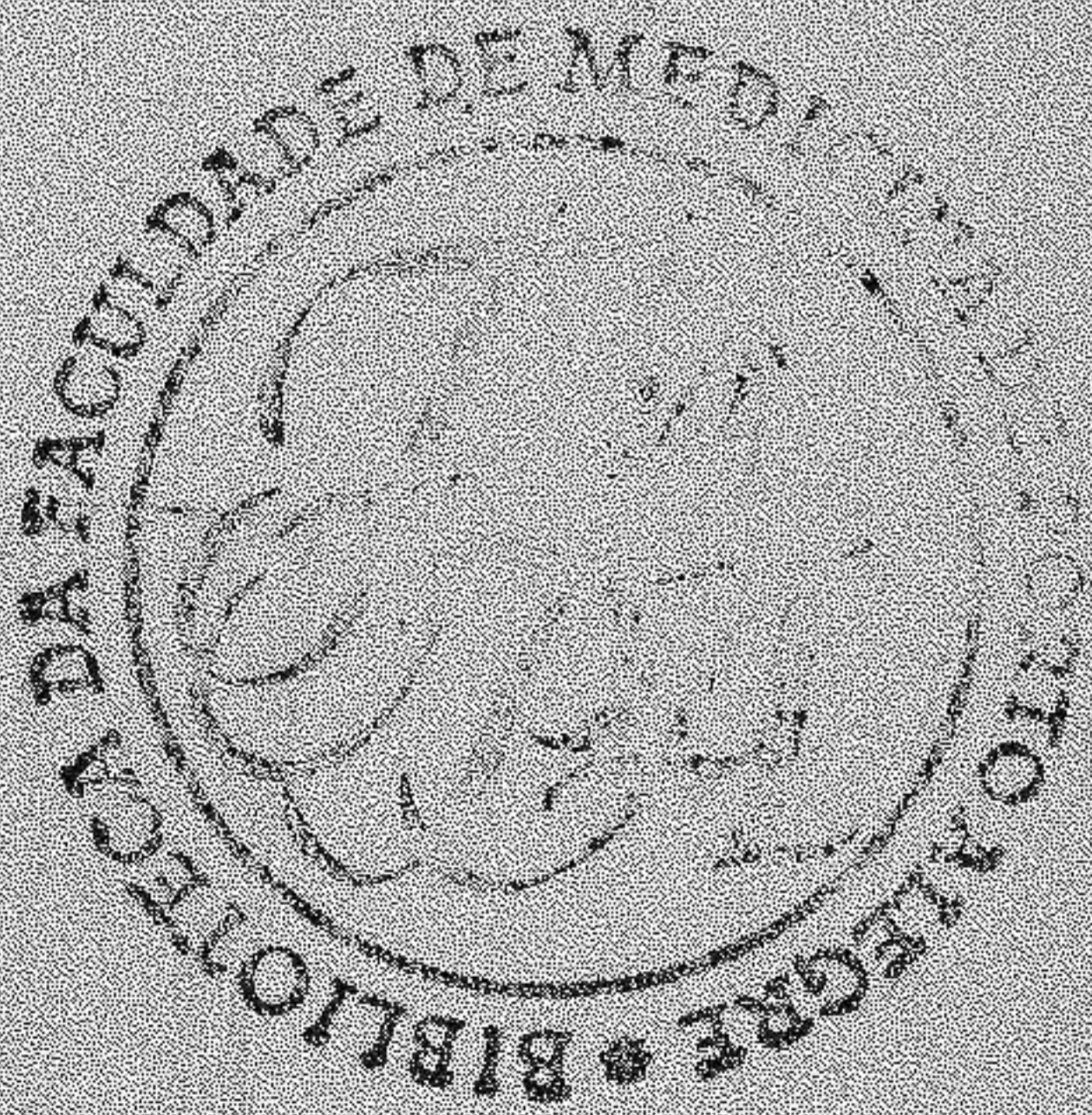


Dr. RAMIRO FRÓTA BARCELOS

Assistente de Química Fisiológica na Faculdade de Medicina da Universidade de Porto Alegre, Ex-Auxiliar de Bacteriologia e Estagiário de Química dos Laboratórios do Departamento Estadual de Saúde

Contribuição
ao estudo de técnica simplificada para a determinação da Vitamina C no sangue

**TÉSE DE CONCURSO
À LIVRE DOCENCIA**



MED
T
QU210
B242c
1943

4 3

Dr. RAMIRO FRÓTA BARCELOS

Assistente de Quimica Fisiologica na Faculdade de Medicina da Universidade de Porto Alegre, Ex-Auxiliar de Bacteriologia e Estagiario de Quimica dos Laboratorios do Departamento Estadual de Saúde

**Contribuição
ao estudo de técnica simpli-
ficada para a determinação
da Vitamina C no sangue**

**TÉSE DE CONCURSO
Á LIVRE DOCENCIA**



1 9 4 3

Do mesmo autor:

Linfogranulomatose inguinal sub-aguda

(tése de doutoramento) — 1933

Eczema e ofidismo cronico

(Trabalho publicado na revista "Publicações Médicas — São Paulo — 1934)

Carteira Sanitaria Infantil

(Trabalho publicado na revista "Viver" — São Paulo — 1940)

Nutrição e Alimentação

(Conferencia pronunciada no dia de formatura da 1.^a turma de socorristas da cidade de Montenegro)

Em preparação:

Aulas praticas da Cadeira de Quimica Fisiológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Porto Alegre



Bib. Fac. Med. UFRGS

T-0133

Contribuição ao estudo de tecn

SUMARIO

Dedicatorias

Justificativa

Capitulo I) Duas palavras sobre as vitaminas

Capitulo II) Como foi a historia da vit. C

Capitulo III) A quimica da vit. C

Capitulo IV) Quotas fisiologicas e indicações da vit. C

Capitulo V) Processos de dosagem da vit. C

Capitulo VI) Técnica simplificada para a determinação
da vit. C no sangue

Observações

Conclusões

Bibliografia consultada

JUSTIFICAÇÃO

Para a inscrição ao concurso da livre docencia á Faculdade de Medicina da Universidade de Porto Alegre, é regulamentar a entrega de uma tése. Prova preliminar de capacidade, nem sempre é a expressão exata do gráu de cultura e pendor didatico de quem a escreve.

Numerosos fatôres pôdem influir para a valorização ou depreciação de um trabalho, alheios ás qualidades do autor. Valorização, quando temos a sôrte de encontrar meio proprio, literatura farta, auxilio dos mestres, ou quando, na singularidade da vida, deparamos com a fenomenologia de uma nova doença. Depreciação quando não se pôde fugir ao atraente perigo das compilações, enfeixando em volume, idéias e opiniões alheias, apenas mudando vocábulos e invertendo periodos, de modo a parecer coisa original. Quando desejamos ter idéia propria, observação pessôal e ser inédito na materia como no estilo, surgem mil dificuldades.

Nesta fase excecional, de total convulsão dos póvos, em que a guerra estende suas sombras sinistras sôbre o panorama de todas as atividades humanas, tudo é escasso, racionado. Parece que a propria intelligência fica embotada. Falta aparelhagem de laboratorio, faltam reativos. O material humano, sómente, continúa abundante e gratuito, mas, ainda aqui é preciso lutar contra o tabú das sangrias, com o ceremonial de uma simples punção na colheita do sangue...

Assim, aquele que deseja ser honesto para consigo mesmo e leal para com os outros, tropeça e cai a cada instante, e quando chega ao termo da jornada, traz uma bagagem incompleta, malas quasi vacias, apenas, mãos e pés sangrando do esforço de querer chegar...

Esta tése é uma contribuição ao estudo de técnica simplificada para a determinação da vitamina C no sangue. Por muito que se tenha escrito sobre vitaminas, o assunto continúa no cartaz, e acreditamos que ainda muita coisa nova apareça por dizer. Mística das vitaminas para uns, vitaminomania para

outros, o certo é que este capítulo abriu um imenso campo de observação na medicina experimental. Quer no terreno da terapêutica, quer na patologia carencial, o subsidio das vitaminas tem sido valioso e, se isto não bastasse, a colaboração para solucionar o problema alimentar seria bastante para firmar a era do seu advento.

Leva-se em consideração as razões expostas para apresentar a êste modestíssimo trabalho, sem a preocupação das prolixidades inúteis, colimando tão sómente, o objetivo de divulgação de nova técnica para a cevitaminoemimetria, simplificada, fácil, e tão exata como as já conhecidas.

As observações foram tiradas de doentes particulares e de doentes hospitalizados nos serviços de enfermaria dos professores Martin Gomes, Tomaz Mariante e Dr. D. Campos, da Santa Casa de Misericórdia. As determinações em individuos sãos, foram feitas a esmo, aproveitando a bôa vontade dos que forneciam sangue. As dosagens, praticadas no Laboratorio de Quimica Fisiológica da Faculdade de Medicina. Deu orientação geral ao trabalho, o prof. Mario Bernd.

CAPITULO I

Duas palavras sobre as vitaminas

O homem viveu permanentemente preocupado com o problema prosaico da sua alimentação. Quanto mais avançava na escala da civilização, mais se afastava do segredo biológico do entretenimento da vida. A primitiva alimentação, constituída de substancias arrancadas da natureza e aproveitadas em estado fresco, foi modificado pela manipulação culinária e perdendo principios nutritivos até então despercebidos, mas que, empiricamente, faziam parte do repasto das raças mais inferiores e atrasadas. Estes principios nutritivos foram desaparecendo pela esterilização industrial nos processos de conservação e armazenamento dos generos.

O refinamento do paladar, por sua vez, foi substituindo certos valôres nutritivos por estranhas fórmulas de cardápio. O homem já não copiava a natureza, afastando-se cada vez mais dos desconhecidos elementos capazes de provocarem as síntese orgânicas dos vegetais. Tornava dessa fórmula o organismo prejudicado ao intimo mecanismo do processo de combustão total e perfeita.

O progresso da civilização determinava para a nutrição humana substancias capazes tão sómente de desenvolverem calor energetico. Estabelecia as proporções exatas dos alimentos combustiveis, pela quota de energia fornecida.

Entretanto, dentro desse mesmo ritmo de progresso, o homem foi compreendendo que o organismo humano não é uma simples fornalha. E', antes, um complicado laboratorio onde as transformações das substancias alimentares ingeridas para o desprendimento de energia, processam-se como fases de verdadeiras reações quimicas.

Afóra o metabolismo funcional dos glicídios e lipidios e do metabolismo estrutural dos protídios, ainda existe o meta-

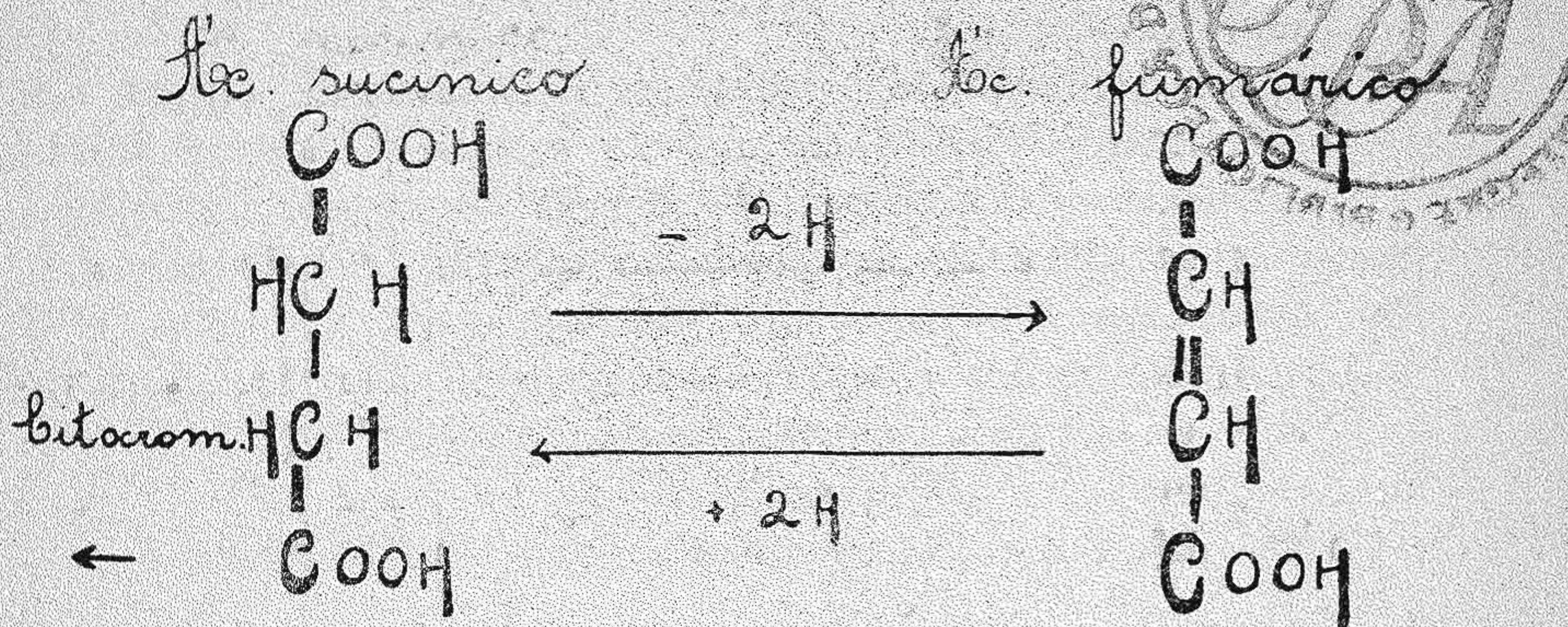
bolismo de regulação pela presença de substancias outras, em minimas quantidades, é certo, mas servindo como catalisadores e aceleradores dessas reações de queima e destruição organicas, substancias em parte, creadas no proprio organismo, endogenas, em parte, provindas de fóra, exogenas. São os fermentos, os hormônios e as vitaminas.

As oxidoreduções

Otto Warburg identificou, como elemento ativador do processo de oxidação organica, uma proteina metalica, a qual chamou "fermento respiratorio". Pouco depois, Wieland suspeitava a existencia de uma oxidação biológica indireta por deshidrogenação, devida tambem a um fermento-deshidrogenase que ativaria e retiraria o H dos alimentos, substituindo-o por uma molecula de agua. O alimento agiria então como H-dôador e o fermento como H-receptor. A molécula orgânica ficaria totalmente oxidada sem nenhuma libertação de energia, nem na retirada do H, nem na fixação de H₂O.

Vêm logo depois os "citocrômos" de Keilin, como elucidação do íntimo mecanismo do processo das oxidações. O citocrômo C, conteria um atomo de ferro e representaria o elemento ativo da molécula; o citodrômo A seria oxidado pelo fermento respiratorio de Warburg e oxidaria o segundo C que por sua vez oxidaria o terceiro B; este ultimo funcionaria como receptor de H para a oxidação das substancias alimentares enquanto que o citocrômo C funcionaria como receptor do oxigênio respiratorio. Dessa maneira entre o oxigênio e o hidrogênio alimentar, interpõem-se a cadeia de citocrômos e o fermento de Warburg. Seria a citocrômo-oxidase.

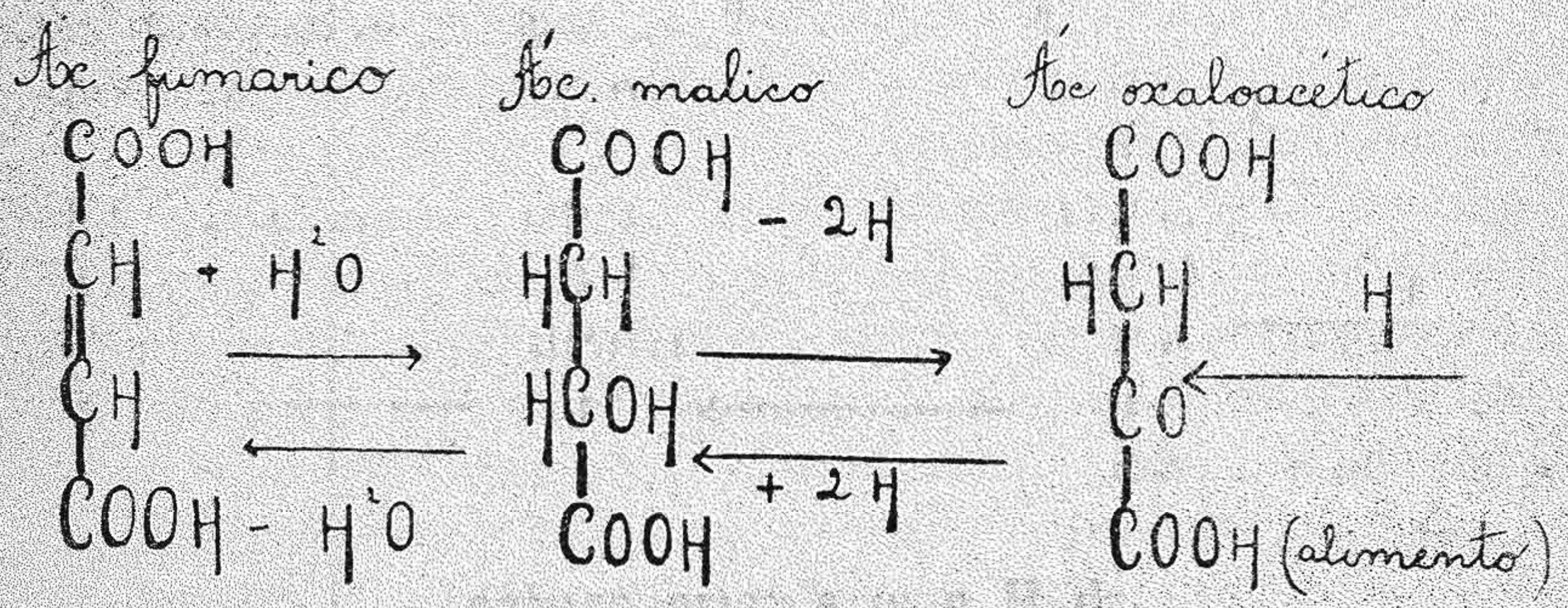
Mais tarde, Szent-Györgyi, estudando os fermentos dos musculos, demonstra que a deshidrogenação das substancias alimentares, se dá através de hidrogenações e deshidrogenações do ácido succinico-fumárico, de acôrdo com a equação seguinte:



Succinico - deshidrogenase

De fáto, a succinico deshidrogenase inativada com o ácido malonico (COO-CH₂-COOH) que tomara o lugar do ácido succinico, provocaria a parada completa da respiração muscular.

O ácido fumárico por hidratação e desidratação, originaria de um lado e derivaria de outro, do ácido málico que funcionaria como receptor e doador de H, dando origem ao ácido oxaloacético:



Do ác. oxaloacético origina-se o H das substancias alimentares, desempenhando dessa fôrma, importante papel na respiração dos tecidos.

Por ultimo, aparece a teoria das "codeshidrogenases", segundo a qual a codeshidrogenase do ácido lático seria uma substancia termoestavel dos nucleoproteidios, cujo grupo ativo é representado por um derivado piridinico — a nicotamida,

ou amida do ácido nicotínico. Todas as hidrogenases que tomam parte no processo respiratório, com exceção da succínico dehidrogenase, só atuariam em presença de uma codehidrogenase, que seria fixada pela deshidrogenase, funcionando como receptor de H na passagem de uma substância para outra.

A função exercida no músculo pelo ác. succínico é desempenhada em algumas plantas pelo catecol $C_6H_4(OH)_2$, e em outras pelo ác. cêvitâmico. Estas duas últimas substâncias, embora diferentes, têm em comum um grupo dienólico ($C-OH-C-OH-$). De fato, parece pertencer ao grupo dienólico a responsabilidade do processo oxidativo de que o Fe é o elemento ativo. Uma terceira substância do grupo dienólico é o ác. di-oximaleínico, quasi semelhante ao ác. succínico (do qual é um óxido) o que tornaria provável a existência no tecido animal do mesmo fenómeno, através deste último elemento da cadeia atrás referida.

Ao observar o processo respiratório tecidual, encontram-se duas substâncias de ação vitamínica: o ác. cêvitâmico (ác. ascórbico) e a nicotamida (ác. nicotínico). A vit. B1 participaria também no processo de oxidação, elevando para três o número de substâncias de ação vitamínica. Não sobre dúvida, portanto, da participação ativa que exercem as vitaminas, como agentes químicos no intrincado mecanismo das oxido-reduções metabólicas.

A função biocatalítica é o caráter mais saliente das vitaminas. São indispensáveis no trabalho de construção orgânica, contudo, não servem como material plástico. Para Von Euler as vitaminas e os hormônios são enzimas aos quais deu o nome de ergônios.

Definição e classificação

Vitaminas, na definição clássica, são constituintes alimentares de origem orgânica, que, em minúsculas quantidades, têm efeitos biológicos específicos, e cuja falta ou diminuição nos alimentos, produz distúrbios patológicos, por vezes apenas sob condições especiais.

Seus caracteres gerais são:

- 1) Natureza organica
- 2) Necessidade para o crescimento normal e vida dos animais.
- 3) Impossibilidade habitual de biosintese humana por via metabolica
- 4) Eficacia em pequenas dóses.
- 5) Incapacidade de produzir energia.
- 6) Atividade biocatalitica, sem ação bioplastica.
- 7) Aparecimento de perturbações patologicas em sua ausencia ou diminuição.

Resumindo: as vitaminas são agentes acessórios da alimentação e a falta ou diminuição delas ou de uma delas, acarretaria graves disturbios metabolicos, com um cortejo de afecções as mais variadas. O conceito biológico das vitaminas liga-se á propria historia das suas descobertas.

Quanto á classificação das vitaminas, de inicio, diferenciavam-se sómente as lipossolúveis das hidrossolúveis, denominando-as por Grupo A e Grupo B. A' medida, entretanto, que fôram aparecendo outras vitaminas e que as primeiras se fôram desdobrando em subgrupos, continuou-se batisando-as com as letras do alfabeto. Quando tratando-se de uma vitamina de subgrupo, representava-se com um numero ao pé da letra correspondente á vit. desdobrada. As vitaminas de um mesmo grupo de solubilidade, chamaram-se de sinergicas, e as de grupo de solubilidade diferente, de antagonicas. Este antagonismo tende hoje a desaparecer.

O organismo humano necessitando da incorporação continua das vitaminas, tem apezar disto, limites entre os quais oscilam as suas necessidades minimas e otimas, que variam, aliás, com as proporções de glicídios, lipidos e protídios da alimentação. O minimo vitaminico varia de uma região para outra, em função das condições climaticas, da irradiação solar, habitos, etc. Por este motivo, na classificação de Grab, include-se as quotas das necessidades diarias para o homem.

Quadro sinótico segundo o Dr. Grab

Vitamina A. Solubilidade: lipossolúvel. Avitaminose: queratomalacia. Necessidades diárias: mínima — 1.0 mg; ótima — mais de 1.0 mg.

Vitamina B1. Solubilidade: hidrossolúvel. Avitaminose: beriberi. Necessidades diárias: mínima — 1.0 mg.; ótima — mais de 1.0 mg.

Vitamina B2.

1) *Lactoflavina.* Solubilidade: hidrossolúvel. Avitaminose: desconhecida. Necessidades diárias: mínima — 1.0 mg.; ótima — 2-3 mgs.

2) *Vitamina B6 — Vitamina antipelagrosa — Vitamina G.* Solubilidade: hidrossolúvel. Avitaminose: pelagra. Necessidades diárias: desconhecidas.

Vitamina B3 — Vitamina B5. Importante só para os pom-bos. Sua falta provoca transtornos do crescimento.

Vitamina B4. Há dúvida quanto a existência.

Vitamina C. Solubilidade: hidrossolúvel. Avitaminose: escorbuto. Necessidades diárias: mínima — 10 a 25 mgs.; ótima 50 mgs. (*)

Vitamina D.

a) *Vitamina D1.* Forma mixta de diferentes produtos cristalizados.

b) *Vitamina D2.* Vitamina cristalizada a partir da ergosterina irradiada. Solubilidade: lipossolúvel. Avitaminose: raquitismo. Necessidades diárias: mínima — 0,002 mgs.; ótima — 0,01 mg

c) *Vitamina D3.* Vitamina cristalizada obtida a partir da colesteroína irradiada. Solubilidade: Avitaminose: raquitismo dos frangos. Necessidades diárias: desconhecidas em detalhe.

Vitamina E. Solubilidade: lipossolúvel. Avitaminose: transtornos da reprodução e atrofia muscular progressiva. Necessidades diárias: desconhecidas.

(*) NOTA: em relação à dieta média da população brasileira, o mínimo vitamínico deveria ser de 550 U.I., segundo o Prof. Lorenzini.

Vitamina F — Vitamina B1.

Vitamina H. Solubilidade: hidrosolúvel. Avitaminose: dermatopatias. Necessidades diárias: desconhecidas.

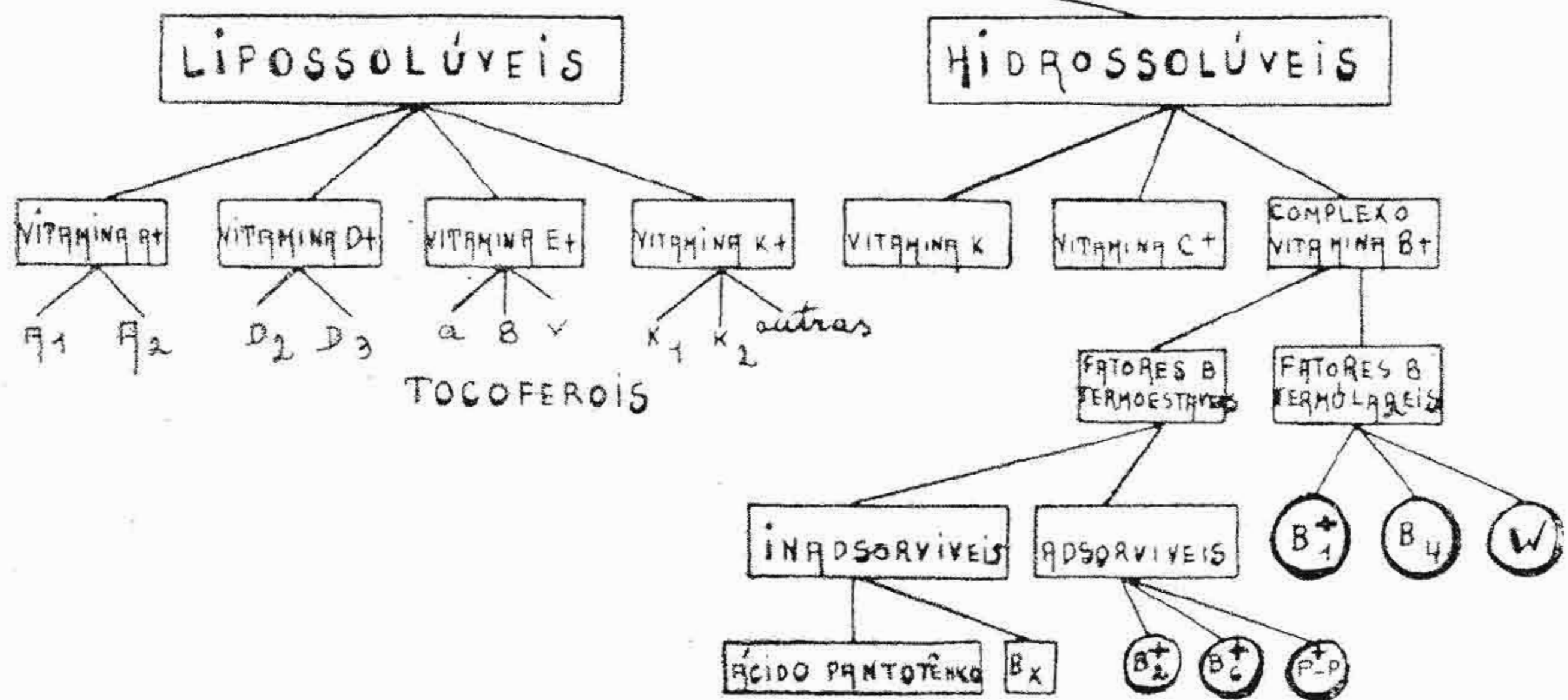
Vitamina I. Vitamina C2... Solubilidade: hidrosolúvel. Avitaminose: pneumonia das cobaias. Necessidades diárias: desconhecidas.

Vitamina K. Solubilidade: lipossolúvel. Avitaminose: síndromes hemorrágicas. Necessidades diárias: desconhecidas.

As vitaminas passaram do terreno puramente alimentar para o mais difícil terreno da terapêutica moderna e já estão definidas as aplicações clínicas de algumas delas como sejam a A, B1, B2, C, D, E, K etc. O quadro seguinte esquematiza fatores vitamínicos identificados e as aplicações clínicas dos assinalados com o sinal positivo.



AS VITAMINAS



**COMO FOI A HISTÓRIA
DA VITAMINA C**

CAPITULO II

Como foi a historia da vitamina C

A descoberta da vit. C prende-se á historia aventureira e romanesca de marinheiros audazes e á descrição das longas, interminaveis travessias maritimas em frageis embarcações á vela.

Aparecia entre os arrojados navegadores uma estranha moléstia. E como fazia muitas vitimas, julgavam-na epidemica. Comercio maritimo entre póvos de varios continentes e expedições descobridoras de novos mundos eram perseguidos por esta moléstia singular.

Pareceria doença propria dos mares, si não fôra tambem assinalada em terra. O mais exato é que seu aparecimento ligava-se sempre á idéia de fome. Unicamente durante as travessias oceanicas, durando mezes a fio, quando escasseavam os alimentos naturais, frutas e legumes verdes, surgia o mal que transformava a boca numa chaga viva e repugnante. Dir-se-hia um castigo á tanta coragem e á tanta audacia.

Em terra essa moléstia declarava-se durante periodos de grandes cataclismas politicos. Assim nas guerras e durante os anos de fome de alguns paizes empobrecidos, alastrava-se de fórma epidemica.

Era o escorbuto, da palavra latina "scorbutus", significando ferida da boca. O doente apresentava-se palido, pele seca, gengivas sangrando, halito fétido e a mastigação extremamente penosa. Nem febre, nem outro sintoma de infecção. Grande numero terminava morrendo por enfraquecimento geral, dispnéa, adinamia e sincope.

Camões descreve a sintomatologia do escorbuto em duas primorosas estrofes de "Os Luziadas":

E foi que de doença crúa e feia,
A mais que eu nunca vi, desampararam
Muitos a vida e em terra estranha e alheia
Os ossos para sempre sepultaram.
Quem haverá que sem o ver o creia ?
Que tão disformemente ali lhe incharam.
As gengivas na boca que crecia
A carne, e juntamente apodrecia.

Apodrecia e'um fétido e bruto
Cheiro, que o ar visinho inficionava
Não tínhamos ali médico astuto,
Cirurgião sutil menos se achava;
Mas qualquer neste officio pouco instructo
Pela carne já podre assim cortava,
Como si fôra morta: e bem convinha,
Pois que morto ficava quem a tinha

Assim, como si tivesse conhecimentos de medicina, Camões descreve nas estrofes LXXXI e LXXXII, a doença terrívelissima que dizimou parte da armada de Vasco da Gama quando navegava nas costas do continente africano, no ano de 1490.

E até lendas com o sabôr das coisas impressionantes, criaram-se em torno do escorbuto. Marinheiros de imaginação novelesca, contavam aos outros, durante as vigílias em alto mar, historias tristes e cheias de horror de pessoas subitamente atacadas pela doença; de suicídios e outros atos de desespero; de abandono dos proprios filhos e companheiros em paragens desconhecidas e desertas para morrerem longe dos olhos e longe do coração. Foi, dessa maneira, creando-se uma consciencia de repulsão e nojo pela "lepra dos mares".

Lendas ou historias verdadeiras, algumas delas trouxeram inestimavel subsidio á observação dos cientistas da época, que procuravam conhecer e identificar a terrível molestia. Uma delas vamos transcreve-la de um livro que acabamos de ler: "Ha varios seculos, num barco de pesca, alguns tri-

pulantes contrairam o escorbuto. Os companheiros abandonaram-nos nas costas da Groenlandia, não querendo que viessem a falecer a bordo. Os infelizes tentaram sustentar-se com liquenes, cogumelos, raízes, ervas e outros alimentos parecidos. Pois bem, ao cabo de varios mezes os companheiros voltaram ás mesmas costas. E ficaram estarrecidos ao ver os camaradas abandonados não apenas vivos, mas em otima saúde, agitando para eles os seus ultimos pedaços de pano, com um vigor que desmentia logo toda e qualquer hipotese de doença. Na viagem de volta foram eles que manejaram alegremente as velas mais pesadas. E a tripulação do barco teve que admitir, assim, o que não conseguia compreender: a ressurreição milagrosa dos companheiros que não sem alguma crueldade, haviam abandonado ao seu destino.”

Outra narrativa que trouxe notavel subsidio aos estudos dáquela época e que veio marcar o inicio da terapeutica anti-escorbutica, foi a do francês Jacques Cartier que em 1536 navegou o rio São Lourenço, no Canadá. Por motivo da viagem muito demorada e da consequente alimentação defeituosa, todos os seus marinheiros adoeceram de escorbuto. Por feliz acaso Cartier notou que os indios dáquela região usavam o chá de agulhas de pinheiro, arvore comum e abundante e como mostrassem a apparencia de bôa saúde, resolveu dar aos seus homens identica beberagem. O resultado foi extraordinário. Todos ficaram curados.

Visconde de Taunay, no seu livro “A Retirada da Laguna” descreve a epidemia de cólera que quasi dizimou a coluna retirante e resalta o efeito salutar das laranjas que, encontradas na margem oposta do rio Miranda, mataram a fême da soldadesca e melhoraram os casos de cólera, quasi dominando a epidemia. Não seria antes manifestações escorbuticas, ou de simples carencia, a epidemia diagnosticada de cólera? Não nos parece plausivel a cura do cólera pela laranja...

E através de outras tantas historias, lendas e testemunhos pessoais, chegou-se á maravilhosa descoberta da vit. C, batismo alfabetico do ácido ascórbico, cuja falta nos alimentos determina uma das peores avitaminoses — o escorbuto.

Já em 1747, em seu livro — "Treatise on the Scurvy" — Lind aconselhava o uso do suco de limão, aos marinheiros da frota naval inglesa, como medida preventiva contra o escorbuto. Muito mais tarde, em 1914, Funk demonstra a existência do fator antiescorbutigenico nos frutos e vegetais verdes e frescos. Este cientista, com a colaboração de Drumond foi quem deu a denominação de vitamina C desse fator desconhecido, provavelmente de natureza química e tão indispensável á saúde.

Com estes conhecimentos, outros cientistas tentaram provocar o escorbuto experimental. Alcançaram êxito absoluto. As experiências foram praticadas no homem, no macaco e na cobaia. Privados dos alimentos que contêm vit. C, apresentaram os sintomas típicos da avitaminose clássica. Para curá-los, bastou que a dieta fosse suspensa e substituída por uma alimentação rica dessa vitamina.

Foi, somente em 1927, quasi em nossos dias, que apareceram os memoráveis trabalhos de Szent — Györgyi sobre o isolamento da vit. C. Este, hoje celebre professor húngaro, conseguiu extrair a vit. C da suprarrenal do boi e do suco de laranjas. Mais tarde passou a extrai-la da páprica (pimentão), cujo conteúdo em esta substância era superior á qualquer outro vegetal.

Szent Györgyi só identificou o ácido hexurônico com a vit. C, em 1932, isto é, cinco anos mais tarde de o ter isolado. A este ácido, isomero do ácido glicurônico, deu o nome de ácido ascórbico por ser o agente específico da prevenção e cura do escorbuto.

Em 1934, Reichstein consegue obter a vit C por via sintética. Entretanto, processo difícil e dispendioso, não facilitou em nada o problema terapêutico dessa vitamina. Há no comércio numerosos produtos farmacêuticos de vit. C. Os que contêm, de fato, ác. ascórbico, são de custo quasi proibitivo; os de custo ao alcance do doente pobre, não contem ác. ascórbico. O clínico que dispuser de um pouco de solução de 2-6-diclorofenol poderá verificar a honestidade do produto, sabendo apenas que aquele que contiver ác. ascórbico irá descolorar o indicador. As frutas e os legumes verdes continuarão a ser

o meio mais consentâneo da prevenção e cura do escorbuto. Em 1935 foi introduzido no cardápio de uma escola militar norueguesa, onde costumavam aparecer casos de tuberculose, vit. C sob a forma de frutas, legumes verdes, etc. O resultado foi surpreendente, baixando de 6,1 % para 0 a percentagem.

Em nossos dias, os conhecimentos sobre a vit. C estão se fazendo cada vez maiores. Já foi verificado que o leite materno contém quatro vezes mais esse elemento de nutrição que o leite de vaca. Dahi administrarem-se ao lactante artificial, substancias C vitaminadas, como medida de prevenção.

Julgamos que a determinação da vit. C no sangue deva ser um complemento á historia do seu aparecimento no cenário da terapeutica. Determinar o indice cevitamico de doentes e sãos é um dos objetivos deste trabalho. Não faremos estatística, porque o que nos interessa, em relação á docencia para a qual nos candidatamos, é a demonstração de técnica quimica capaz de resolver as dificuldades do problema.