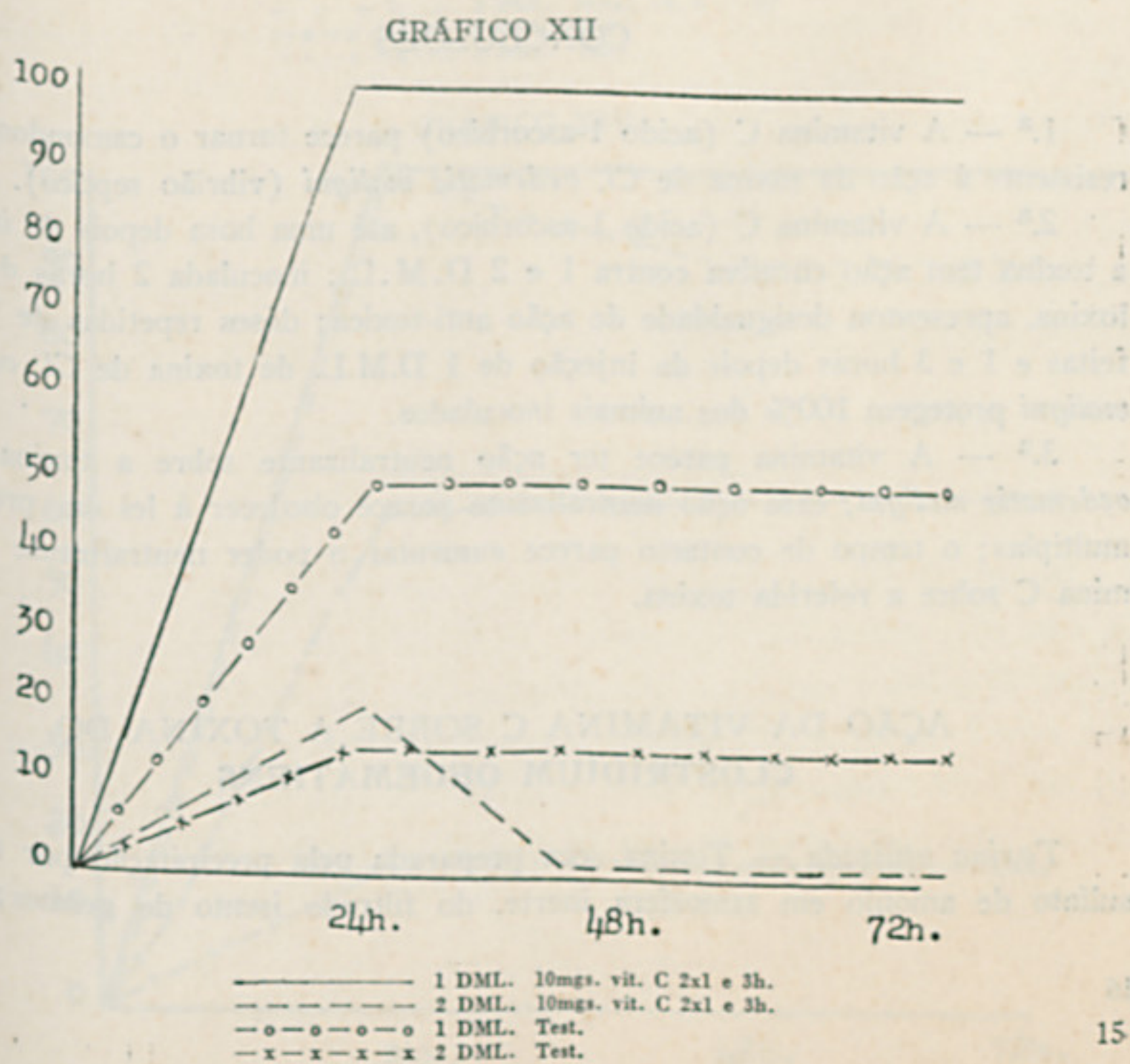
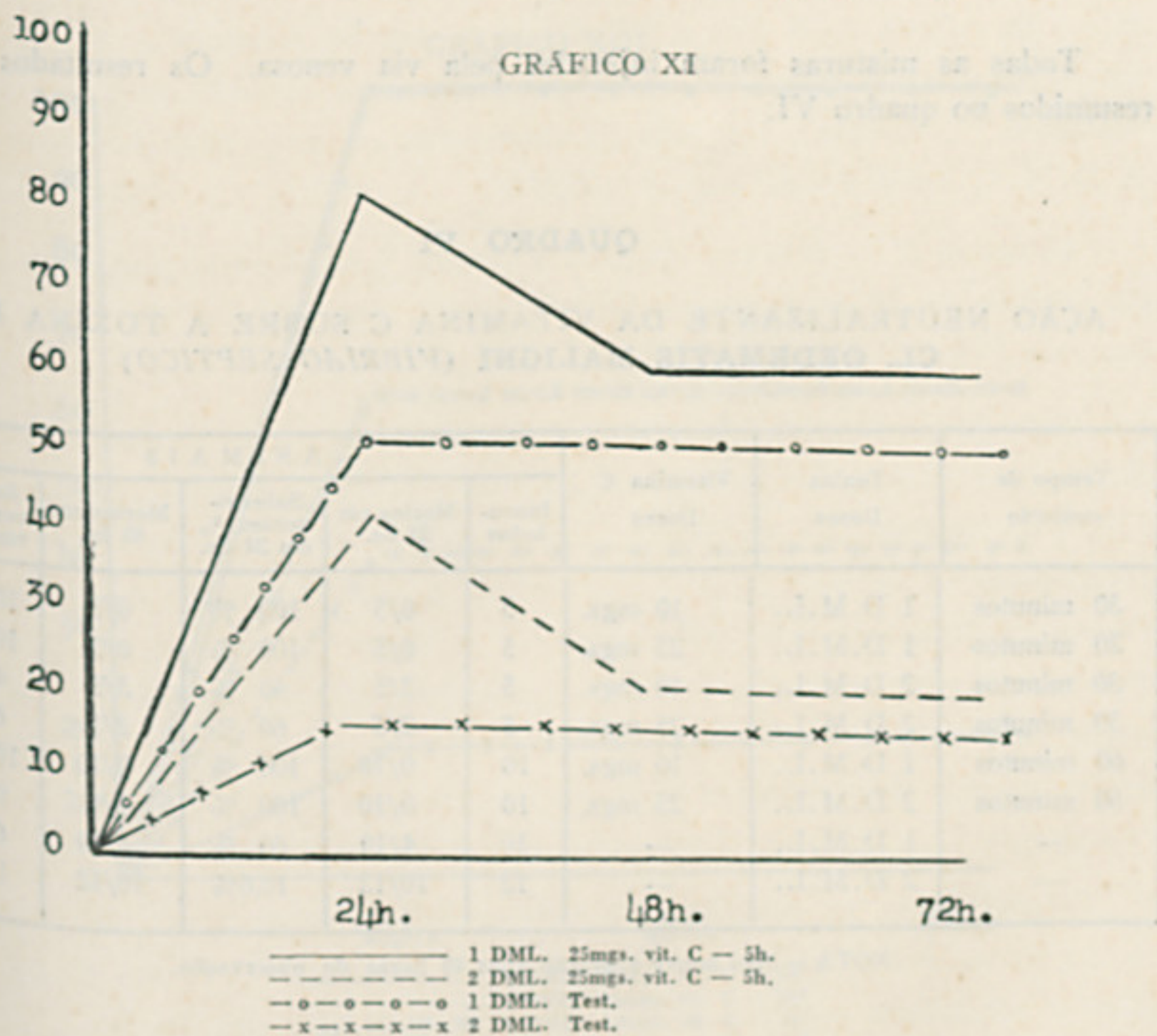
NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

A desigualdade na ação antitoxica da vitamina C, que se notam nitidamente no quadro acima, já haviam sido registadas por Harde e Greenwald (3), e por Bezssonoff (5), nos seguintes termos que acentuou: "On remarquera que la même inégalité de l'action antitoxique de la vitamine s'est régulièrement manifesté au cours des experiences de Mlle Hard et de Greenwald et Mme. Harde".

AÇÃO NEUTRALIZANTE

Procuramos tambem aqui verificar si a vitamina C: 1.º, neutralizava a toxina do *Cl. oedematis maligni* (vibrião septico); 2.º, si o tempo de contacto exercia ação sobre o poder neutralizante da vitamina C. Da vitamina C doses de 10 a 25 mgs. foram deixadas em contacto 30 minutos a 30º C. com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Clostridium oedematis maligni* (grafico XIII).

Em outra serie de ensaios, 10 a 25 mgs. de vitamina C permanecem em contacto a 30º C., durante 60 minutos, respectivamente, com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. oedematis maligni* (grafico XIV).



Todas as misturas foram injetadas pela via venosa. Os resultados estão resumidos no quadro VI.

QUADRO VI

AÇÃO NEUTRALIZANTE DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CL. OEDEMATIS MALIGNI (*VIBRIÃO SEPTICO*)

Tempo de contacto	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
30 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	5	0/5	100 %	0/5	100 %
30 minutos	1 D.M.L.	25 mgs.	5	0/5	100 %	0/5	100 %
30 minutos	2 D.M.L.	10 mgs.	5	3/5	40 %	3/5	40 %
30 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	2/5	60 %
60 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	10	0/10	100 %	0/10	100 %
60 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	10	0/10	100 %	1/9	90 %
—	1 D.M.L.	—	10	4/10	60 %	4/10	60 %
—	2 D.M.L.	—	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

CONCLUSÕES

1.^a — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece tornar o camundongo mais resistente á ação da toxina de *Cl. oedematis maligni* (vibrião septico).

2.^a — A vitamina C (acido 1-ascorbico), até uma hora depois de inoculada a toxina tem ação curativa contra 1 e 2 D.M.L.; inoculada 2 horas depois da toxina, apresentou desigualdade de ação anti-toxica; doses repetidas de 10 mgs. feitas e 1 e 3 horas depois da injeção de 1 D.M.L. de toxina de *Cl. oedematis maligni* protegem 100% dos animais inoculados.

3.^a — A vitamina parece ter ação neutralizante sobre a toxina de *Cl. oedematis maligni*; essa ação neutralizante parece obedecer á lei das proporções multiplas; o tempo de contacto parece aumentar o poder neutralizante de vitamina C sobre a referida toxina.

AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CLOSTRIDIUM OEDEMATIENS

Toxina utilizada — Toxina seca preparada pela precipitação por meio de sulfato de amonio em atmosfera inerte, do filtrado isento de germes; prove-

GRÁFICO XIII

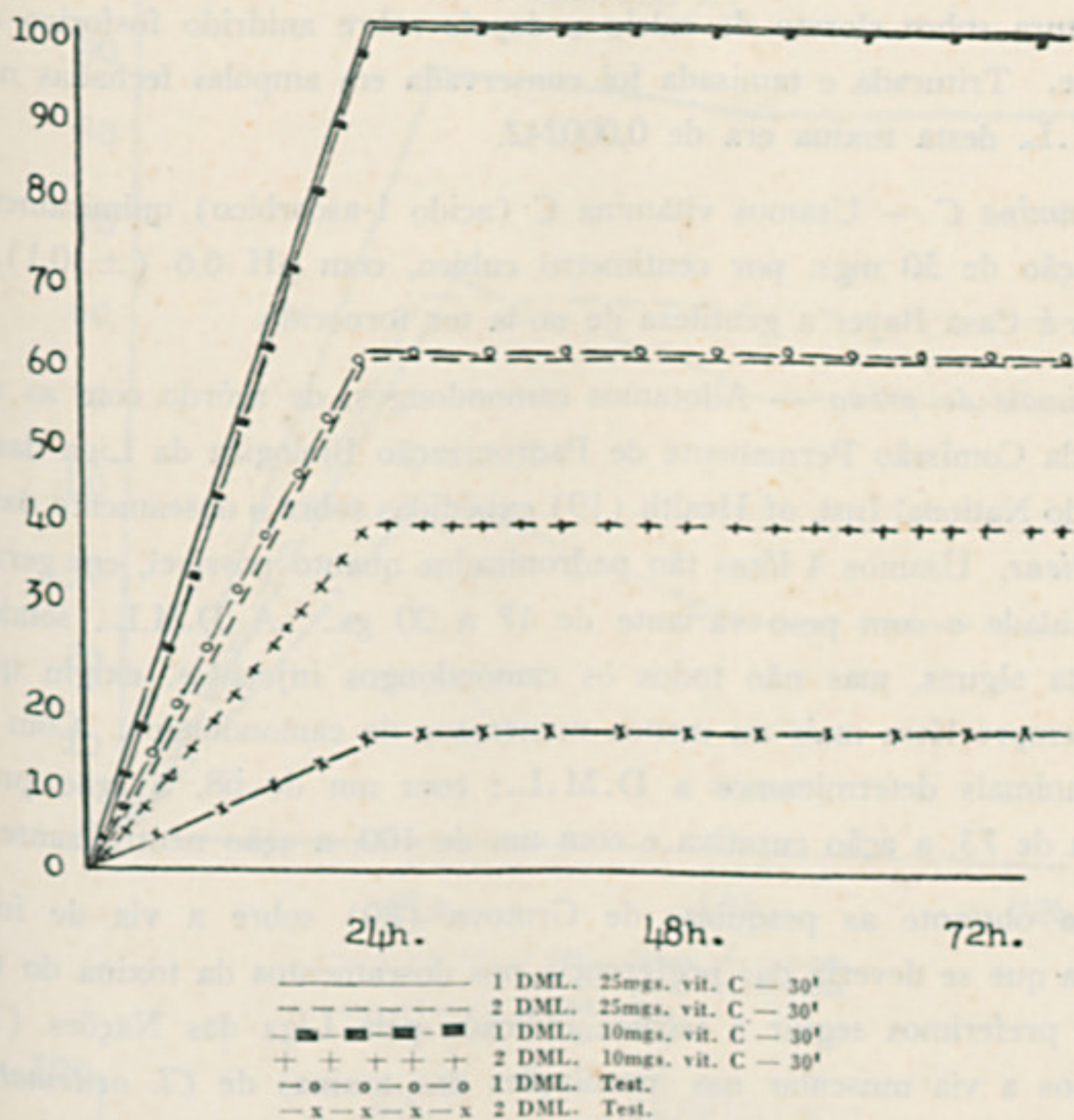
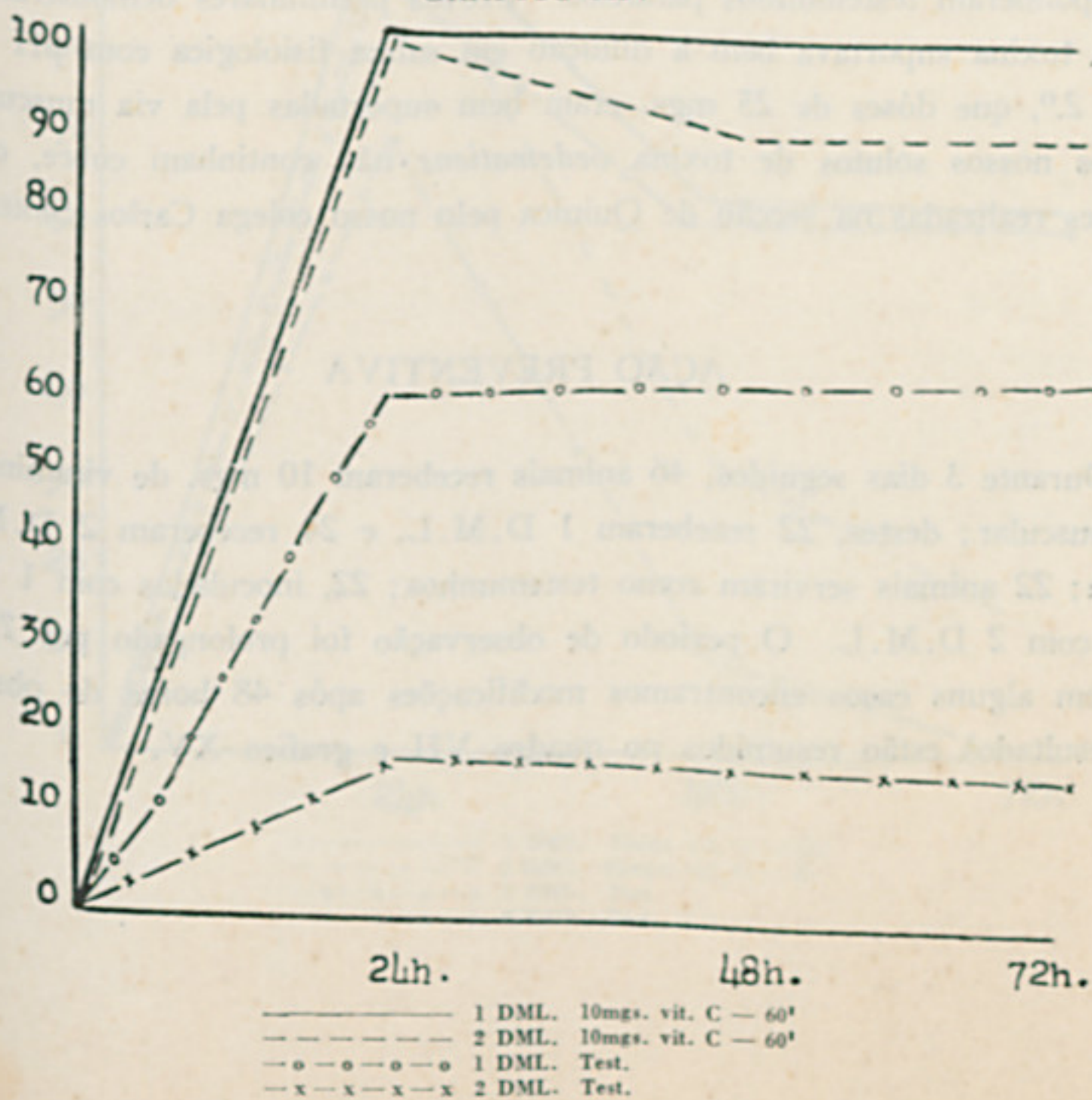


GRÁFICO XIV



niente de cultura de 6 dias a 37° C. A toxina foi recolhida e seca em baixa temperatura sobre cloreto de calcio e depois sobre anidrido fosforico até peso constante. Triturada e tamisada foi conservada em ampolas fechadas no vacuo. A D.M.L. desta toxina era de 0,000242.

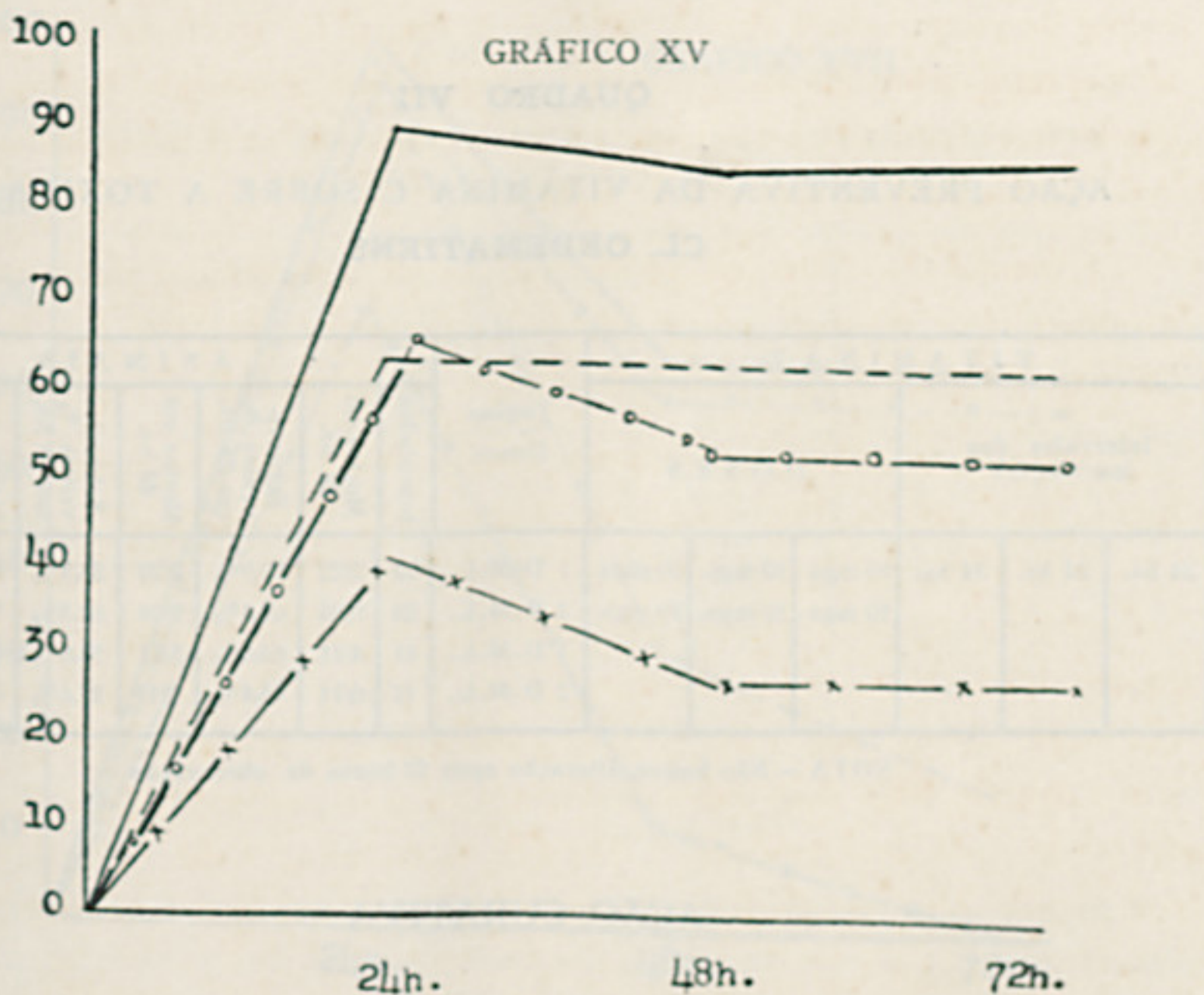
Vitamina C — Usamos vitamina C (acido 1-ascorbico) quimicamente puro na diluição de 50 mgs. por centimetro cubico, com pH 6,6 (\pm 0,1). Agradecemos á Casa Bayer a gentileza de no-la ter fornecido.

Animais de prova — Adotamos camondongos, de acôrdo com as recomendações da Comissão Permanente de Padronização Biologica da Liga das Nações (18) e do National Inst. of Health (19) expedidas sobre o doseamento das toxinas *oedematiens*. Usamos 4 lótes tão padronizados quanto possivel, em geral com a mesma idade e com peso variante de 17 a 20 gs.. A D.M.L., sendo aquella que mata alguns, mas não todos os camondongos injetados, exigiu que usassemos sempre lótes mais ou menos numerosos de camondongos. Com um lote de 60 animais determinamos a D.M.L.; com um de 68, a ação preventiva com um de 73, a ação curativa e com um de 100, a ação neutralizante.

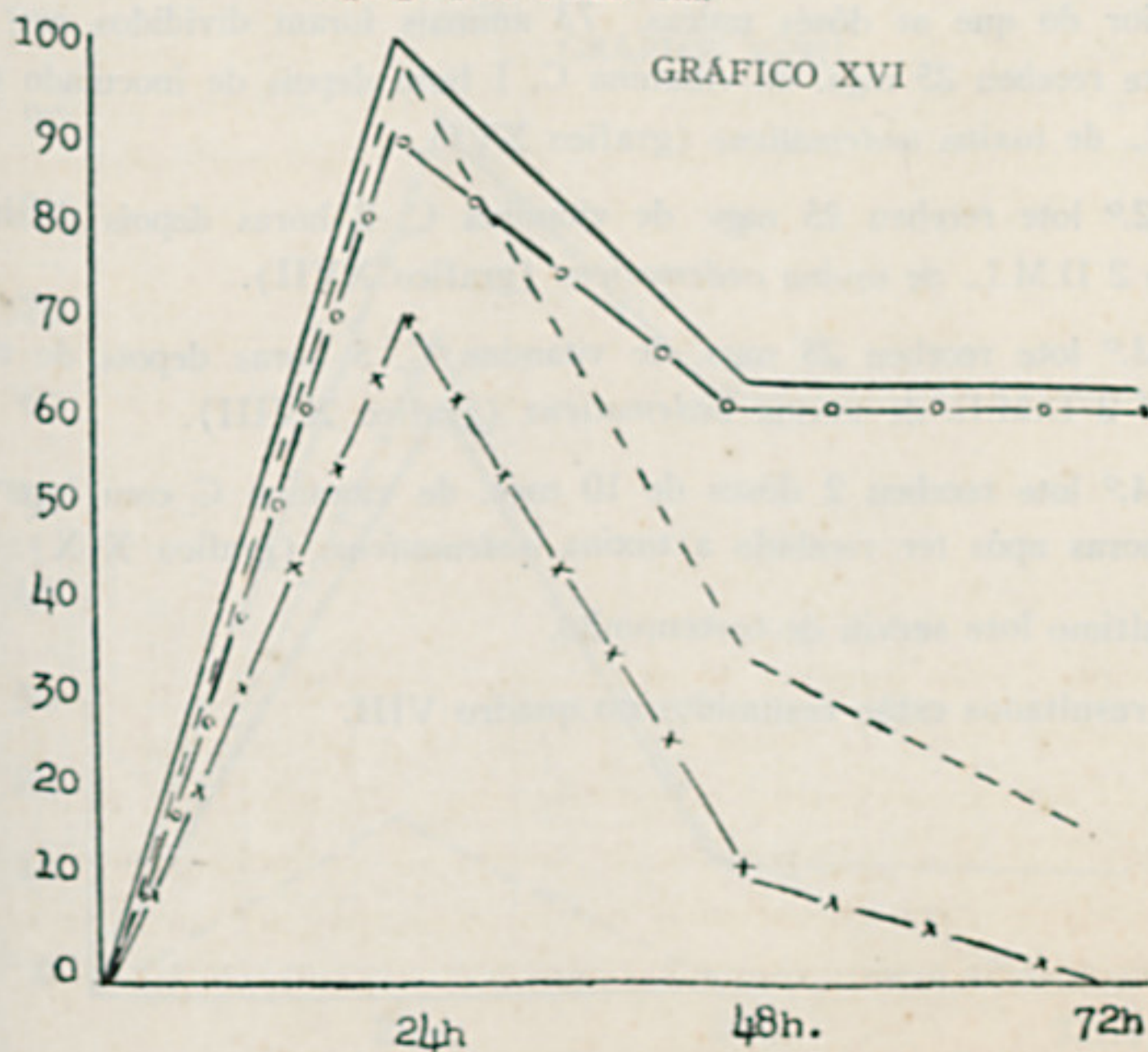
Não obstante as pesquisas de Grotova (20) sobre a via de inoculação venosa a que se deveria dar preferencia nos doseamentos da toxina do *Cl. oedematiens* preferimos seguir a tecnica indicada pela Liga das Nações (18), isto é, usamos a via muscular nas inoculações das toxinas de *Cl. oedematiens*. A vitamina C tambem foi aplicada por via muscular. A cada serie de pesquisas corresponderam testemunhos paralelos. Provas preliminares demonstraram: 1.º, que a toxina suportava bem a diluição em salina fisiologica com pH 6,6 (\pm 0,1); 2.º, que doses de 25 mgs. eram bem suportadas pela via muscular; 3.º, que os nossos solutos de toxina *oedematiens* não continham cobre, conforme analises realizadas na secção de Quinica pelo nosso colega Carlos Slotta.

AÇÃO PREVENTIVA

Durante 3 dias seguidos, 46 animais receberam 10 mgs. de vitamina C por via muscular; destes, 22 receberam 1 D.M.L. e 24 receberam 2 D.M.L. de toxina; 22 animais serviram como testemunhos; 22, inoculados com 1 D.M.L. e 11 com 2 D.M.L. O periodo de observação foi prolongado por 72 horas, pois em alguns casos encontramos modificações após 48 horas de observação. Os resultados estão resumidos no quadro VII e grafico XV.



————— 1 DML. 10mg. vit. C 3x24h.
 - - - - - 2 DML. 10mg. vit. C 3x24h.
 -o-o-o-o- 1 DML. Test.
 -x-x-x-x- 2 DML. Test.



————— 1 DML. 25mg. vit. C — 1h.
 - - - - - 2 DML. 25mg. vit. C — 1h.
 -o-o-o-o- 1 DML. Test.
 -x-x-x-x- 2 DML. Test.

QUADRO VII

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DE
CL. OEDEMATIENS

VITAMINA C						Toxina Doses	ANIMAIS						
Intervalos das inoculações			D O S E S				Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.	Mortos em 72 hs.	Sobrevi- ventes % em 72 hs.
24 hs.	24 hs.	34 hs.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D.M.L.	22	2/22	90,9%	3/22	86,3%	3/22	86,3%
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	2 D.M.L.	24	9/24	62,5%	9/24	62,5%	9/24	62,5%
						1 D.M.L.	11	4/11	63,6%	5/11	54,6%	5/11	54,5%
						2 D.M.L.	11	6/11	45,4%	8/11	27,4%	8/11	27,2%

NOTA — Não houve alteração após 72 horas de observação

AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.º, qual o periodo em que a vitamina C poderia exercer ação curativa; 2.º, si doses repetidas de vitamina C teriam ação curativa maior do que as doses unicas. 73 animais foram divididos em 5 lotes: o 1.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 1 hora depois de inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina *oedematiens* (grafico XVI).

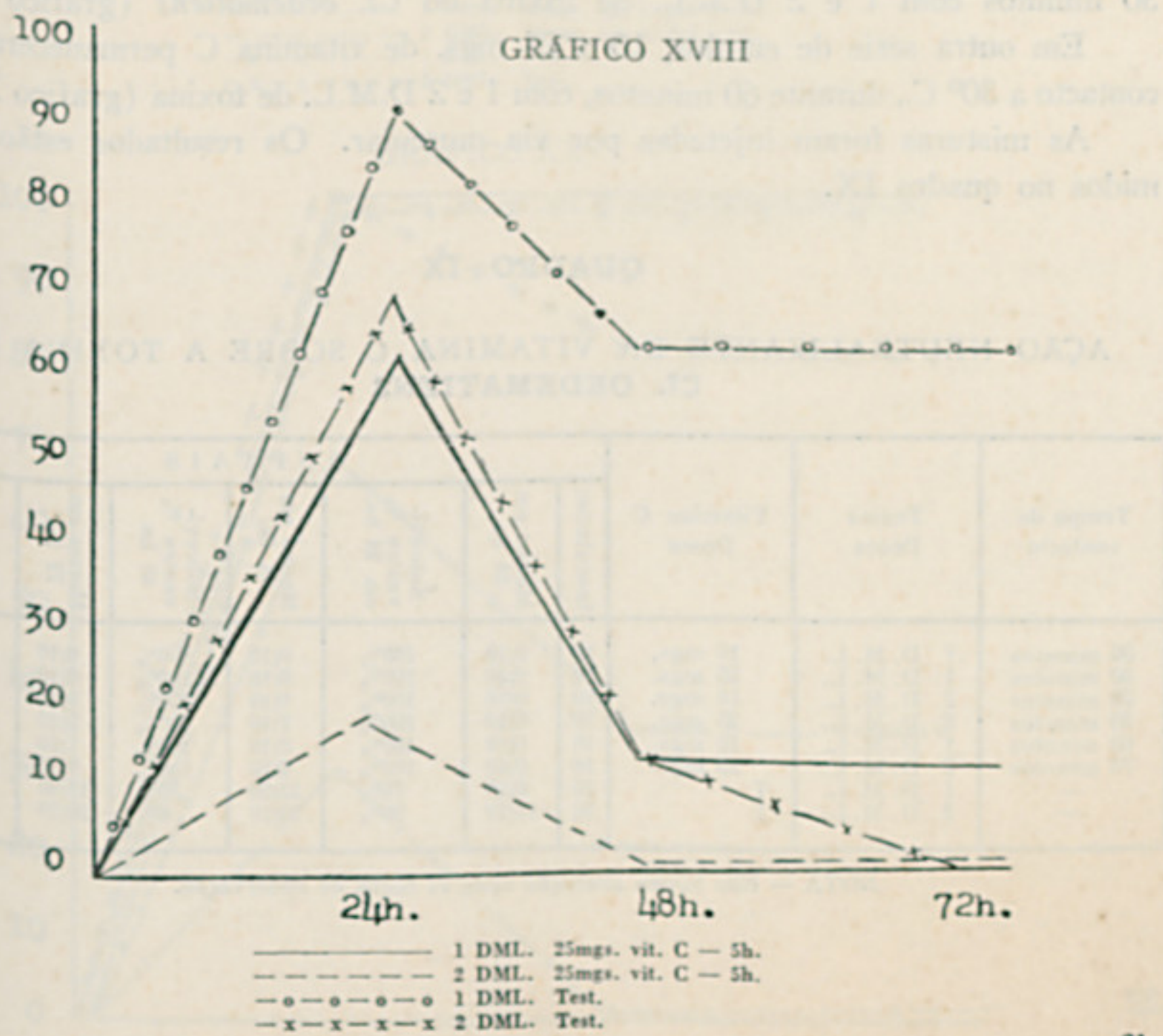
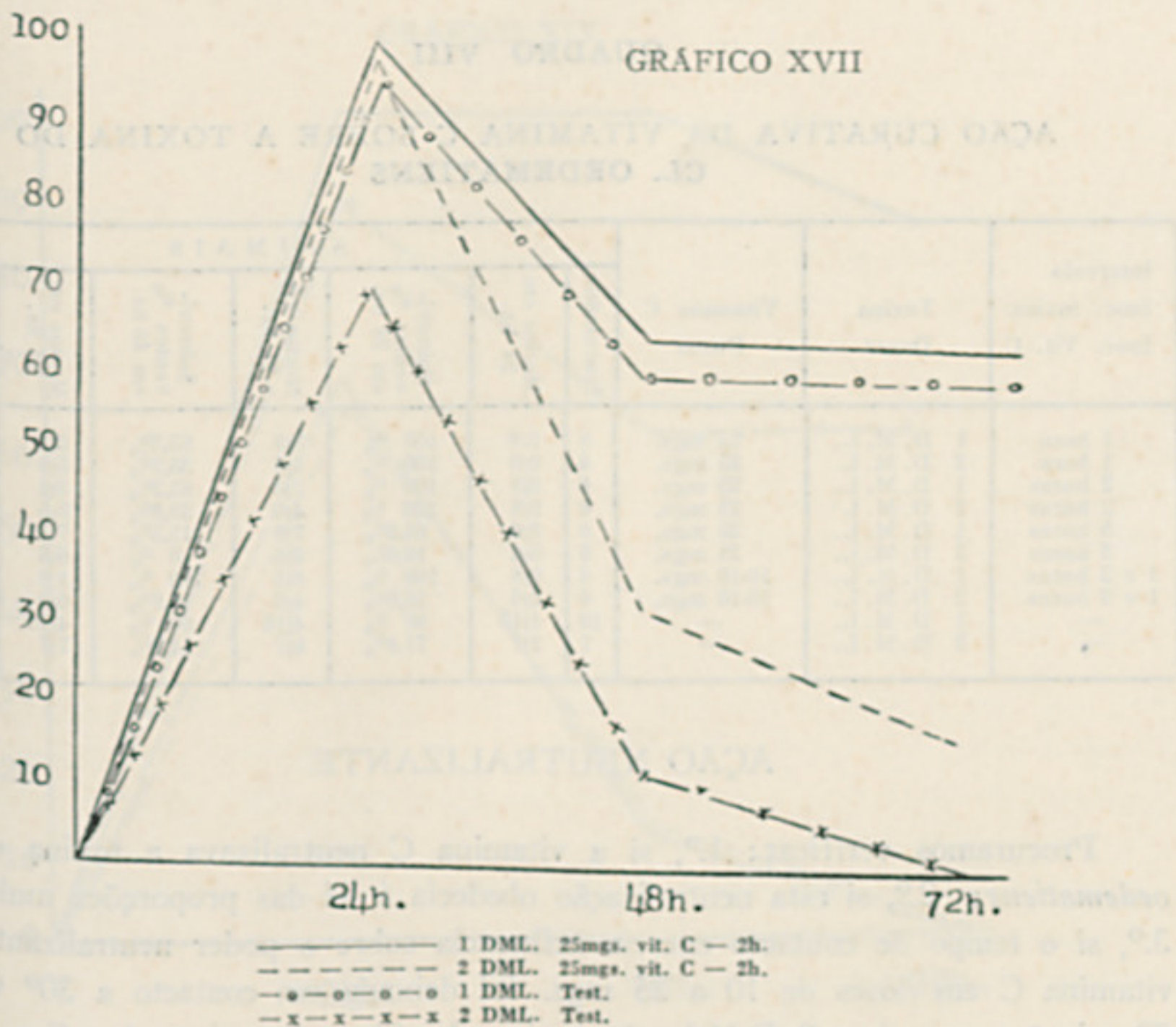
O 2.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 2 horas depois de inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina *oedematiens* (grafico XVII).

O 3.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 5 horas depois de inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina *oedematiens* (grafico XVIII).

O 4.º lote recebeu 2 doses de 10 mgs. de vitamina C com intervalos de 1 e 3 horas após ter recebido a toxina *oedematiens*. (grafico XIX).

O ultimo lote serviu de testemunho.

Os resultados estão resumidos no quadro VIII.



QUADRO VIII

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO
CL. OEDEMATIENS

Intervalo Inoc. toxina: Inoc. Vit. C	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS						
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.	Mortos em 72 hs.	Sobrevi- ventes % em 72 hs.
1 hora	1 D. M. L.	25 mgs.	8	0/8	100 %	3/8	63,3%	3/8	63,3%
1 hora	2 D. M. L.	25 mgs.	6	0/6	100 %	4/6	66,6%	5/6	83,3%
2 horas	1 D. M. L.	25 mgs.	8	0/8	100 %	3/8	63,3%	3/8	63,3%
2 horas	2 D. M. L.	25 mgs.	6	0/6	100 %	4/6	66,6%	5/6	83,3%
5 horas	1 D. M. L.	25 mgs.	8	3/8	63,3%	7/8	12,5%	7/8	12,5%
5 horas	2 D. M. L.	25 mgs.	6	5/6	16,6%	6/6	0 %	6/6	0 %
1 e 3 horas	1 D. M. L.	10-10 mgs.	8	0/8	100 %	0/8	100 %	1/8	87,5%
1 e 3 horas	2 D. M. L.	10-10 mgs.	6	2/6	16,6%	4/6	16,6%	6/6	0 %
—	1 D. M. L.	—	10	1/10	90 %	4/10	60 %	4/10	60 %
—	2 D. M. L.	—	7	2/7	71,4%	6/7	14,2%	7/7	0 %

AÇÃO NEUTRALIZANTE

Procuramos verificar: 1.º, si a vitamina C neutralizava a toxina do *Cl. oedematiens*; 2.º, si esta neutralização obedecia á lei das proporções multiplas; 3.º, si o tempo de contacto exercia influencia sobre o poder neutralizante. A vitamina C em doses de 10 a 25 mgs. foi deixada em contacto a 30° C por 30 minutos com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. oedematiens* (grafico XX).

Em outra serie de ensaios, 10 a 25 mgs. de vitamina C permaneceram em contacto a 30° C., durante 60 minutos, com 1 e 2 D.M.L. de toxina (grafico XXI).

As misturas foram injetadas por via muscular. Os resultados estão resumidos no quadro IX.

QUADRO IX

AÇÃO NEUTRALIZANTE DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO
CL. OEDEMATIENS

Tempo de contacto	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS						
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.	Mortos em 72 hs.	Sobrevi- ventes % em 72 hs.
30 minutos	1 D. M. L.	10 mgs.	10	0/10	100%	0/10	100%	0/10	100%
30 minutos	1 D. M. L.	25 mgs.	10	0/10	100%	0/10	100%	0/10	100%
30 minutos	2 D. M. L.	10 mgs.	10	0/10	100%	0/10	100%	0/10	100%
30 minutos	2 D. M. L.	25 mgs.	10	0/10	100%	2/10	80%	2/10	80%
60 minutos	1 D. M. L.	10 mgs.	10	0/10	100%	0/10	100%	1/10	100%
70 minutos	2 D. M. L.	25 mgs.	10	0/10	100%	0/10	100%	0/10	100%
—	1 D. M. L.	T	20	6/20	70%	13/20	35%	13/20	35%
—	2 D. M. L.	T	20	14/20	30%	20/20	0%	20/20	0%

NOTA — Não houve alteração após 72 horas de observação.

GRÁFICO XIX

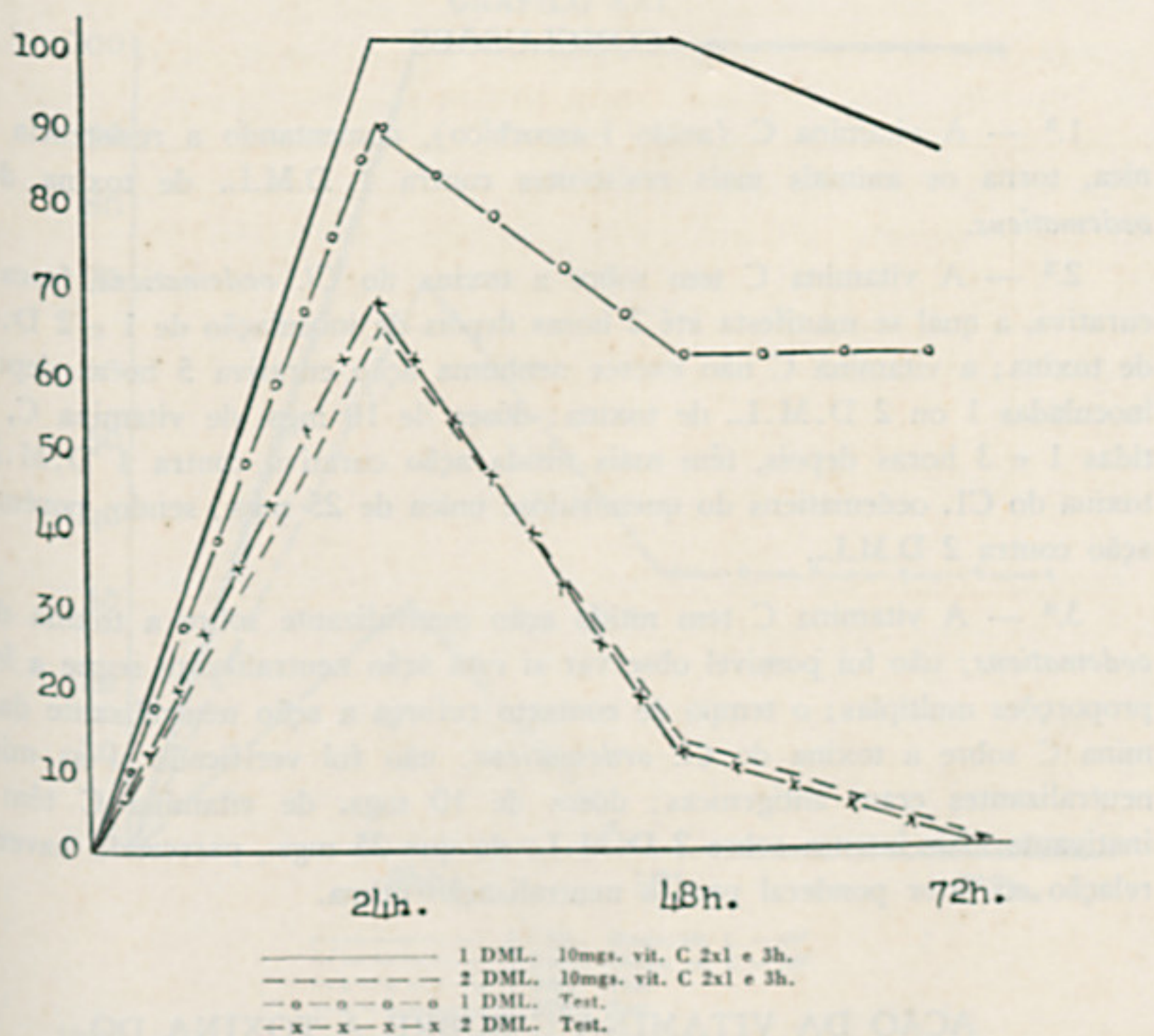
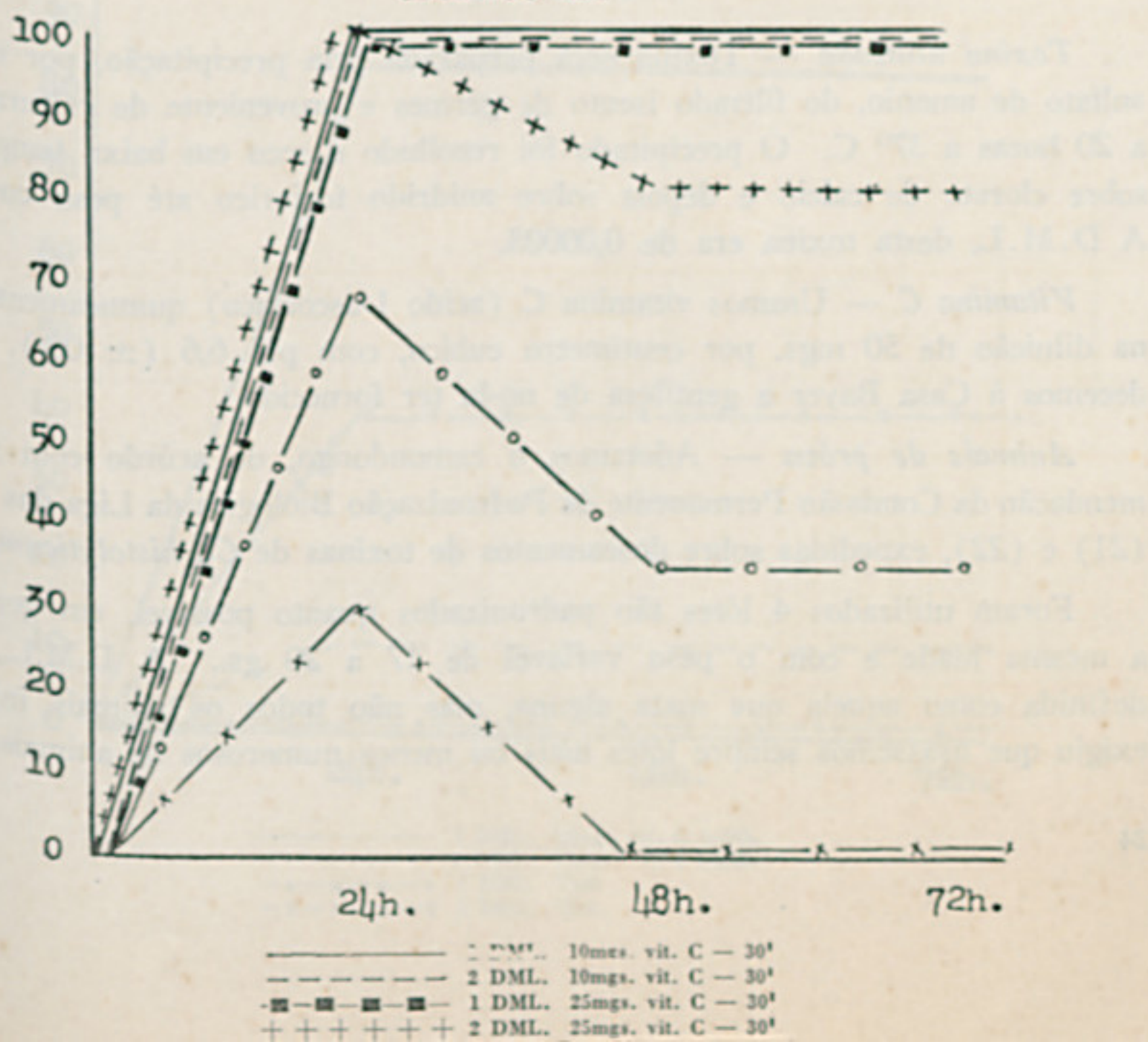


GRÁFICO XX



CONCLUSÕES

1.^a — A vitamina C (acido 1-ascorbico), aumentando a resistencia organica, torna os animais mais resistentes contra 1 D.M.L. de toxina de *Cl. oedematiens*.

2.^a — A vitamina C tem sobre a toxina do *Cl. oedematiens* fraca ação curativa, a qual se manifesta até 2 horas depois da inoculação de 1 e 2 D.M.L. de toxina; a vitamina C não exerce nenhuma ação curativa 5 horas depois de inoculadas 1 ou 2 D.M.L. de toxina; doses de 10 mgs. de vitamina C, repetidas 1 e 3 horas depois, têm mais nitida ação curativa contra 1 D.M.L. de toxina do *Cl. oedematiens* do queumadose unica de 25 mgs., sendo, porém, sem ação contra 2 D.M.L..

3.^a — A vitamina C tem nitida ação neutralizante sobre a toxina do *Cl. oedematiens*; não foi possível observar si esta ação neutralizante segue a lei das proporções multiplas; o tempo de contacto reforça a ação neutralizante da vitamina C sobre a toxina do *Cl. oedematiens*; não foi verificada si as misturas neutralizantes eram antigenicas; doses de 10 mgs. de vitamina C têm ação inativante mais intensa sobre 2 D.M.L. do que 25 mgs., parecendo haver uma relação ou fator ponderal para a neutralização ótima.

AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO
CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM

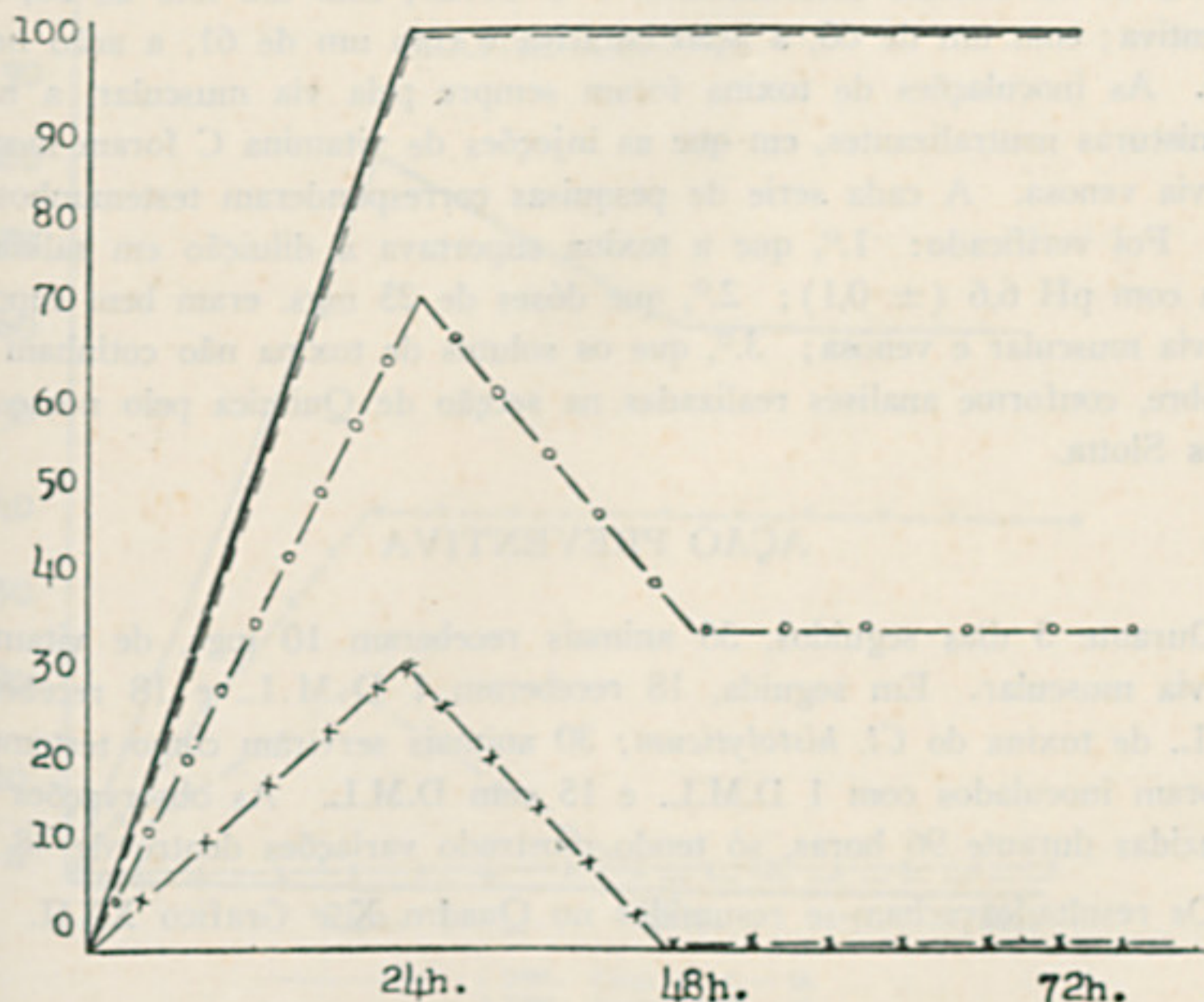
Toxina utilizada — Toxina seca preparada pela precipitação, por meio de sulfato de amonio, do filtrado isento de germes e proveniente de cultura de 18 a 20 horas a 37° C. O precipitado foi recolhido e seco em baixa temperatura sobre cloreto de calcio e depois sobre anidrido fosforico até peso constante. A D.M.L. desta toxina era de 0,00003.

Vitamina C — Usamos vitamina C (acido 1-ascorbico) quimicamente puro, na diluição de 50 mgs. por centimetro cubico, com pH 6,6 ($\pm 0,1$). Agradecemos á Casa Bayer a gentileza de no-la ter fornecido

Animais de prova — Adotamos o camondongo, de acôrdo com a recomendação da Comissão Permanente de Padronização Biologica da Liga das Nações (21) e (22), expedidas sobre doseamentos de toxinas de *Cl. histolyticum*.

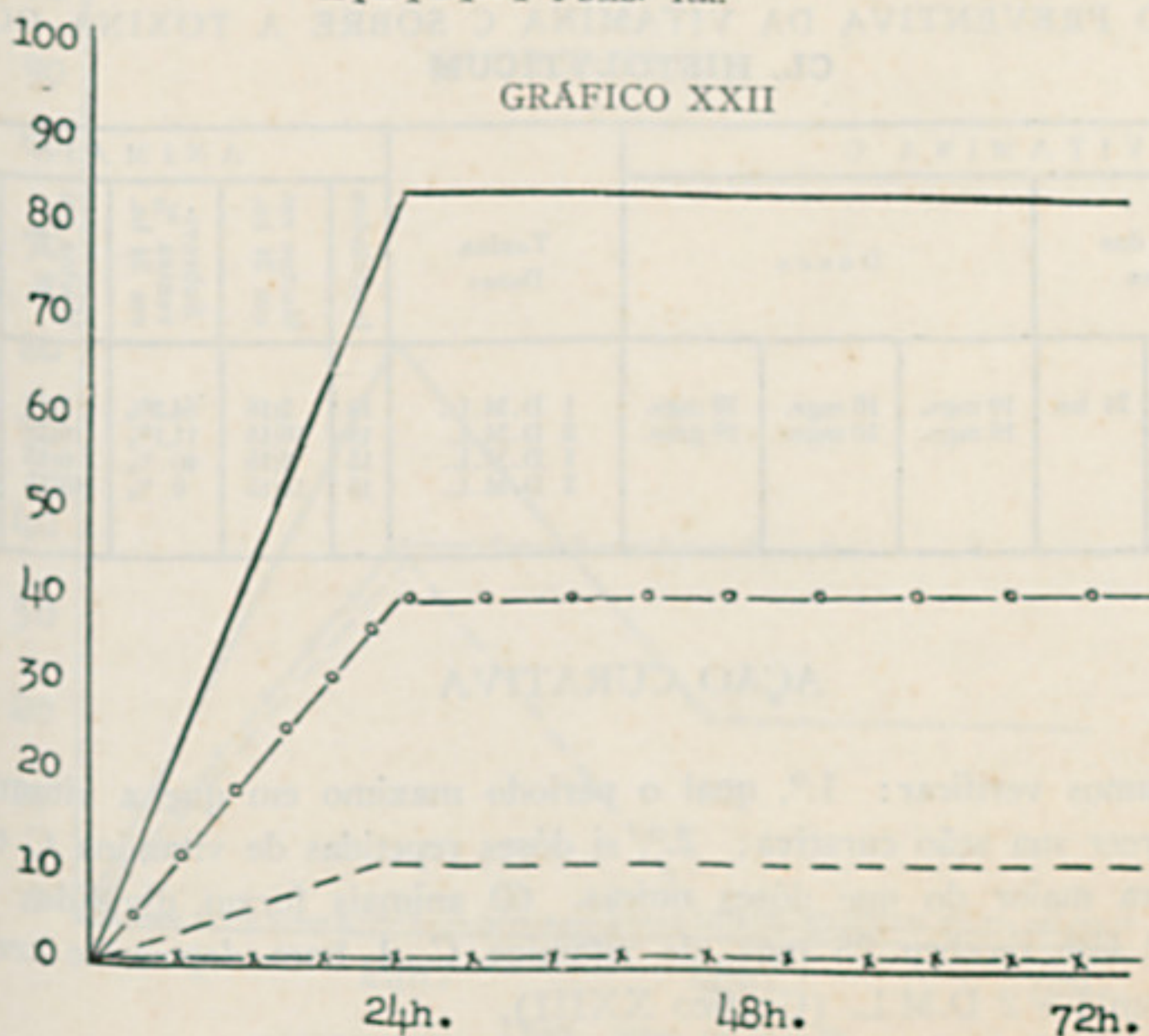
Foram utilizados 4 lótes tão padronizados quanto possível, em geral com a mesma idade e com o peso variavel de 17 a 20 gs.. A D.M.L., sendo definida como aquela que mata alguns, mas não todos os animais injetados, exigiu que usassemos sempre lótes mais ou menos numerosos de animais. Com

GRÁFICO XXI



————— 1 DML. 10mgs. vit. C - 60'
 - - - - - 2 DML. 25mgs. vit. C - 60'
 -o-o-o-o-o- 1 DML. Test.
 -x-x-x-x-x- 2 DML. Test.

GRÁFICO XXII



————— 1 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
 - - - - - 2 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
 -o-o-o-o-o- 1 DML. Test.
 -x-x-x-x-x- 2 DML. Test.

um lote de 60 animais determinamos a D.M.L.; com um lote de 56, a ação preventiva; com um de 60, a ação curativa e com um de 61, a ação neutralizante. As inoculações de toxina foram sempre pela via muscular, a não ser nas misturas neutralizantes, em que as injeções de vitamina C foram inoculadas pela via venosa. A cada serie de pesquisas corresponderam testemunhos paralelos. Foi verificado: 1.º, que a toxina suportava a diluição em salina fisiologica com pH 6,6 ($\pm 0,1$); 2.º, que doses de 25 mgs. eram bem suportadas pela via muscular e venosa; 3.º, que os solutos de toxina não continham traços de cobre, conforme analyses realizadas na secção de Quimica pelo nosso colega Carlos Slotta.

AÇÃO PREVENTIVA

Durante 3 dias seguidos, 36 animais receberam 10 mgs. de vitamina C pela via muscular. Em seguida, 18 receberam 1 D.M.L. e 18 receberam 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum*; 30 animais serviram como testemunhos: 15 foram inoculados com 1 D.M.L. e 15 com 2 D.M.L. As observações foram conduzidas durante 96 horas, só tendo mostrado variações dentro de 48 horas.

Os resultados acham-se resumidos no Quadro X e Grafico XXII.

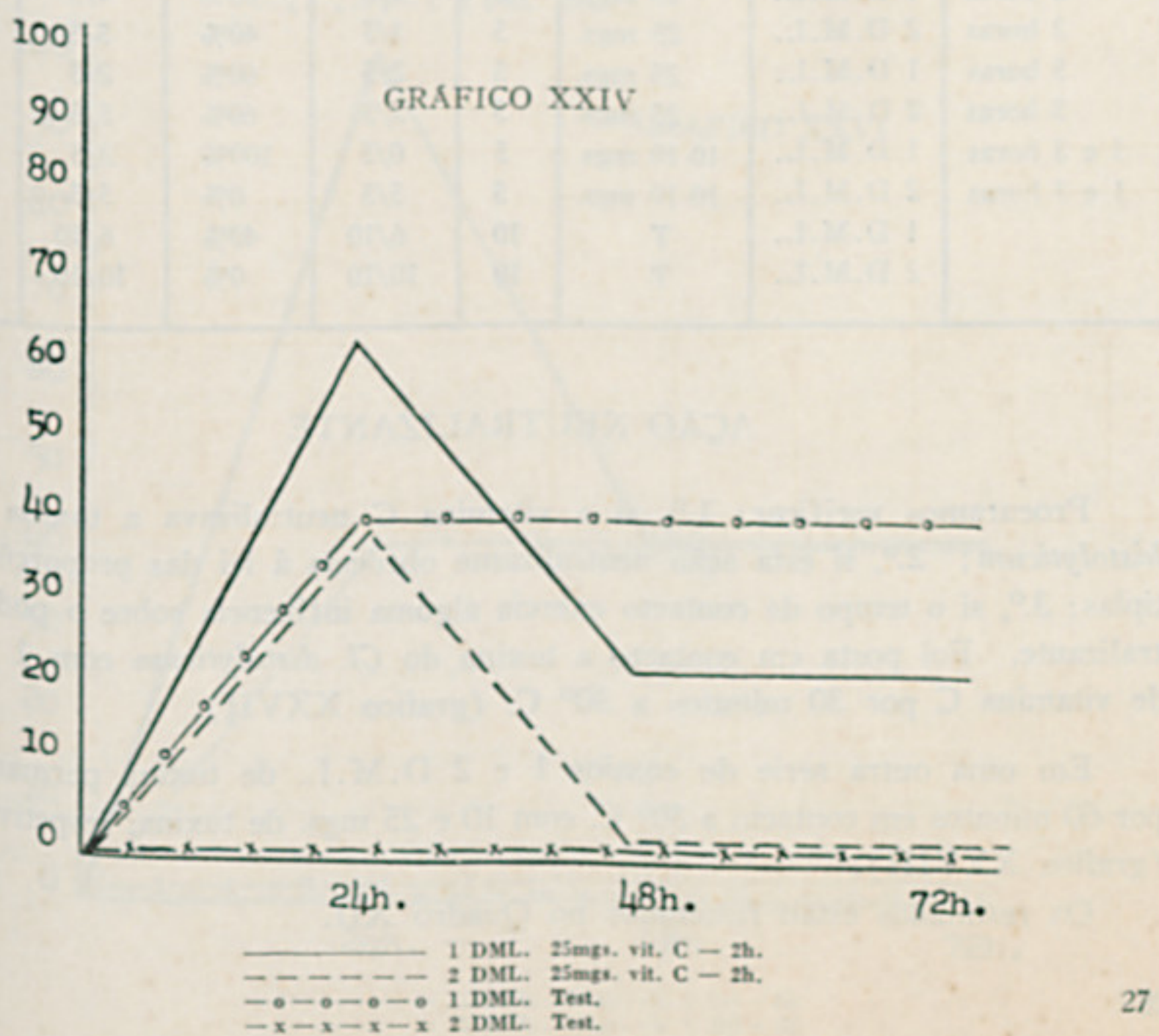
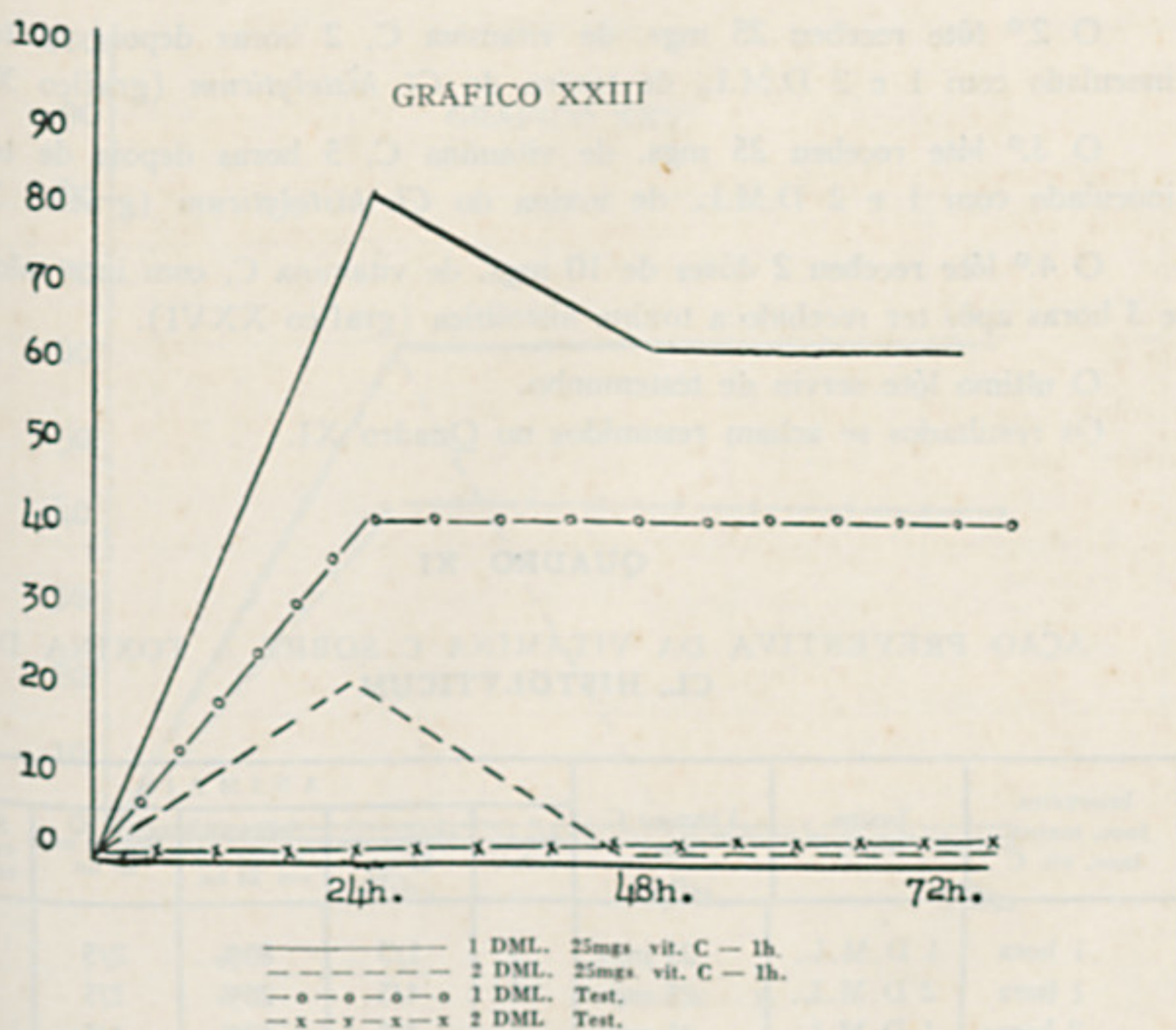
QUADRO X

ACÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CL. HISTOLYTICUM

VITAMINA C						Toxina Doses	ANIMAIS				
Intervalos das inoculações			Doses				Inoculados	Mortos em em 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.
24 hs.	24 hs.	24 hs.	10 mgs. 10 mgs.	10 mgs. 10 mgs.	10 mgs. 10 gms.	1 D.M.L. 2 D.M.L.	18 18	2 18 16 18	84,3% 11,1%	3 18 16 18	83,3% 11,1%
						1 D.M.L. 2 D.M.L.	15 15	6 15 15 15	40 % 0 %	6 15 15 15	40 % 0 %

AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.º, qual o periodo maximo em que a vitamina C poderia exercer sua ação curativa; 2.º, si doses repetidas de vitamina C teriam ação curativa maior do que doses unicas. 60 animais foram divididos em 5 lotes: o 1.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 1 hora depois de ter sido inoculado com 1 e 2 D.M.L. (Grafico XXIII).



O 2.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 2 horas depois de ter sido inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum* (grafico XXIV).

O 3.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 5 horas depois de ter sido inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum* (grafico XXV).

O 4.º lote recebeu 2 doses de 10 mgs. de vitamina C, com intervalos de 1 e 3 horas após ter recebido a toxina histolitica (grafico XXVI).

O ultimo lote serviu de testemunho.

Os resultados se acham resumidos no Quadro XI.

QUADRO XI

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO *CL. HISTOLYTICUM*

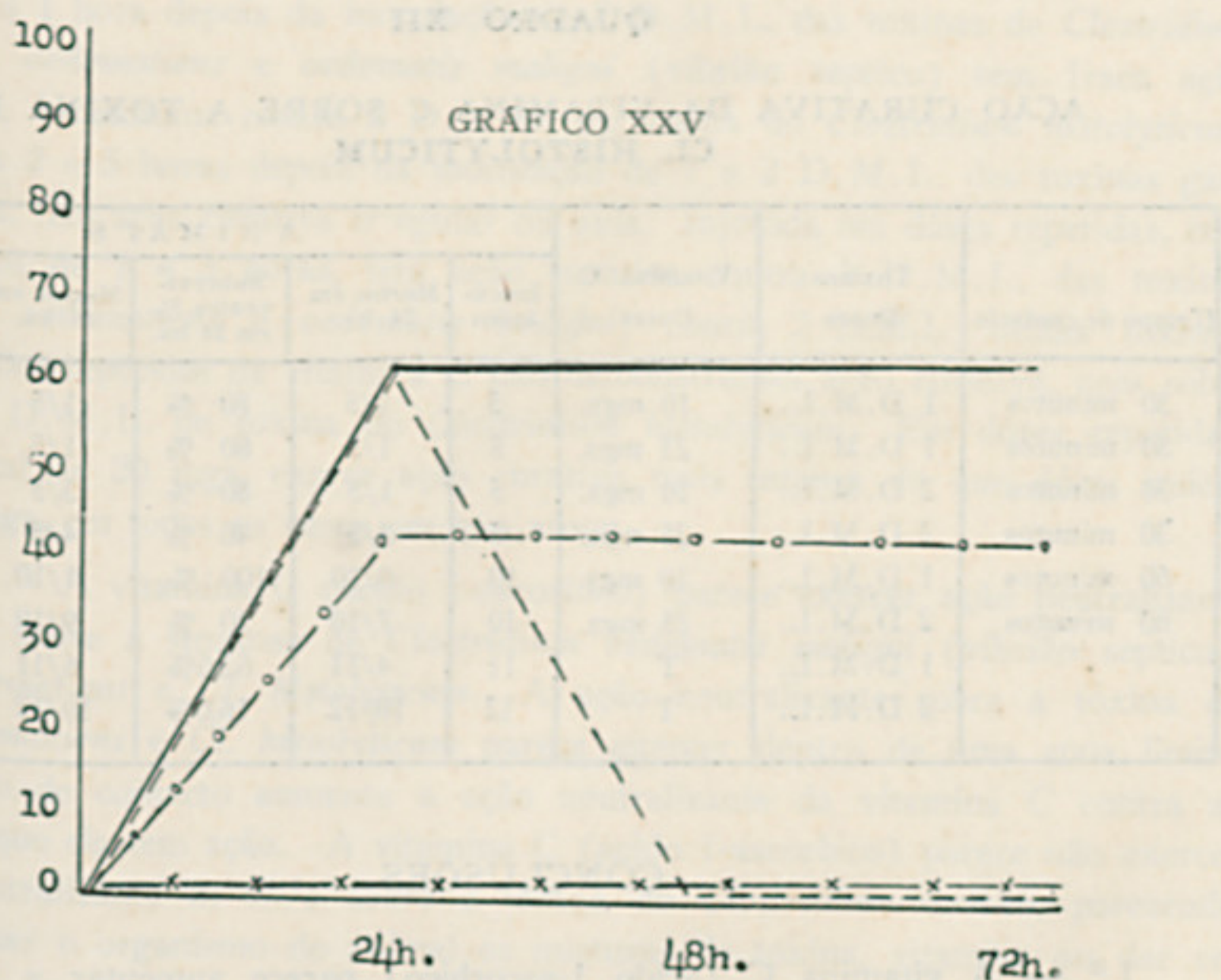
Intervalos Inoc. toxina : Inoc. vit. C	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inocu- lados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.
1 hora	1 D.M.L.	25 mgs.	5	1/5	80%	2/5	60%
1 hora	2 D.M.L.	25 mgs.	5	4/5	20%	2/5	20%
2 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60%	4/5	20%
2 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40%	5/5	0%
5 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60%	2/5	60%
5 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60%	5/5	0%
1 e 3 horas	1 D.M.L.	10-10 mgs.	5	0/5	100%	3/5	40%
1 e 3 horas	2 D.M.L.	10-10 mgs.	5	5/5	0%	5/5	0%
	1 D.M.L.	T	10	6/10	40%	6/10	40%
	2 D.M.L.	T	10	10/10	0%	10/10	0%

AÇÃO NEUTRALIZANTE

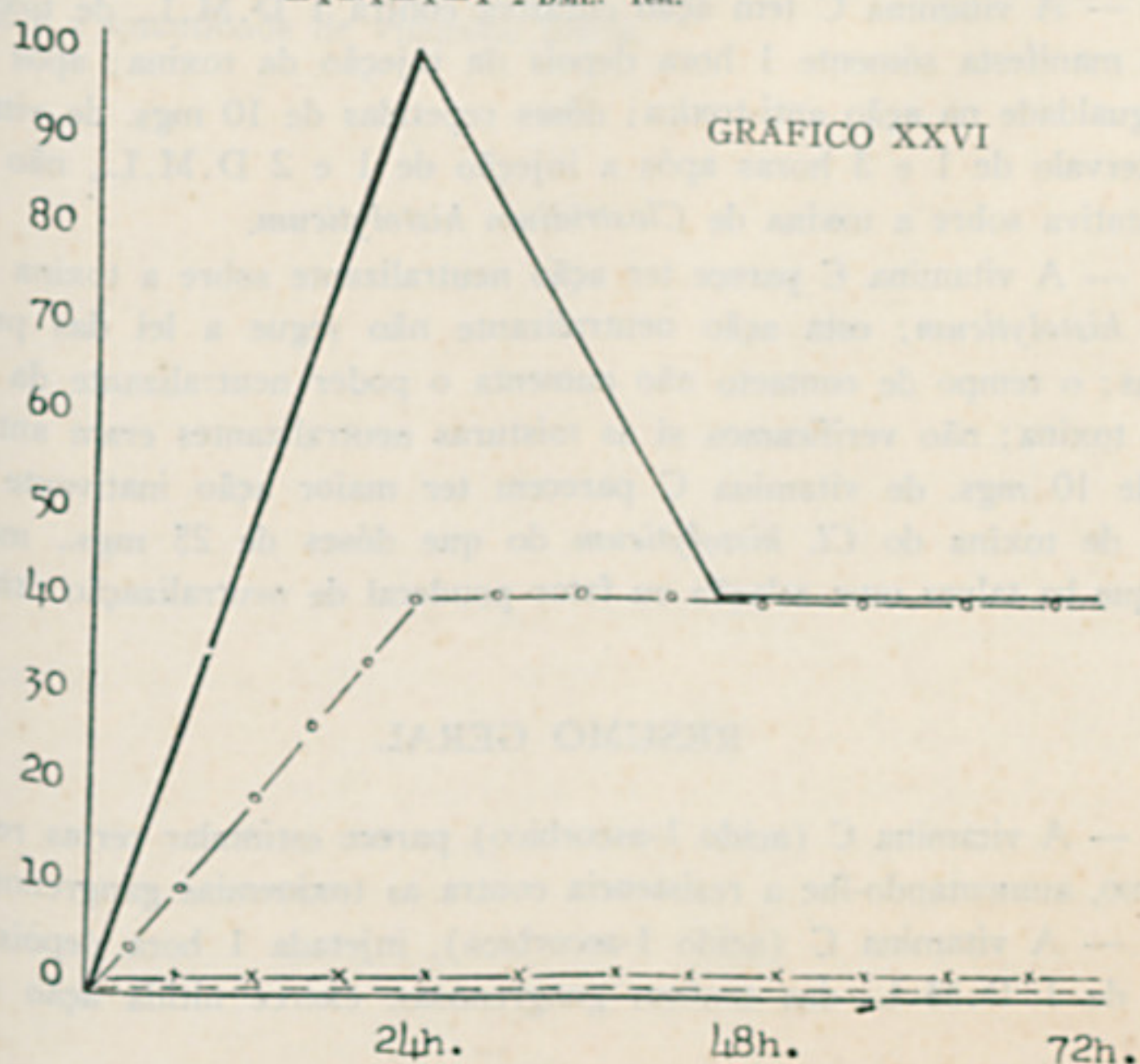
Procuramos verificar: 1.º, si a vitamina C neutralizava a toxina do *Cl. histolyticum*; 2.º, si esta ação neutralizante obedecia á lei das proporções multiplas; 3.º, si o tempo de contacto exercia alguma influencia sobre o poder neutralizante. Foi posta em contacto a toxina do *Cl. distolyticum* com 1 D.M.L. de vitamina C por 30 minutos a 30º C. (grafico XXVII).

Em uma outra serie de ensaios 1 e 2 D.M.L. de toxina permaneceram por 60 minutos em contacto a 30º C. com 10 e 25 mgs. de toxina, respectivamente. (grafico XXVIII).

Os resultados estão resumidos no Quadro XII.



——— 1 DML. 25mgs. vit. C — 5h.
 - - - - - 2 DML. 25mgs. vit. C — 5h.
 - o - o - o - o 1 DML. Test.
 - x - x - x - x 2 DML. Test.



——— 1 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
 - - - - - 2 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
 - o - o - o - o 1 DML. Test.
 - x - x - x - x 2 DML. Test.

QUADRO XII

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO
CL. HISTOLYTICUM

Tempo de contacto	Toxinas Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inocu- lados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi- ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi- ventes % em 48 hs.
30 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	5	1/5	80 %	1/5	80 %
30 minutos	1 D.M.L.	25 mgs.	5	1/5	80 %	1/5	80 %
30 minutos	2 D.M.L.	10 mgs.	5	1/5	80 %	3/5	40 %
30 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40 %	4/5	20 %
60 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	10	0/10	100 %	1/10	90 %
60 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	10	7/10	30 %	9/10	10 %
	1 D.M.L.	T	11	4/11	63,6%	6/11	45,4%
	2 D.M.L.	T	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

CONCLUSÕES

1.^a — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece aumentar a resistencia organica do camondongo, tornando-o mais resistente contra 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum*.

2.^a — A vitamina C tem ação curativa contra 1 D.M.L. de toxina; esta ação se manifesta sómente 1 hora depois da injeção da toxina; após 2 horas, ha desigualdade na ação anti-toxica; doses repetidas de 10 mgs. de vitamina C, com intervalo de 1 e 3 horas após a injeção de 1 e 2 D.M.L., não exercem ação curativa sobre a toxina de *Clostridium histolyticum*.

3.^a — A vitamina C parece ter ação neutralizante sobre a toxina do *Clostridium histolyticum*; esta ação neutralizante não segue a lei das proporções multiplas; o tempo de contacto não aumenta o poder neutralizante da vitamina sobre a toxina; não verificamos si as misturas neutralizantes eram antigenicas? doses de 10 mgs. de vitamina C parecem ter maior ação inativante sobre 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum* do que doses de 25 mgs., mostrando, assim, que ha talvez uma relação ou fator ponderal de neutralização ótima.

RESUMO GERAL

1.^o — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece estimular certas reações do organismo, aumentando-lhe a resistencia contra as toxinemias gangrenosas.

2.^o — A vitamina C (acido 1-ascorbico), injetada 1 hora depois da inoculação de 1 D.M.L. das toxinas gangrenosas, exerce nitida ação curativa;

injetadas 1 hora depois da inoculação de 2 D.M.L. das toxinas de *Clostridium welchii*, *oedematiens* e *oedematis maligni* (vibrião septico) tem fraca ação curativa, e nenhuma contra 2 D.M.L. da toxina do *Clostridium histolyticum*. Injetada 2 e 5 horas depois da inoculação de 1 e 2 D.M.L. das toxinas gangrenosas, tem ação curativa irregular ou nula. Injetada em doses repetidas, com intervalos de 1 e 3 horas, tem ação curativa contra 1 D.M.L. das toxinas *welchii*, *oedematiens* e *oedematis maligni*; contra 2 D.M.L. destas toxinas, as injeções repetidas de vitamina C não demonstraram ação curativa, nem sobre 1 ou 2 D.M.L. da toxina do *Clostridium histolyticum*. Em doses repetidas, num total de 20 mgs. exerce ação curativa mais intensa do que doses unicas de 25 mgs. em todos os casos em que atuou.

3.º — A vitamina C (acido l-ascorbico) parece exercer ação neutralizante *in vitro* sobre a toxinas de *Clostridium oedematis maligni* (vibrião septico), *Cl. oedematiens* e *Cl. histolyticum*. A ação neutralizante sobre a toxina do *Cl. oedematiens* e *Cl. histolyticum* parece exercer dentro de uma zona limite. O tempo de contacto aumenta a ação neutralizante da vitamina C contra as toxinas que ela tem ação. A vitamina C (acido l-ascorbico) parece não exercer ação neutralizante *in vitro* sobre a toxina do *Clostridium welchii*, parecendo sensibilizar o organismo do animal ás misturas de toxina, vitamina ou dar em contato com a toxina do *Clostridium welchii*, produtos de degradação mais toxicos para o camondongo do que a toxina só. A intensidade da ação toxica destes produtos é diretamente proporcional: ao tempo das misturas, toxina, vitamina e a quantidade de vitamina usada.

