

Departamento de Química Orgânica e Biológica
Diretor: Prof. Dr. Fonseca Ribeiro

ESTUDO SOBRE A AÇÃO ANTITÓXICA DA CLOROFILA PRIMEIROS RESULTADOS COM O VENENO CROTÁLICO (*CROTALUS TERRIFICUS TERRIFICUS*) E TOXINA TETÂNICA

POR

Fonseca Ribeiro e Laerte M. Guimarães

Em trabalhos orientados com o fim de indagar de uma possível ação da clorofila em intoxicações experimentais de animais de laboratório por toxinas várias, fomos logo conduzidos ao emprego de um derivado hidrossolúvel daquele pigmento por ser de mais fácil e cômodo manejo.

Na grande série dos derivados conhecidos da clorofila figuram os sais de potássio das clorofilinas cuja solubilidade em água e facilidade de obtenção justificaram a sua escolha. De fato as clorofilas (A e B), que representam ésteres do fitol, podem ser saponificadas, mesmo a frio, libertando o álcool e originando o clorofilinato de potássio.

Em provas preliminares observamos que soluções recentes de clorofilinato de potássio protegiam animais contra a injeção de dose mortal de veneno crotálico (*Crotalus terrificus terrificus*), depois de expostas a irradiações de determinado comprimento de onda.

Estes primeiros resultados podem ser julgados das seguintes experiências:

1.º) cobaia — peso 410 gr.; 2 D.M.M. de veneno crotálico de mistura com 1 cm.³ de solução recente de clorofilinato de potássio a 0,2%, injetadas às 10,30 horas: paresia às 15,30 horas; morte às 17,25 horas.

2.º) cobaia — peso 420 gr.; 2 D.M.M. de veneno crotálico e 1 cm.³ de solução recente de clorofilinato de potássio a 0,2%, a mistura com exposição prévia à luz artificial durante 1,45 horas; injeção às 11,25 horas; até a tarde não apresentou sintomas evidentes porem amanheceu morta no dia imediato.

3.º) cobaia — peso 460 gr.; 2 D.M.M. de veneno crotálico e 1 cm.³ de solução recente de clorofilinato de potássio a 0,2%, a mistura com exposição prévia à luz solar durante cerca de 3 horas; injeção às 10,25 horas; paresia às 15,15 horas; às 16 horas contratura dos músculos cervicais; morte às 20,35 horas.

4.º) cobaia — peso 400 gr.; 2 D.M.M. de veneno crotálico e 1 cm.³ de solução recente de clorofilinato de potássio a 0,2%, a mistura com exposição prévia à *luz ultra-violeta* durante 15 minutos; injeção às 10 horas; nenhum sintoma de intoxicação; *sobreviveu*.

5.º) cobaia — peso 440 gr.; repetido o protocolo n.º 4 usando 5 D.M.M. de veneno crotálico com 1 cm.³ da solução de clorofilinato, a mistura irradiada ao *ultra-violeta* por 15 minutos; injeção às 9,30 horas; nenhum sintoma de intoxicação; *sobreviveu*.

6.º) cobaia — peso 450 gr.; 2 D.M.M. de veneno crotálico com 1 cm.³ da solução de clorofilinato, a mistura irradiada ao *ultra-violeta* por 15 minutos; no momento da injeção a mistura é acrescida de mais 3 D.M.M. sem irradiar; injeção às 9,35 horas; nesse dia nenhum sintoma de intoxicação; no dia imediato mostrou discreta paresia e inchaço no ponto inoculado; os sintomas desapareceram gradativamente; *sobreviveu*.

Tais provas, com caráter preliminar, mostraram que o clorofilinato de potássio é dotado de uma propriedade antitóxica para o veneno de cobra (crotálico) depois de um processo de ativação ao *ultra-violeta*. Elas não bastam entretanto para assegurar que apenas o *ultra-violeta* tem a propriedade de ativação, mesmo porque a luz solar contendo também *ultra-violeta* deveria agir em dependência de um maior ou menor espaço de tempo; inclusive como as folhas de onde proveio a clorofila estiveram seguramente, por muito tempo expostas ao sol, houve bastante oportunidade para que o pigmento fosse *ativado*, e como tal se mostrasse depois de extraído, o que não aconteceu; é de crer, pois que esse tipo de ativação possa se registrar apenas em produtos derivados, como o clorofilinato de potássio que empregamos e não no pigmento em forma de ester. Acontece ainda que as soluções de clorofilinato de potássio quando conservadas em laboratório por algumas semanas mostraram-se espontaneamente ativadas pelo envelhecimento. As alterações sofridas pela solução de clorofilinato de potássio pelo envelhecimento, conduzem assim a um processo de ativação comparável, ao menos no que respeita a prova biológica que utilizamos, às mesmas modificações que provocou o *ultra-violeta* num pequeno lapso de tempo; pela exposição à luz solar direta muito provavelmente se conseguiria a ativação num espaço de tempo intermediário ao do *ultra-violeta* e ao do envelhecimento da solução.

Em uma experimentação, ainda com o veneno crotálico, obtivemos os resultados constantes do seguinte quadro:

EXPERIMENTAÇÃO COM O VENENO DE COBRA

Animais	peso gramas	Clorofilinato de K solução a 0,2% (envelhecida)		Veneno crotálico		Observações
		sem irradiar	irradiado ao uvioleta 15'	sem irradiar	irradiado no uvioleta 15'	
1	720	—	—	3 D.M.M.	—	Morte c/ 18 hrs.
2	720	—	—	3 D.M.M.	—	Morte c/ 12 hrs.
3	640	—	—	3 D.M.M.	—	Morte c/ 17 hrs.
4	570	—	—	3 D.M.M.	—	Morte c/ 13 hrs.
5	540	—	—	3 D.M.M.	—	Morte c/ 16 hrs.
6	430	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Morte no 9.º dia (*)
7	460	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
8	540	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
9	380	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
10	500	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
11	350	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Morte c/ 7 hrs.
12	340	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
13	510	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
14	380	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Morte no 9.º dia (*)
15	490	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
16	580	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
17	380	—	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
18	385	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
19	320	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
20	315	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Morte no 9.º dia (*)
21	365	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
22	365	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
23	500	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
24	485	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
25	305	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
26	385	—	1 cm. ³	3 D.M.M.	—	Sobrevida
27	595	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	—	Sobrevida
28	555	1 cm. ³	—	3 D.M.M.	—	Sobrevida
29	500	1 cm. ³	—	—	3 D.M.M.	Morte c/ 24 hrs.
30	510	1 cm. ³	—	—	3 D.M.M.	Sobrevida

(*) Os animais marcados com um asterisco morreram 9 dias após a inoculação, provavelmente em consequência da baixa de temperatura ambiente e não em razão do efeito do tóxico.

Estes resultados elucidam bem alguns detalhes: é notável a proteção que pequenas quantidades de clorofilinato de potássio (ordem de 200 γ) exercem contra a intoxicação pelo veneno de cobra (3 D.M.M.), seja depois de sofrer um processo de irradiação ao ultra-

violeta (ns. 6 a 26) seja após o envelhecimento de suas soluções, em temperatura ambiente (ns. 27, 28 e 30).

Visto que as soluções de clorofilinato de potássio necessitam de um processo de ativação pelo qual adquirem a propriedade antitóxica, o fenômeno difere essencialmente do que se conhece para a chamada ação fotodinâmica de algumas substâncias, como o azul de metileno, por exemplo: o azul de metileno quando exposto à irradiação solar, de mistura com o veneno de cobra, inativa esse veneno, porem, o corante irradiado, isoladamente, permanece absolutamente ineficaz; também no caso da irradiação de solução de azul de metileno com veneno de cobra ou toxinas, se são destruídas as propriedades tóxicas, também são as propriedades antigenéticas do veneno da cobra ou da toxina, pelo que o animal de prova, não sofrendo sintomas de intolerância, igualmente não fica imunizado. Daí nos ter ocorrido indagar se no nosso fenômeno haveria concomitante inibição das propriedades antigenéticas quando destruída a capacidade tóxica do veneno de cobra pelo clorofilinato de potássio.

Utilizamos-nos dos mesmos animais que sobreviveram na prova anterior acrescidos de um grupo de testemunhos, isto é, de animais garantidamente não imunizados, a ver se, pelas dosagens dos respectivos soros, seria possível uma indicação dos anticorpos do sangue.

Tal experiência foi encaminhada como segue: (*)

PROTOCOLO 1.º

Ação neutralizante do soro normal de cobaia para o veneno crotálico
Soro 0,5 — Veneno 0,0000075 — Vol. 2 cc. — 60' estufa 36°C.

Soro	Pombo	Hora	Dia 12 - 9 - 41 às 17,30'	Dia 13 - 9 - 41 às 8,15'
T ₁	341	15,28'	+ 90'	—
T ₂	339	15,32'	+ 90'	—
T ₃	332	15,36'	+ 90'	—
T ₄	344	17,01'	Paral.	+ A.
D. M. M. {	0,0000010	342	15,46'	∅
	0,0000015	337	15,49'	∅
	0,0000020	327	15,55'	∅
				Paral. + às 13 h.
				+ A.

NOTA: O sinal ∅ indica sobrevida; + indica morte; + A. indica que o animal amanheceu morto.

Sendo excessiva a quantidade de veneno empregada (5 D.M.M.), repetimos a mesma experiência com dose menor (2 D.M.M.):

(*) Agradecemos ao Dr. Mario Pereira, do Instituto Pinheiros, o auxílio que nos emprestou na feitura destas provas.

PROTOCOLO 2.º

Ação neutralizante do soro normal de cobaia para o veneno crotálico
Soro 0,5 — Veneno 0,000003 — Vol. 2 cc. — 60' estufa 36°C.

Soro	Pombo	Hora	Dia 13 - 9 - 41 às 12 hrs.	Dia 14 - 9 - 41 às 12 hrs.
T ₁	384	10,30'	∅	+ A.
T ₂	398	10,32'	∅	+ A.
T ₃	390	10,34'	∅	Paral.
T ₄	387	10,37'	∅	∅
D. M. M. 0,0000015	388	11 horas	∅	Paral. às 15 horas

Com esta prova ficou estabelecido que 0,5 cm.³ de soro normal de cobaia representam a quantidade limite para neutralização, de 2 D.M.M. de veneno crotálico. Isto posto procedemos, nos restantes soros, ao mesmo protocolo de experiência.

PROTOCOLO 3.º

Soro 0,5 — Veneno 0,000003 — Vol. 2 cc. — 60' estufa 36°C.

Soro	Pombo	Hora	Dia 15 - 9 - 41 às 17,15'	Dia 16 - 9 - 41 às 8,15'
7	358	14,30'	+ 17 hs.	—
8	401	14,33'	Paral.	Paral.
9	393	14,35'	»	+ A.
10	398	14,37'	∅	Paral.
12	382	14,39'	∅	+ A.
13	349	14,41'	∅	Paral.
15	402	14,44'	Paral.	+ A.
16	383	14,47'	»	+ A.
17	397	14,50'	∅	∅
18	399	14,52'	Paral.	+ A.
19	347	14,54'	∅	+ A.
21	396	14,56'	∅	+ A.
23	343	14,58'	∅	∅
24	403	15,00'	Paral.	+ A.
25	423	16,55'	∅	+ A.
26	713	15,12'	Paral.	+ A.
27	356	15,07'	∅	+ A.
28	421	16,57'	∅	+ A.
30	523	15,25'	∅	Paral.
T ₅	357	15,27'	∅	»
T ₆	400	15,29'	∅	»
T ₇	394	15,31'	∅	+ A.
D.M.M. { 0,0000015	416	17,00'	∅	+ A.
{ 0,0000020	426	17,01'	∅	+ A.

Este e o protocolo anterior (n.º 2) permitem separar 3 grupos de soro conforme o seu comportamento: a) os que neutralizaram integralmente as 2 D.M.M. do veneno crotálico (ns. 17, 23 e T₄); b) os que não impediram a morte dos animais de prova dentro de 24 horas (ns. 7, 9, 12, 15, 16, 18, 19, 21, 26, 27, 28, T₁, T₂ e T₇); c) os que não tendo neutralizado integralmente as 2 D.M.M. impediram entretanto a morte dos animais dentro de 24 horas (ns. 8, 10, 13, 30, T₃, T₅ e T₆). Para cada um destes grupos conviria naturalmente repetir a prova variando as quantidades recíprocas do veneno e do soro:

PROTOCOLO 4.º

GRUPO A

Soro 0,5 — Veneno 0,000006 — Vol. 2 cc. — 60' estufa 36°C.

Soro	Pombo	Hora	Dia 18 - 9 - 41 às 17,15'	Dia 19 - 9 - 41 às 8,15'
17	429	14,27'	∅	+ A.
23	447	14,29'	+ às 17 hrs.	—
T ₄	430	14,31'	+ às 17 hrs.	—

Vê-se com esta experiência que a prova anterior, equivalendo a 0,5 cm.³ de soro para 2 D.M.M., estava no limite de ação neutralizante, não havendo diferença evidente entre um dos soros testemunhos e dois de animais que receberam anteriormente o clorofilinato de potássio com as 3 D.M.M. de veneno crotálico.

PROTOCOLO 5.º

GRUPO B

Soro 1,0 — Veneno 0,000003 — Vol. 2 cc. — 60' estufa 36°C.

Soro	Pombo	Hora	Dia 18 - 9 - 41 às 17,15'	Dia 19 - 9 - 41 às 8,15'
7	446	13,51'	∅	Paral. + 13 horas
9	437	13,55'	∅	Paral.
12	443	13,58'	∅	Paral. + 13 horas
15	438	14,00'	Paral.	Paral. + 13 horas
16	455	14,03'	∅	Paral.
18	442	14,06'	∅	"
19	453	14,08'	∅	"
21	449	14,11'	∅	+ A.
26	440	14,13'	Paral.	+ A.
27	444	14,16'	"	+ A.
28	428	14,18'	∅	Paral.
T ₁	425	14,20'	Paral.	+ A.
T ₂	434	14,23'	∅	+ A.
T ₇	445	14,25'	∅	+ A.

Aquí também se demonstra não haver diferença significativa entre três soros testemunhos e 11 soros de animais que haviam recebido a injeção de 3 D.M.M. de veneno crotálico neutralizado pela clorofila.

PROTOCOLO 6.º

GRUPO C

Soro 1,0 — Veneno 0,000006 — Vol. 2,2 cc. — 60' estufa 36°C.

Soro	Pombo	Hora	Dia 18 - 9 - 41 às 17,15'	Dia 19 - 9 - 41 às 8,15'
8	427	14,33'	Paral.	+ A.
10	441	14,37'	>	+ A.
13	432	14,39'	∅	+ A.
30	405	14,43'	Paral.	+ A.
T ₃	451	14,41'	+ às 17 hrs.	—
T ₅	454	14,46'	Paral.	+ A.
T ₆	452	14,48'	∅	+ A.
D. M. M. {	0,0000015	406	∅	+ A.
	0,0000020	426	Paral.	+ A.

Igualmente neste caso não é permitida nenhuma diferenciação entre os animais tratados e os testemunhos.

E' bem de ver entretanto, que tal tipo de experimentação, acusando resultados negativos, não permite concluir pela inexistência de reação imunitária nos animais injetados pela clorofila + veneno pois que a quantidade de anticorpos que porventura se houvessem formado, por uma única inoculação de 3 D.M.M., poderia bastar para proteger o animal contra nova dose tóxica porem não ser suficiente para uma evidenciação do tipo que escolhemos. Para esclarecer esse ponto aproveitamos algumas das cobaias da experimentação da pg. 5 reinjetando-as com 3 D.M.M. do veneno crotálico. A existência de um processo de imunidade se revelou evidente como se pode julgar da relação seguinte em que todos os animais foram injetados com a clorofila + veneno em 26/8/941, sangrados para a tentativa de dosagem do poder neutralizante do soro em 10/9/941 e reinjetados com o veneno em 26/9/941:

Animal n.º 7 — Sobrevida

” ” 13 — ”

” ” 16 — ”

” ” 17 — ”

” ” 24 — ”

” ” 28 — em 27/9/941 discreta paresia — sobrevida

Animal n.º 30 — em 27/9/941 morte sem sintomas de envenenamento crotálico.

Animal n.º T — Morte em 17 horas

” ” T — Morte em 14 horas

” ” T — Morte em 14 horas

Não pode assim restar nenhuma dúvida de que as propriedades antigenéticas do veneno crotálico não foram destruídas pelo clorofilinato de potássio, embora esta substância houvesse neutralizado o efeito tóxico do veneno; ainda aqui, portanto, manifesta-se uma diferença entre o tipo de ação da clorofila e o das substâncias de ação fotodinâmica, como o azul de metileno.

Para indagar se o efeito neutralizante da clorofila seria de tipo específico para o veneno crotálico ou também evidenciável em outras toxinas procedemos a experimentação com a toxina tetânica:

EXPERIMENTAÇÃO COM TOXINA TETÂNICA

Animais	peso gramas	Clorofilinato de K solução a 0,2% (envelhecida)		Toxina tetânica		Observações
		sem irradiar	irradiada	sem irradiar	irradiada	
1	195	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	—	Sobrevida
2	185	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	—	Morte no 8.º dia
3	330	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	—	Sobrevida
4	210	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	—	Sobrevida
5	225	—	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	Morte no 6.º dia
6	175	—	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	Morte no 3.º dia
7	215	—	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	Morte no 6.º dia
8	215	—	2 cm. ³	—	3 D.M.M.	Sobrevida
9	165	1 cm. ³ *	1 cm. ³ *	3 D.M.M.	—	Morte no 3.º dia
10	205	1 cm. ³ *	1 cm. ³ *	3 D.M.M.	—	Morte no 3.º dia
11	225	1 cm. ³ *	1 cm. ³ *	3 D.M.M.	—	Morte no 4.º dia
12	240	1 cm. ³ *	1 cm. ³ *	3 D.M.M.	—	Morte no 3.º dia
13	195	1 cm. ³ *	1 cm. ³ *	3 D.M.M.	—	Morte no 3.º dia
14	225	1 cm. ³ *	1 cm. ³ *	3 D.M.M.	—	Morte no 4.º dia
15	210	—	—	3 D.M.M.	—	Morte no 3.º dia
16	215	—	—	3 D.M.M.	—	Morte no 4.º dia

(*) As inoculações assinaladas foram feitas 24 horas depois da injeção da toxina tetânica.

Os resultados dos quatro primeiros animais confirmam o mesmo fenômeno registrado a propósito do veneno crotálico, isto é, ainda aqui, com a toxina tetânica, existe um manifesto efeito protetor por parte do clorofilinato de potássio; para os animais 5, 6, 7 e 8, em que a

clorofila envelhecida foi ainda irradiada, o efeito protetor foi bem menos evidente o que sugere, a exemplo de outras substâncias (ergosterol ao se transformar em calciferol ou derivados deste) que a ação excitadora, sobre uma solução já espontaneamente ativada, conduz à formação de substâncias inativas. Parece assim que, a partir da clorofila inativa e mediante um processo de excitação, forma-se, gradativamente, o corpo dotado de atividade; continuando, porém, o estímulo, esse corpo irá também se transformando em outro, sem capacidade neutralizante da toxina. Provavelmente a mesma coisa não havia ocorrido na experiência com o veneno crotálico porque a solução que então empregamos, embora espontaneamente ativada era menos envelhecida que a usada nas provas de toxina tetânica; note-se também que os animais ns. 9 a 14 não resistiram quando houve um intervalo razoavelmente grande de tempo (24 horas) entre a injeção da toxina e da clorofila.

RESUMO

Os A. A. demonstram que soluções aquosas de clorofilinato de potássio sofrem um processo de ativação, quer espontânea, pelo envelhecimento, quer por ação de radiações luminosas, adquirindo a capacidade de neutralizar, "in vivo" a toxina tetânica ou o veneno de cobra (*Crotalus terrificus terrificus*, *Laurentius*). Concluem também que esse processo de ativação, cujo mecanismo não puderam esclarecer, deve ser de tipo comparável ao da formação do calciferol, isto é, que depois de ativada, a clorofila pode perder esta propriedade pelo emprego de maiores doses do estímulo.

A toxina neutralizada pelo clorofilinato de potássio não perde suas propriedades antígenéticas garantindo um processo de imunização do animal que a recebe.

Abstract

The authors demonstrate that aqueous solution of potassium chlorophyllinate undergo a processes of activation either spontaneous, through aging, or through luminous neutralising tetanic toxine or snake poison Crotalus terrificus terrificus, Laurentius "in vivo". They also conclude that activation processes whose mechanism they were not able to explain, must be of a type comparable to that of the formation of calciferol, i. e., that after being activated the chlorophile may lose this property by the employment of larger doses of the stimulus.

The toxine neutralised by potassium chlorophyllate does not lose its antigenetic properties insuring a processes of immunization in the animal which receives it.