

N. Gago da Gamara



INTERESSE PRACTICO

DAS ALBUMINO-PRECIPITINAS
NAS FISCALISAÇÃO DAS CARNES



812

1912

ARRUMAÇÃO

Estante

Prateleira

N.º de Ordem

Maço de verbetes N.º

26

3

239

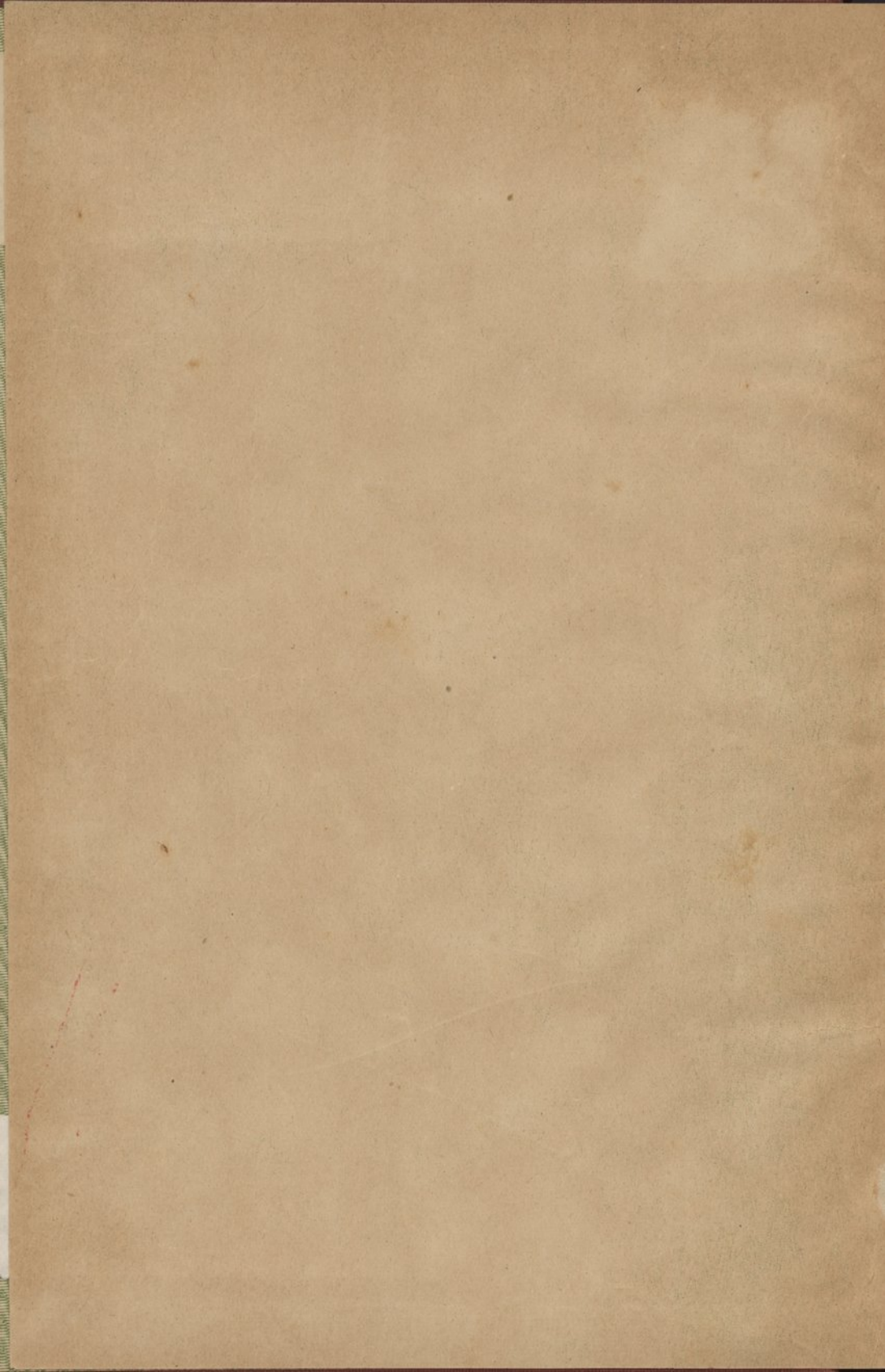
244

~~200~~

N.ºs DE REFERENCIA		LOCALIZAÇÃO	
Entrada	2620/75	E.	R
Invent.º	23803	P.	812
		N.º	

Teses Antigas FMV
1912, v. 15, n.º 192

~~77~~



**Interesse pratico das albumino-
precipitinas na fiscalisação das carnes**

ESCOLA SUPERIOR DE
MEDICINA VETERINÁRIA

7 JUL 1975

BIBLIOTECA
N.º 2620

COMPOSTO E IMPRESSO NA IMPRENSA
DE MANUEL LUCAS TÔRES
RUA DIÁRIO DE NOTÍCIAS, 95, LISBOA

R 812

ESCOLA DE MEDICINA VETERINARIA

2524

Interesse practico das
albumino-precipitinas na
fiscalisação das carnes

ESCOLA SUPERIOR DE
MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO INAUGURAL

7 JUL 1975

POR

BIBLIOTECA
N.º 2620

NUNO GAGO DA CAMARA

OUTUBRO DE 1912 — LISBOA



*A ESCOLA não se responsabilisa pelas doutrinas expostas
nesta dissertação (Art. 76.º do Reg.º de 10 de setembro de 1903)*

ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA

Ata da sessão
do Conselho Superior
de 1950

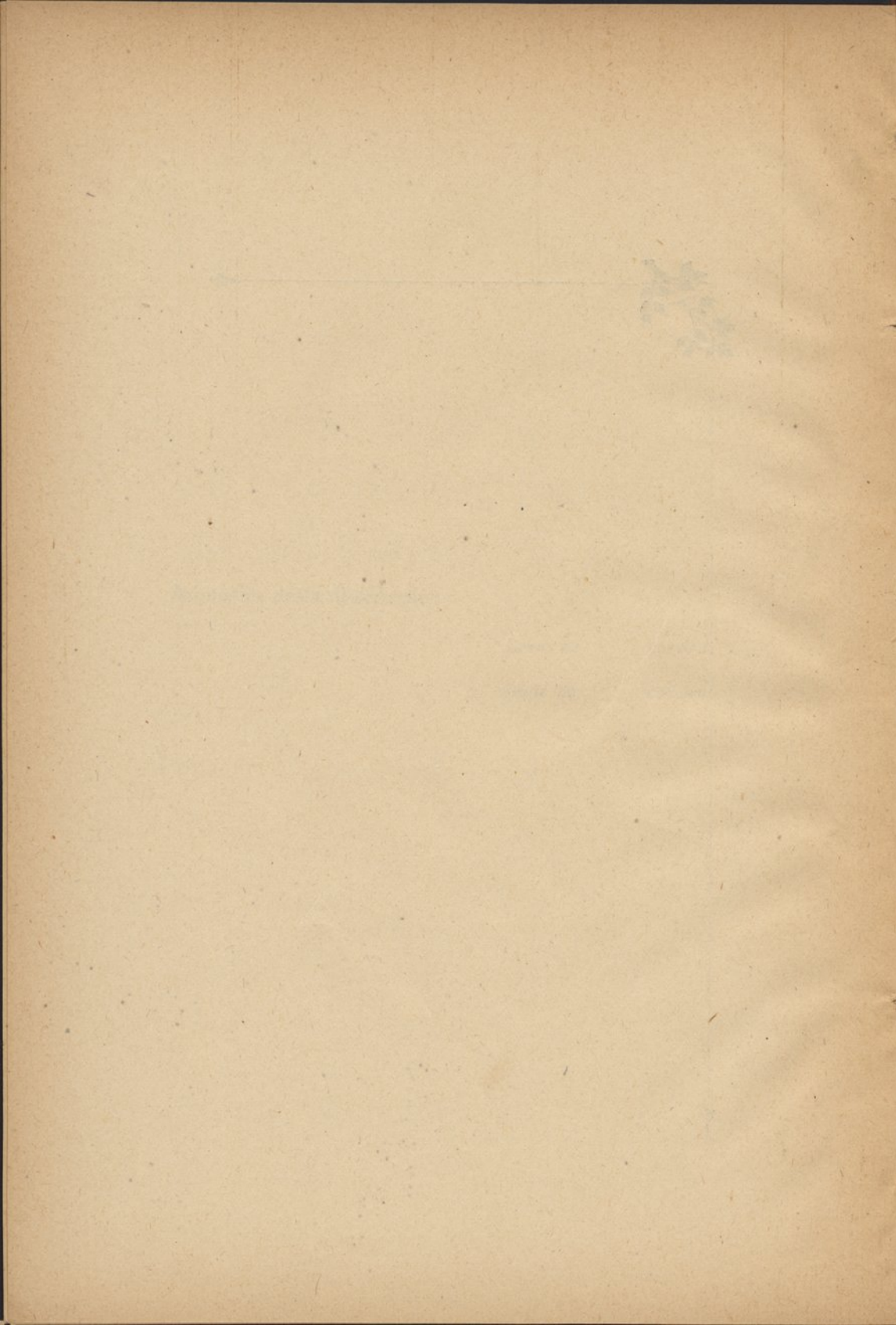
Arguentes desta dissertação:

Lente da cadeira

Lente da cadeira







PRIMEIRA PARTE

PRIMERA PARTE

Noção experimental das albumino-precipitinas

Precipitinas em geral, sua divisão, composição e propriedades.

Albumino-precipitinas. Sua origem. Especificidade dos soros precipitantes. Sua applicação. Seu modo d'obtenção. Sua conservação. Reacção precipitante.

As precipitinas são corpos ainda hoje não bem definidos que apparecem como producto duma reacção defensiva do organismo em face de substancias extranhas; ás substancias extranhas que obrigam a sua apparição chamam-se antigenos, isto é, que originam anti-corpos, expressão que, alem das precipitinas, abrange varios outros productos de reacção biologica, como são as antitoxinas agglutininas etc... de que não me compete aqui occupar.

Estes antigenos, ou mais especificamente ditos precipitogenos, podem ser de origem differente. Assim é que em 1897 mostrou Kraus que juntando soro anti-typhico a uma cultura filtrada de *Bacillus typhicus* se turva primeiro para deixar apóz algum tempo de repouso um precipitado; foi o primeiro passo para o conhecimento dos anti-corpos que elle proprio chamou precipitinas. Dois annos mais tarde, em 1899, Bordet obtinha um soro precipitante injectando a coelhos, sangue de gallinha desfriabinado.

As primeiras tendo como antígeno a cellula bacterica são ditas precipitinas bactericas, as segundas tendo como antígeno as albuminas são chamadas albumino-precipitinas. Nicolle e Poserski chamam ás segundas albumino-coagulinas.

A composição chimica das precipitinas, embora não tenha sido ainda possivel determinál-a, deve comtu-

do approximar-se das pseudo globulinas, isto é, das globulinas soluveis em agua destillada,

São corpos facilmente dissociaveis. Uma temperatura de 60° a 70° destroe-lhe o poder precipitante.

E' sobre o segundo grupo de precipitinas, formado desde a experiencia de Bordet a que me referi, que recahirá o meu estudo pois são ellas que constituem o thema desta dissertação : são ellas o reagente biologico que nos irá desvendar a especie ou especies que forneceram as albuminas das quaes apenas possuímos solutos não importa mesmo que em fraquissimas diluições.

As albumino-precipitinas existem no soro do sangue dos animaes preparados com solutos albuminoides, constituindo assim os chamados soros precipitantes, os quaes se dizem : soro precipitante para as albuminas do soro de cavallo, soro precipitante para a albumina do leite de vaca etc... pois estes soros tem propriedades especificas como adeante mostrei.

Porém antes da apparição das albumino-precipitinas no sangue, que é d'onde praticamente as tiramos, nota-se já a sua existencia em órgãos que são sem duvida seus formadores, em primeiro logar o baço, em seguida os ganglios mesentericos e ainda a medulla ossea.

Suggestando a duvida se as albumino-precipitinas obtidas por injeções de soros heterologos seriam originadas pela presença duma ou das duas albuminas do sangue a globulina e a serina, Nolf propoz-se a resolver-a.

Para isso serviu-se do soro de cavallo ; separava a globulina por saturação pelo sulfato de magnezia a 30° com filtração, e a serina juntando 1 % d'acido acetico ao filtrado depois de arrefecimento ; depois de uma dialyse de 8 dias em agua chloroformada, as soluções de globulina e de serina eram injectadas a coelhos, recebendo 5 injeções com 8 dias d'intervallo. O soro que assim preparava com globulina precipitava o soro de cavallo, turvando egualmente as soluções de globulina e não turvando as de serina. E o soro que preparava com serina não turvava nem

o soro de cavallo nem as solucções de globulina nem as de serina. Concluia então que era apenas a globulina que era o precipitogeno. Mais tarde Lebanc retomando o mesmo assumpto e seguindo o processo de Nolf com soro de vaca, precipitava as globulinas por semi-saturação pelo sulfato d'ammonio e a serina pela saturação feita com o mesmo sal, mas em vez de injectar todas as globulinas, injectava só as pseudo-globulinas, sendo precipitada a englobulina por uma dialyse prolongada. Os coelhos recebiam pouco mais ou menos 8 injeções. Porém o soro do coelho preparado para a serina produzia ao contrario, do que verificava Nolf, uma turvação e um precipitado no soro de vaca, os quaes eram mais importantes do que os que dava o soro de coelho preparado para a globulina.

Em 1902, Falloise, em vista dos resultados diferentes de Nolf e Lebanc, tomou soro de cavallo e soro de vaca e estudou em dois quadros os resultados comparativos da precipitação com as globulinas e serinas, separadas cada uma dellas pelos processos dos dois experimentadores.

Falloise conclue que duas explicações são possiveis: a primeira é que a serina injectada aos coelhos dá ao seu soro um poder precipitante fraco, exigindo um grande numero d'injeções para que se produza, ao passo que as injeções de globulina lhe confere um poder precipitante energico e produzindo-se rapidamente; a segunda explicação, e que segundo elle é a mais plausivel, é que os processos classicos empregados para separar as globulinas e as serinas do soro não são perfeitos e que as solucções de serina que se injecta, contem traços de globulinas; seriam estes ultimos que, depois de numerosas injeções, acabam por conferir ao soro de coelho um poder precipitante pouco energico e exercendo a sua acção tanto sobre as solucções de globulina como sobre as de serina impuras.

E é assim que Falloise compartilha na conclusão de Nolf, que attribue á globulina apenas a propriedade de fazer nascer o poder precipitante.

Em 1906 Kraus e Schiffman, continuando os trabalhos de Kraus e Levaditi, trataram de pesquisar

quaes os órgãos ou elementos cellulares que seriam precipito-formadores.

Estas pesquisas consistiam em injectar quantidades variaveis de soro de cavallo, sub-cutaneamente, nas veias e na cavidade peritoneal de coelhos. Os coelhos eram sangrados algum tempo depois da injectão e os órgãos serviam a preparar extractos nos quaes apreciava a percentagem de precipitinas.

Os órgãos eram triturados depois mixturados com soro physiologico na proporção de $\frac{1}{10}$ e levada esta mistura á estufa de 37° durante algumas horas e por ultimo filtrados por papel filtro. A pesquisa da precipitação era feita mixturando de 0,1^{cc} a 1^{cc} d'extrato com 1^{cc} de soro de cavallo diluido ou não e collocando os tubos durante 24 horas a 37.°

Resultava destas experiencias que qualquer que fosse o modo d'injecção as precipitinas só appareciam no soro sanguineo.

Depois fazendo a splenoectomia em periodos diferentes, depois da injectão do antigeno, verificava que os coelhos fabricavam albumino-precipitinas como os coelhos que não soffriam a intervenção cirurgica; apenas havia um atrazo na sua appareção o que os experimentadores explicavam como uma causa d'enfraquecimento do organismo que tinha soffrido a ablação do baço. Concluiam então que o baço não desempenhava nenhum papel de precipito-formador, e por exclusão de partes dizem que a sua génese deve ser feita no systema vascular provavelmente no endothelio.

Em novembro do anno seguinte o Dr. Cantacuzéne fez o relato das suas experiencias que embora chegue a conclusões diferentes das precedentes parecem ser comtudo mais admissiveis.

Modificou ligeiramente a technica de Kraus e Schiffmann. Tomou como animal d'experiencia o coelho e como antigeno o soro de cavallo não aquecido, que injectava intraperitonealmente na maior parte das experiencias na dose de 10^{cc}. Serviu-se d'extractos d'órgãos muito mais concentrados; a emulsão de baço fez-a a 1:4 ao passo que a de Kraus e Schiffman

era feita a 1:10. Para o extrato de medulla ossea triturava em 2^o de soro physiologico a medulla dos dois femuros. Apenas os órgãos lymphoides (baço, ganglios, medulla ossea) e o pancreas lhe forneceram extractos precipitantes. A propriedade precipitante que encontrou no extracto de pancreas não era especifica visto que a encontrou tambem nos pancreas normaes de cabra e cão; alem d'isso nos cães d'experiencia aos quaes lhe fez a ablação do pancreas, a inoculação do antigeno era seguida da appareção de precipitinas no sangue como nos animaes testemunhas, o que lhe levou a eliminar do pancreas o papel de órgão precipito-formador.

Verificou que a elaboração das precipitinas nos órgãos lymphoides era precoce, durava poucos dias, para desaparecer uma vez que a precipitina tinha sido lançada no sangue. Este facto fez com que Kraus e Schiffmann interpretassem o resultado das suas splenoectomias como acima me referi e que os levaram a banir o baço como órgão precipito-formador.

Estudou ainda Cantacuzéne a acção precipitante em diluições de volume igual de soro physiologico e d'extracto peritoneal obtido por injecção intraperitoneal de uma emulsão aleuronica a coelhos que d'ante-mão tinham recebido sub-cutaneamente 10^o de soro de cavallo; assim viu apparecer no exsudado peritoneal a precipitina antes do seu apparecimento no sangue. Estas experiencias levaram-no a concluir que a elaboração da precipitina é devida em grande parte aos leucocytyos livres, e como os órgãos ricos em macrophagos constituem os centros principaes onde se formam as precipitinas é provavel que sejam estes que as segregam.

A especificidade dos soros precipitantes largamente discutida e até negada por alguns experimentadores não pode ser considerada no sentido absoluto da palavra, mas sim relativo pois só fornecem reacções especificas em relação ás doses utilizadas e á intensidade do precipitado obtido.

Foi mesmo esta falta de especificidade absoluta que fez suggerir a duvida aquelles que queriam exigir da reacção das precipitinas um rigor que não se

exige em geral d'outras reacções semelhantes como a das agglutininas por exemplo.

Em Janeiro de 1901 a apresentação dos trabalhos de Leclainche e Vallée sobre a applicação das precipitinas ao diagnostico differencial das nephrites nos dá indicações sobre a sua especificidade. Preparáram coelhos por uma serie de inoculações intravenosas de 20^{cc} de urina contendo 1 a 2 gr. d'albumina por litro. Os que resistiram durante 3 mezes, recebendo ao todo de 150^{cc} a 200^{cc}, davam 15 dias depois da ultima injeccão um soro precipitante. Estes soros não davam precipitação com urinas não albuminosas, os soros normaes do coelho e ainda do homem do cavallo, burro boi e carneiro eram indifferentes; obtiveram ainda precipitados abundantes com urinas fornecidas por 3 homens attingidos de nephrite intersticial, ao passo que com uma urina rica em globulinas provindo dum caso de nephrite parenchymatosa dava um precipitado insignificante.

Experimentando tambem estes soros em urinas fortemente albuminosas de cão e de vaca não deram nenhuma reacção.

Em Setembro do mesmo anno foi inaugurado em Hamburgo pelo Dr. Jess o methodo de differenciação das carnes com soros de coelhos preparados com soros das especies, cavallar, bovina, ovina, caprina e porcina que elle proprio ia colher ao matadouro na occasião da matança. Separava o soro do sangue por coagulação na geleira e injectava intraperitonealmente 10^{cc} de soro dados quotidianamente durante 8 a 10 dias depois dos quaes os sangrava conservando-os em jejum de vespera. Estes soros apenas davam precipitados com os macerados de carne da especie que fornecera o soro para a preparação do coelho. Em 7 de Novembro seguinte o Dr. Uhlenhuth consagravalle um artigo na *Deutsche medicinische Woshenschrift* e em 17 d'Abril de 1902 Miessner e Herbst publicavam um trabalho confirmando inteiramente a exactidão dos factos apontados por Jess.

Facilmente accete a especificidade das albumino-precipitinas para as albuminas de especies differentes e afastadas, houve duvidas (que como disse nasceram

da falta de especificidade absoluta) sobre se eram ou não específicas para as albuminas de especies proximas e até das diferentes albuminas do mesmo individuo.

Lemoine e Linossier em março de 1902 mostraram as vantagens do emprego de soluções albuminosas muito diluidas para que a precepitação seja especifica; pois que os seus soros preparados para soro humano, de cavallo, de vaca e mixturados na quantidade de 10 volumes para 1 volume de soro normal davam precipitados nitidos com os soros d'homem, vaca, cavallo, cão, carneiro e porco, reacção fraca com o de cobaya e um precipitado minimo, comtudo nitido, com o de gallinha.

Experimentando um soro de coelho preparado com soro de vacca para determinar a que diluição maxima os diversos soros começam a turvar-se achou os seguintes numeros: Turvava o soro de vaca a 1:5000; o de cavallo a 1:300 e o do homem a 1:50.

Perante estes numeros, que embora não sejam absolutos para todo e qualquer soro, pois nem todos teem o mesmo grau precipitante, da-nos comtudo um meio de garantir a sua especificidade.

Em 1903, quando Vallée e Nicolas estudavam a differenciação das carnes pelos soros precipitantes, communicaram na sessão da Sociedade Central de Medicina Veterinaria de 28 de maio, os seus trabalhos sobre a differenciação das soro-albuminas e das musculo-albuminas.

O facto que elles se propuzeram a elucidar era que o soro de coelho tratado pelo soro de vaca precipitava bem na dose de 5 gottas 2^{ce}, da diluição a 2% deste soro, e dum modo quasi inapreciavel 2^{ce} duma maceração de carne de vaca a 2%.

A condicção indispensavel para obter uma reacção nitida com as precipitinas é introduzir sempre na solução a precipitar um excesso de precipitina. Ora, ao passo que 2^{ce} de diluição a 2% de soro de vaca contem pouco mais ou menos 3^{mmg} d'albumina, 2^{ce} de maceração de carne não continha senão 2^{mmg}; tendo sido tratados os dois liquidos pela mesma dose de precipitinas estas encontravam-se, pois, sempre em maior

excesso sobre a maceração de carne que sobre a diluição de soro. Seria a maceração de carne que deveria fornecer o melhor precipitado.

A diferença observada na nitidez da reacção não resultava, pois, duma insuficiência de precipitina no tubo contendo a maceração de carne. Por outro lado, tendo sido as condições de meio idênticas para as duas soluções, não se poderia invocar para explicar a diferença das indicações da reacção as variações de temperatura, de desigualdades no grau de alcalinidade da diluição de soro ou da maceração de carne a precipitar. Repetiram as experiências sobre diluições de diversas amostras de soro de vaca e sobre diversas macerações de carne; em todos os casos o soro precipitante obtido no coelho, preparado por injecções multiplas de soro de vaca, mostrava-se bastante mais activo sobre as diluições deste soro que sobre as macerações de carne de vaca. A substancia activa deste soro parecia, pois, mais apta a precipitar as albuminas do soro que as do musculo.

Para verificar se se daria o inverso com o soro de coelhos preparados com as albuminas do musculo, trataram parallelamente coelhos, uns com soro, outros com um pezo igual de carne (posta a macerar no seu pezo de soro physiologico); apresentaram os resultados obtidos sobre dois coelhos:

Ao coelho A (com 2.200^{gms} de pezo) foram-lhe injectadas subcutaneamente, nos dias 17 d'Abril, 26 do mesmo mez e 7 de Maio, respectivamente as doses crescentes de 25, 50 e 60^{gms} de soro de vaca aquecido a 55.º O coelho B. (com 2.000^{gms} de pezo) foi inoculado nos mesmos dias com as mesmas doses de macerado de carne de vaca.

Os dois coelhos foram sangrados em 12 de Maio, isto é, no quinto dia depois da ultima inoculação. Estes dois animaes foram tratados dum modo rigorosamente comparavel. O soro utilizado para a preparação do coelho A continha pouco mais ou menos 7^{gms}, 8% de materias albuminoides coagulaveis pelo calor em presença d'acido trichloracetico; e as macerações inoculadas ao coelho B davam nas mesmas condições 3% de materias albuminoides. No total o

coelho A recebeu, pois, em materias albuminoides quasi o dobro do que recebeu o coelho B. Os soros dos dois coelhos A e B foram verificados sobre quantidades comparaveis de diluições de soro e de maceração de carne de vaca ; isto é, que as diluições a 2% de soro de vaca eram tratadas comparativamente pelos soros de A e de B e que as macerações de carne de vaca a 2% eram submettidas á mesma prova. Na dose de 5 gottas o soro do coelho A deu um bom precipitado em 2^o de diluição de soro de vaca, e um precipitado insignificante numa dose igual de maceração de carne de vaca. Na dose de 5 gottas o soro de coelho B precipitou muito bem 2^o de maceração de carne de vaca e quasi que não turvou 2^o da diluição de soro de vaca. O soro do coelho A tratado por injeções de soro de vaca precipitou bem sobretudo as albuminas do soro ; poder-se-ha chamar uma soro-precipitina. O soro do coelho B tratado por macerações de carne de vacca precipitou particularmente as albuminas do musculo ; dir-se-hia uma musculo-precipitina. Empregando apenas uma gotta ou duas a especificidade da reacção ganhava em nitidez e a musculo-precipitina que nestas doses precipitava muito bem as macerações de carne, não turvava as diluições de soro. A musculo-precipitina preparada para vaca comportava-se para com as albuminas das outras especies animaes da mesma maneira que a soro-precipitina.

Fica assim exposta a questão da especificidade das albumino-precipitinas para as albuminas de especies diferentes e para as albuminas de differente origem, mas do mesmo individuo.

Querendo levar mais longe a differenciação das albuminas, Linossier e Lemoine, em janeiro de 1907, publicaram as suas pesquisas sobre a differenciação das albuminas do soro de animaes da mesma especie mas de raças differentes. Foi assim que elles prepararam um coelho com 3 injeções de soro duma vaca da raça *Limousine*. Sangrado o coelho a branco e recolhido o soro a sua acção foi ensaiada comparativamente sobre soros de vacas das raças «*Limousine*», «*Charolaise*», «*Bretonne*», «*Normande*» e «*Vendéenne*».

Embora empregassem toda a atenção e todos os meios para verificar se havia alguma differença de reacção, não chegaram a resultados concludentes.

Alem da applicação practica das albumino-precipitinas, que forma o thema deste trabalho, esboçarei apenas algumas outras para mostrar o incremento que vão tendo estes anti-corpos como meio d'analyse biológica,

Em medicina legal servem a authenticar a especie a que pertence uma mancha de sangue, que exista em qualquer tecido de vestuario ou ornamentação, e que para o effeito de derivar as investigações criminaes, os culpados procurem provar que são manchas accidentaes, produzidas por sangue d'outra especie e portanto extranhas ao crime. Uma mancha de spermen pode ser identificada pelo mesmo methodo. Como diagnostico clinico das nephrites applicaram-no já em 1901, Leclainche e Vallée, como acima me referi. Em 1902 Linossier e Lemoine procuraram identificar uma albuminuria d'origem intestinal. E' um facto interessante, este, pois que, como o demonstraram as experiencias de Castaingne e Maurice Chiray as albuminas heterologas lançadas no sangue fazem baixar a percentagem d'albumina fixa e são eliminadas na maior parte pelos rins sem serem decompostas. Nas experiencias de Linossier e Lemoine dando a um doente albuminurico o regimen lacteo, com leite de vaca sem ser fervido, viram augmentar a percentagem d'albumina nas urinas e puderam obter com ellas um precipitado com o soro de coelho preparado com soro de vaca.

A fraude de mixtura de leites é facil de verificar, tendo soros precipitantes para as albuminas dos respectivos leites.

Em biologia a precipitação dos soros de duas especies dá-nos o estreito parentesco dessas duas especies. Na analyse de productos agricolas já tiveram o seu acolhimento; assim se differenciam o mel natural do mel artificial e até parece possivel distinguir os albuminoides dum vinho natural dos dum vinho artificial. A propria chimica dos albuminoides, delica-

da nos seus methodos de analyse, tem lucrado com as albumino-precipitinas.

Os soros que contenham as albumino-precipitinas especificas obteem-se com a introduccão no organismo de solutos albuminoides, com a condicção de esse organismo reagir a essas substancias extranhas. E' assim que se pode formular a seguinte lei: Se se inocula por varias sessões a um animal A uma materia albuminoide (sangue, soro, spermen, liquido ascitico etc.) provindo duma especie differente B, o soro do animal A adquire a propriedade de precipitar — in vitro — as soluções albuminosas provindo de B. (Esta lei não soffre excepção senão no caso em que o liquido albuminoso utilizado não provoca reacção no organismo inoculado),

Pode-se provocar o apparecimento de precipitinas como o experimentou Cantacuzéne com uma injecção intraperitoneal d'aleurona no coelho; porém estas precipitinas não são especificas, facto que faz prever que haja no organismo do coelho precipitinas livres, pois apparecem poucas horas depois da excitação energica dada pela aleurona, ao passo que as especificas levam tempo a formarem-se.

As vias de introduccão da albumina precipitogena podem ser a sub-cutanea, intravenosa, intraperitoneal e ainda como o demonstrou Cantacuzéne em 1907 por via estomacal, comtudo a sub-cutanea é preferivel como verificou o mesmo autor notando uma producção geral d'anti-corpos muito mais abundante do que por via intraperitoneal, caso em que notou, sobretudo, uma producção local de precipitinas tendo character nitidamente especifico. Os soros precipitantes para a differenciação das carnes fez-se de começo por inoculações a coelhos de soros normaes das respectivas especies como acima disse referindome aos trabalhos do Dr. Jess. Foi depois de se verificar a especificidade das musculo-precipitinas que se começou a preparar os coelhos com macerados de carne.

Como resulante dos trabalhos de Nicolas e Vallée, que acima deixei apontados, recommendam elles a seguinte technica: «Inocular-se-ha em 3 sessões e

com 8 dias d'intervallo sub-cutaneamente ao coelho uma maceração feita a frio de 50^{grms} de carne em 50^{cc} de soro physiologico. Se a carne fôr picada, a extracção dos productos soluveis é total depois de 3 horas. Passado este tempo submete-se esta massa á acção duma prensa de carne e inocula-se o liquido que escorre. Escusado será dizer que a operação deve ser feita tão asepticamente quanto possível. Os coelhos são sangrados 5 a 8 dias depois da ultima inoculação.»

Sendo as precipito-albuminas facilmente dissociaveis os soros precipitantes raramente se conservam limpidos além de 3 semanas ; é recommendado guardal-os na geleira ao abrigo da luz ; outros aconselham adicionar-lhes chloroformio ou phenol ou ainda filtral-os por vela Berkefeld.

Strube e Fally em 1907 conseguiram prolongar a duração dos soros precipitantes, destinados a differenciar as carnes, usando o processo da dissecação em harmonia com o que se faz para os soros agglutinantes.

A reacção precipitante consiste na junção de soro precipitante, preparado para uma dada albumina, com um soluto transparente dessa mesma albumina.

Faz-se num tubo de vidro no qual se deita a solução albuminosa para depois deitar o soro especifico, deixando-o escorrer pelas paredes do tubo gotta a gotta ; o soro por ser mais denso occupará o fundo do tubo.

Se a reacção fôr positiva formar-se ha um anel esbranquiçado na linha de contacto dos dois liquidos, anel este, que não tardará a reunir-se em flocos e descer para o fundo do tubo. Quando tivermos quantidades minimas de soluto albuminoso a indetificar o emprego de tubos capillares torna-se necessario. Ainda querendo conhecer exactamente a quantidade do precipitado formado para não recorrer á pesagem directa que demanda tempo e apparatus de precisão, emprega-se uns tubos cuja parte inferior é adelgada e rigorosamente calibrada e graduada, tubos que depois da reacção acabada se levam á centrifuga para depois ler na gradação o volume do precipitado.

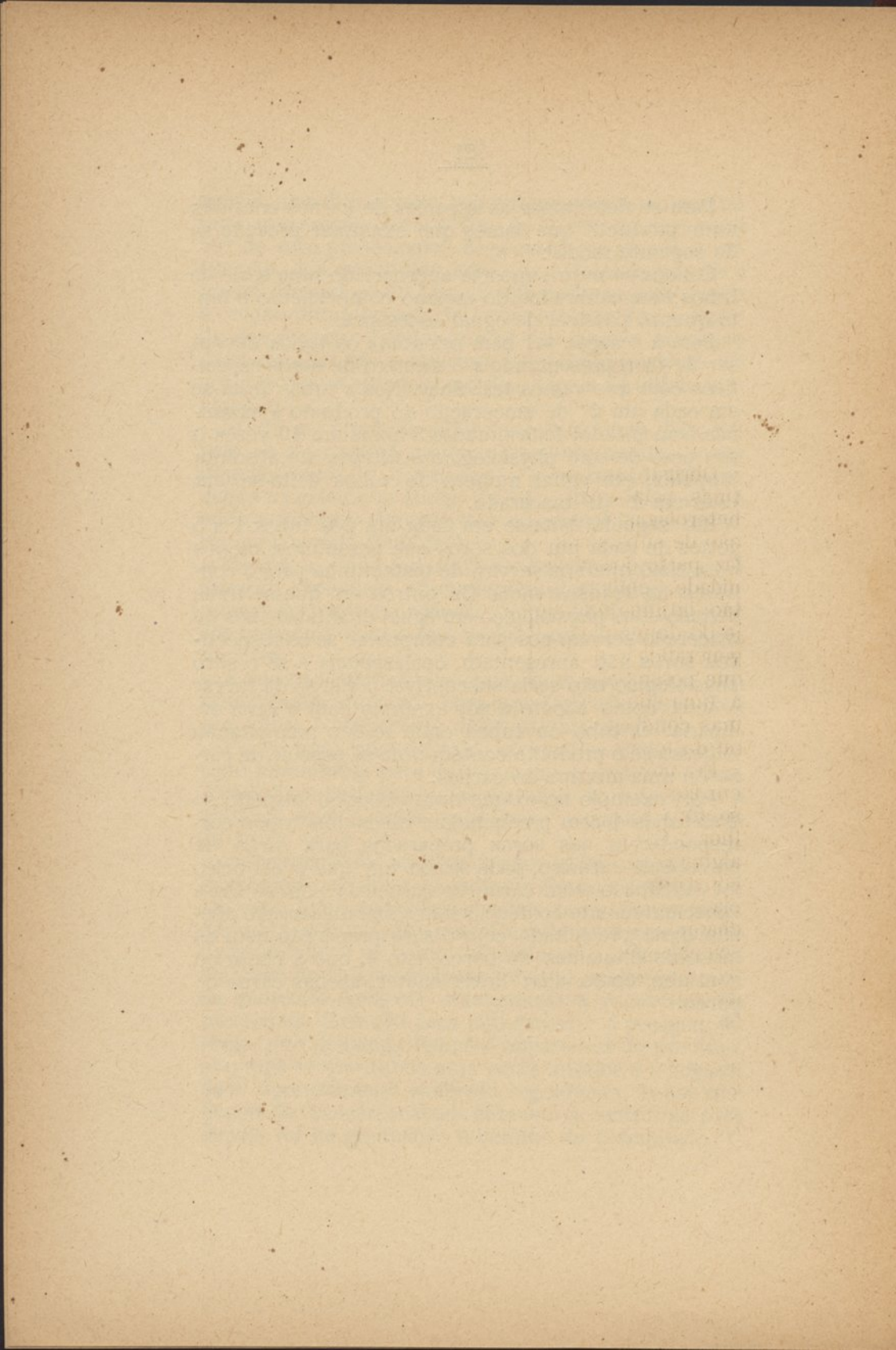
Para se determinar as especies de carnes contidas num producto que temos que examinar procede-se do seguinte modo :

Colloca-se num suporte apropriado uma serie de tubos bem calibrados, do mesmo comprimento e tanto quanto possivel de igual espessura.

Para a reacção ser bem orientada os tubos devem ser $2s+1$ representando s o numero de soros especificos com que vamos trabalhar. Nos s tubos deita-se em cada um 2^o de maceração do producto a examinar bem picado, feita durante 3 horas em 10 vezes o seu peso de soro physiologico e filtrada até absoluta limpidez, em igual numero de tubos deita-se em cada um 2^o de macerado.

Em seguida deita-se em cada um dos tubos 1 a 5 gottas de cada um dos soros que possuímos, menos no ultimo que nos servirá de testemunha para o contraste da transparencia. Os outros em que se tinha deitado soro physiologico em igual quantidade aos de macerado servem-nos para comprovar se os respectivos soros não apresentam opalescencia e se o soro physiologico não seria susceptivel por si só de turvar o soro, como acontece por exemplo com a agua ordinaria. O tubo ou tubos onde se deu precipitação indicará se o producto contém uma só especie de carne ou uma mixtura de carnes.

Por exemplo no exame dum chouriço suspeito se dois tubos derem precipitado e esses dois tubos responderem aos soros preparados para carne de porco e de carneiro, pode-se concluir que o chouriço foi falsificado com carne de carneiro ; pois se fosse conscientemente confeccionado a sua maceração apenas daria precipitado com o soro preparado com as musculo albuminas do porco. isto é, que a chouriço continha, como aliaz devia conter, apenas carne de porco.



Concepção theorica das albumino-precipitinas e da reacção precipitante

Obrigar um organismo a fabricar albumino-precipitinas pela introdução experimental de albuminas heterologas, é obrigar-o a defender-se dessa introdução de substancias extranhas. Essa reacção organica faz parte dos phenomenos da immundidade. A immundidade, embora abranja variadissimos phenomenos tão intimos que alguns dos quaes não são ainda hoje do dominio da sciencia, poder-se-ha defenir na sua generalidade da seguinte maneira: «E' a propriedade que possuem alguns individuos de serem refractarios a uma infecção á qual não podem resistir nas mesmas condicções outros individuos da mesma especie ou da mesma raça».

Era natural que no espirito dos experimentadores, em face dos factos da immundidade, se lhes suggerisse uma explicação que a cada um lhes parecia melhor interpretar os phenomenos observados. Embora algumas dessas explicações sejam filhas de factos concretos, não deixam de ser theoricas na sua essencia, e ainda mais, hypotheticas, se assim lhes quizerem chamar. Comtudo uma hypothese com a evolução da sciencia chega muitas vezes a tornar-se um facto. As hypotheses são muitas vezes precisas para servirem de base á evolução do proprio phenomeno que as fez conceber.

As theorias que aspiram a abranger todos os phenomenos da immundidade ainda o não conseguiram. Cumpre-me, porem, enquadrar n'uma d'ellas a interpretação das albumino-precipitinas e da sua reacção. Na impossibilidade de apreciar-as todas, visto não ser

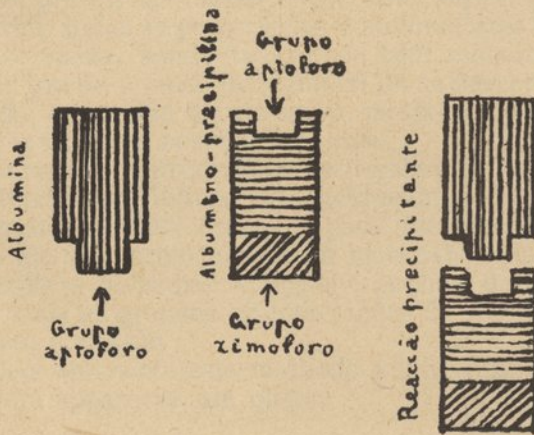
esse o meu alcance, apoiar-me-hei á theoria d'Erlich que, embora não seja impecavel, me foi comtudo aquella que melhor me pareceu demonstrar este phenomeno, materializando uma concepção.

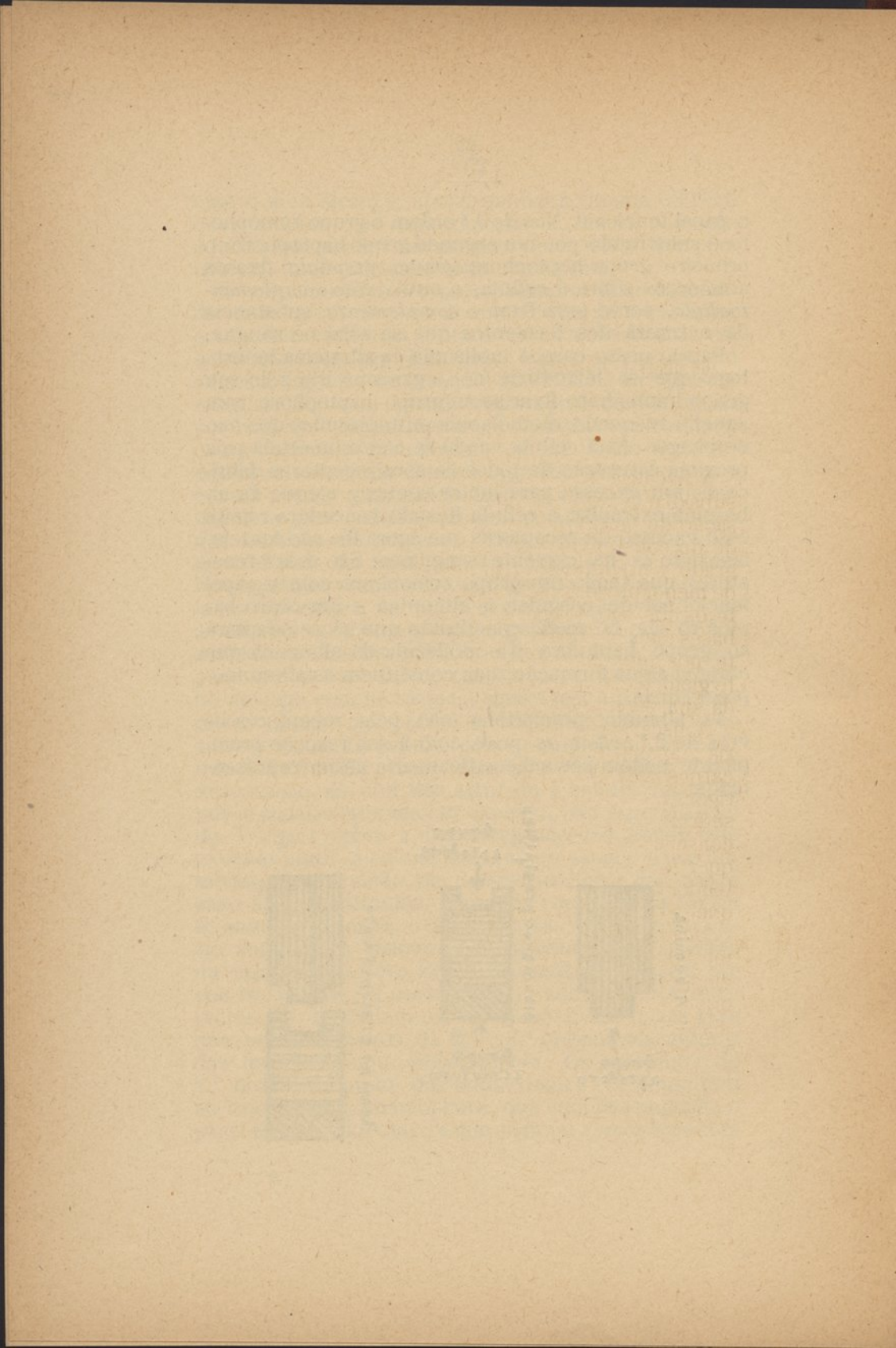
Erlich admittre que o protoplasma cellular é formado dum certo numero de molleculas differenciadas, compostas cada uma d'um nucleo fncional e de cadeias lateraes, em harmonia com o que se faz em chimica organica no desenvolvimento das formulas de constituição num plano, cuja representação se faz por cadeias longas, lateraes e fechadas; só assim se comprehende a constituição da infinidade de compostos isomeros da chimica organica. Por exemplo o benzol possui uma cadeia fechada ou nucleo em hexagno e seis cadeias lateraes partindo de cada um dos vertices do polygono. Uma representação comparavel pode ser feita para a mollecula do protoplasma. O grande numero de cadeias lateraes da mollecula protoplasmica, ás quaes chamou *receptores*, fixam a materia nutritiva para a regeitarem depois de ter soffrido as modificações necessarias á sua assimilação. Assim quer Erlich que se passe um phenomeno analogo com as toxinas; estas teem um grupo fncional (*grupo toxophoro*) e um outro intermediario entre a toxina e a cellula (*grupo haptophoro*). Se a cellula fica saturada pelos *grupos haptophóros* dá-se a sua intoxicação, se não fica saturada a cellula regenera novas cadeias lateraes em excesso, isto segundo a lei de Weigert sobre a hyper-regeneração. Sendo este excesso inutil, a cellula lança-os no sangue e nos humores, constituindo os *receptores livres* que n'este caso são a antitoxina. O que se passa com a toxina é, *mutatis mutantis*, o que se passa com qualquer outro antigeno. A maneira que se avançava na questão da immuidade teve Erlich necessidade de crear novos receptores; e assim chamou aos primeiros receptores de 1.^a ordem ou *uniceptores*, aos quaes teve que acrescentar os de 2.^a e 3.^a ordem, aos ultimos dos quaes chamou *amboceptores*. Os receptores de 2.^a ordem differem dos antecedentes em possuirem ao lado do grupo haptophoro, que aqui desempenha o papel fixador, um outro a que chamou *zymophoro* com

o papel funcional. Nos de 3.^a ordem o grupo zymophoro é substituído por um segundo grupo haptophoro; o primeiro grupo haptophoro (*grupo cytophylo*) fixa os anticorpos sobre a cellula, o outro, dito *complementophylo*, serve para fixar o *complemento*, substancia da natureza dos fermentos que se acha no sangue.

Para o nosso caso, a mollecula da albumina heterologa que se introduzia no organismo iria pelo seu grupo haptophoro fixar-se ao grupo haptophoro para aquelle adequado, da molecula protoplasmica dos macrophagos. Esta cellula vendo-se compromettida pela proxima saturação de todos os seus receptores, fabrica-os em excesso para lutar contra o ataque da albumina extranha; a cellula ficando vencedora rejeita esse excesso de receptores que agora lhe são inuteis, lançando-as na corrente sanguinea. São esses receptores que tendo um grupo zymophoro com o papel functional de coagular a albumina e um outro haptophoro de tal modo constituido que só se adaptará ao grupo haptophoro da mollecula da albumina que obrigou a sua formação, que constituem as albumino-precipitinas.

As albumino-precipitinas são, pois, receptores livres de 2.^a ordem os quaes com a sua reacção precipitante podem ser schematicamente assim representados:





Fiscalisação das carnes. Vantagens do methodo
de analyse biologica. Viabilidade da sua generalisação.

Conclusões do que ficou exposto

A fiscalisação das carnes deve attender a dois fins: subsidiar a hygiene publica com a rejeicção e inutilisação de productos que possam vir prejudicar a saude do consumidor e ainda obstar a que elle fique logrado e prejudicado economicamente com productos de menor preço apresentados como se fossem realmente os que são de maior valia. A carne sendo uma das bases mais importantes da alimentação, principalmente nos grandes meios, toda a vigilancia e cuidados hygienicos que se lhe consagrem reverterão a favor da sua população.

A fiscalisação tal qual hoje é feita, é muito summaria ; apenas se attende aos caracteres phisicos. Nas carnes frescas a fiscalisação é facil de ser feita com rigor, porém nas carnes ensaccadas depois de terem soffrido todas as preparações condimentares e da sua conservação, sendo tanto mais facil acobertar qualquer fraude é tanto mais difficil de as desvendar não tendo, como não ha até agora, methodos seguros de que o tecnico possa lançar mão.

Devem ser introduzidos na fiscalisação das carnes methodos scientificos que favoreçam o desempenho consciente dessa funcção, para que goze dos foros que lhe são pertença, e assim mais cabalmente possa instruir e subsidiar a hygiene publica, de que cada vez mais as grandes agglomerações de população carecem e exigem.

Hoje apresento este methodo a introduzir, amanhã poderá apparecer um outro.

Lembro, por exemplo, que seria de alcance pratico verificar se o precipito-diagnostico do mal rubro daria reacção positiva em carnes defumadas provindo de porcos atacados dessa epizootia. Outros methodos que interessem a fiscalisação das carnes podem vir a lume com as continuas pesquisas da sciencia, e é preciso que se generalisem as descobertas scientificas que directamente visem a pratica e não as deixar permanecer no recinto dos laboratorios ou quando muito a sua explanação collecionada nas bibliothecas. E' preciso que se avance que se desperte desta inacção para a vida intensiva que faz com que aos olhos dos criticos imparciaes pareça um apnagio de raça. Será um producto de clima? De situação geographica? De condições economicas? Ou seja filha dum destes factores ou de todos, o que não resta duvida é que é um facto verificado na maioria dos ramos da sciencia e industria.

O emprego do methodo biologico de identificação de carnes além de directamente verificar uma fraude, que seria punida por lei, iria indirectamente obstar a que essa fraude fosse feita em grande escala, embora infelizmente não deixasse de haver, como sempre, quem seja pouco escrupuloso.

A generalisação do methodo poderia ser feita de duas maneiras:

As carnes suspeitas seriam detidas no posto de fiscalisação e mandada uma amostra para o laboratorio do Estado que se encarregasse da obtenção dos soros precipitantes, podendo no espaço de 24 horas dar o resultado da reacção e não havendo assim muita demora na detenção da remessa de carnes, caso a reacção fosse negativa. Outra solução seria o laboratorio fornecer aos diversos postos soros precipitantes e a reacção ser feita no proprio posto pelo medico-veterinario. Neste caso só seriam dadas como positivas para os efeitos judiciaes, as reacções feitas com os soros do laboratorio do Estado ou d'outra proveniencia mas só depois de verificados por esse mesmo laboratorio.

Como laboratorio do Estado estaria naturalmente indicado o da Escola de Medecina — Veterinaria, em-

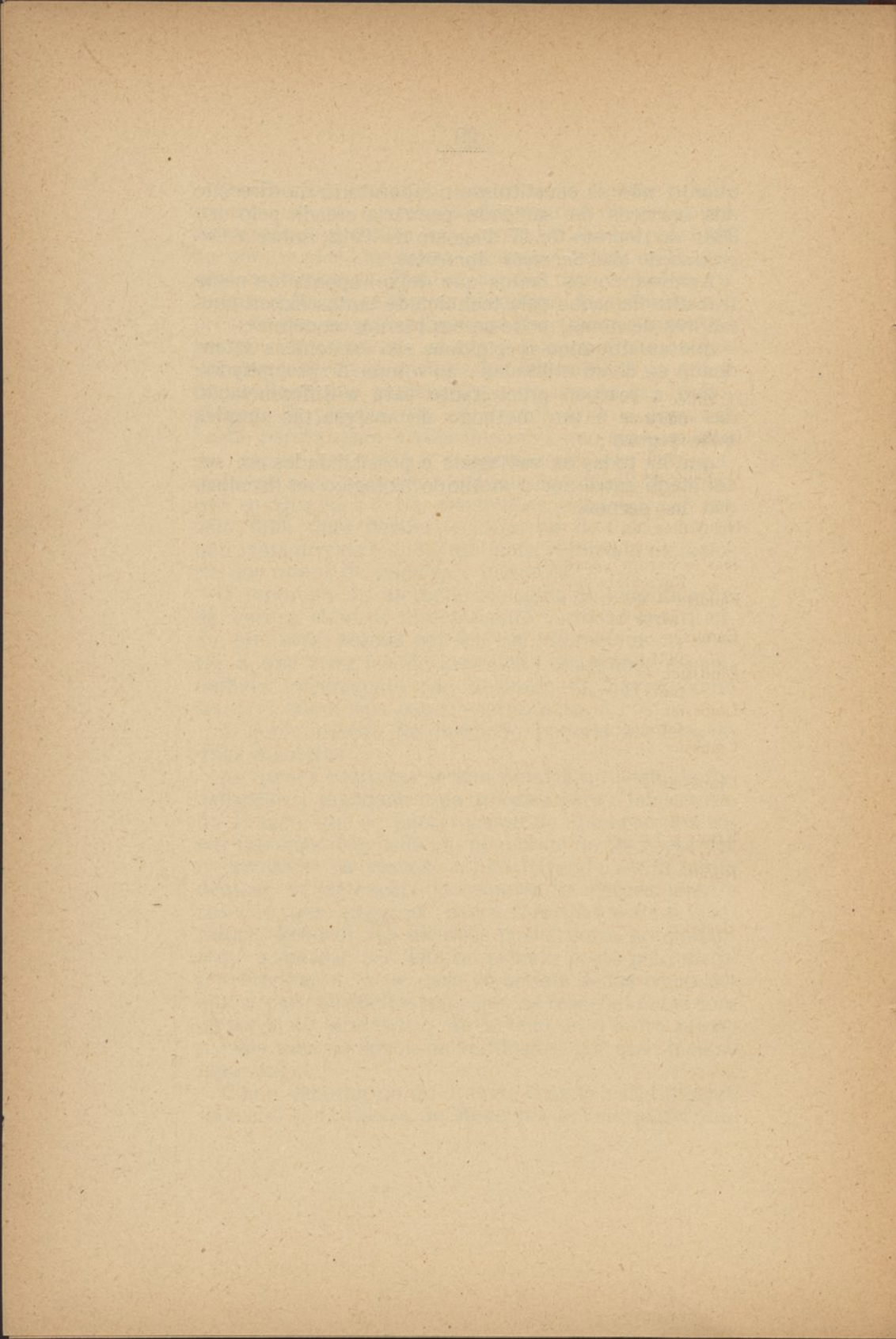
quanto não se constituisse o laboratorio da direcção dos serviços de sanidade pecuaria creado pelo art. 368.º do decreto de 17 d'agosto de 1912, sobre a *Organização dos Serviços Agricolas*.

Analysando os factos que deixei apontados neste trabalho firmados pela technica de tantos experimentadores de nome, pode-se em resumo concluir :

que as albumino-precipitinas são especificas attendendo ás doses utilizadas e ao volume do precipitado ;

que a reacção precipitante para a differenciação das carnes é um methodo de analyse tão simples quão seguro ;

que ha todas as vantagens e possibilidades em ser adoptado entre nós o methodo biologico na fiscalisação das carnes.



BIBLIOGRAPHIA

- H. Vallée — Les serums precipitants. Recueil de Medecine Veterinaire de 1903.
- H. Vallée — La differenciation des viandes par les serums precipitants. Recueil de Medecine Veterinaire de 1903.
- H. Vallée et Nicolas — Les serums precipitants, specificité et son methode de preparation. Recueil de Medecine Veterinaire de 1903.
- H. Vallée et Leclainche — Note sur les anticorps albumineux. Comptes Rendues S.¹⁶ Biologie 1901.
- Jess — Serum specifique pour reconaitre la viande de cheval. Recueil de Medecine Veterinaire de 1903.
- Fallose — Contribution á l'etude des serums precipitants. Ann Inst. Past. 1902
- Camus — Specificité et conditions d'action des precipitines. Comptes Rendues S.¹⁶ Biologie 1902.
- Linossier et Lemoine — Sur la specificité des serums precipitants Comptes Rendues S.¹⁶ Biologie 1902.
- Linossier et Lemoine — Sur quelques conditions de l'action des serums precipitants. Même revue 1902.
- Linossier et Lemoine — Utilisation des serums precipitants pour l'etude de certaines albuminuries. Même revue 1902.
- Linossier et Lemoine — Essai de differentiation des albumines du serum chez les animaux de même espece mais de races differentes. Même revue 1907.
- Kraus et Schiffmann — Sur l'origine des anticorps precipitines et agglutinines. Ann. Inst. Past. 1906.
- Rodet — Sur les serums dits precipitants, role respectif de l'un et de l'autre serum dans la reaction de precipitation. Comptes Rendues S.¹⁶ Biologie 1906.
- Castaigne et Chiray — Que deviennent des solutions de substances albuminoïdes injectées sous la peau ? Comptes Rendues S.¹⁶ Biologie ; 1906.
- Castaigne et Chiray — Effets produits sur le sang par le passage d'albumines heterologues dans la circulation. Même revue 1906.
- Weill-Hallée et Lemoire — Antitoxine et precipitine. Comptes Rendues S.¹⁶ Biologie 1906.
- Weill-Hallée et Lemoire — Action empechante d'un antiserum

- sur la production de precipitines. Comptes Rendues S.^{té} Biologie 1907.
- Cantacuzéne — Apparition des precipitines dans le sang consecutivement à l'inoculation de serum normal par la voie stomacal. Comptes Rendues S.^{té} Biologie 1907.
- Cantacuzéne — Sur la formation de substances precipitantes par les serums chez les lapins qui ont reçu une injection d'aleurone dans le peritoine. Même revue de 1907.
- Cantacuzéne — Recherches sur l'origine des precipitines. Ann. Inst. Past. 1608.
- Strube et Fally — Conservation des serums precipitants destinés à differencier les viandes. Revue generale de Medecine Veterinaire, 1907.
- Nicolle et Poserski — Les anticorps des toxines sulobles. Ann. Instit. Past. 1908
- Nicolle et G. Abt. — Les anticorps des albuminoides et des cellules. Même revue 1908.
- Nicolle — Les anticorps normaux. Même revue 1908.
- Ascoli — Elementi di Sierologia.
- Kolle et Hetsch — La Bactereologie experimentale. Tome 1^{er}.
- Macé — Traité pratique de Bactereologie. Tome 1^{er}.
-

SEGUNDA PARTE

SECONDA PARTE

Verificação experimental da obtenção
de soros precipitantes para as albuminas de musculo
de algumas especies. e do methodo de analyse
applicado ao exame dos chouriços

Propuz-me nesta *segunda parte* do meu trabalho, em tomar a iniciativa da obtenção de soros precipitantes para a differenciação das carnes, querendo facilitar deste modo, orientando até, se possivel fosse, os que depois de mim ou por *motu proprio* ou encarregados quizessem obter em larga escala esses soros. Com bem pezar meu, porém, até á data em que devo metter no prelo esta dissertação, ainda não consegui obter nenhum soro. Imprevistos de technica e a escassez do tempo não me permittiram que aqui deixasse registados os meus trabalhos depois de concluidos. Era-me tambem impossivel addiar a defeza desta dissertação, e portanto limitar-me-hei a expor os passos que tenho dado nesse sentido, reservando para mais tarde, caso consiga concluir estes trabalhos, a publicação dos resultados.

O plano foi preparar coelhos para as musculo-albuminas do cão, porco, carneiro e vaca. Depois de obúidos os soros verificaria a especificidade de cada um com as carnes frescas, e em seguida com chouriços que preparei, com os condimentos que é de uso empregar-se, um apenas com carne de cão, outro com carne de porco, um terceiro com carne de carneiro, um quarto com carne de vaca e por ultimo um com a mixtura das quatro carnes. Completaria a sanção do methodo de analyse, pesquisando fraudes em chouriços, apresentados ao commercio, que originassem suspeita.

Ao começo, não tão bem orientado como o deveria ter sido, procurei preparar os coelhos com macerados de carne feitos durante 3 horas, nas quantidades de 10^{grs} de carne para 100^{cc} de agua destillada; a carne era cortada o mais finamente possivel mas com o auxilio d'uma thesoura. A receio injectei intravenosamente as primeiras vezes 1^{cc}, passando depois a 2^{cc}; isto é, a dose maxima de albuminoides soluveis que injectava era 0,5^{gr} 0005, pois a analyse do macerado dava no albuminometro d'Esbach 0,5^{gr} 5 por litro. As injectões eram feitas com oito dias d'intervallo. Apóz mez e meio de preparação, que na verdade para a carne de cão e de porco foi um pouco irregular, em vista da difficuldade na obtenção dessas carnes em dias fixos, os 8 coelhos que tinha empregados nesta experiencia, sangrados em 20^{cc}, por punção do coração, deram na geleira cada um delles 10^{cc} de soro. Nenhum desses soros deu reacção precipitante.

Lendo depois os trabalhos de Nicolas e Vallée que expuz na *primeira parte* quiz seguir-lhes a technica. Assim tomei carnes de porco, de vaca e de carneiro; bani a de cão, pois era-me impossivel adquirir-a precisamente nos dias de inoculação.

Servi-me de 6 coelhos, sendo dois para cada especie de carne, trez dos quaes eram os que já tinham soffrido o tratamento intravenoso. Cada um dos macerados foi feito com 100^{gr} da respectiva carne, cortada á thesoura, em igual pezo de soro physiologico. Depois de 3 horas de maceração, foram passados á prensa, e injectava o que escorria a dois coelhos; isto é, cada um recebia 50^{cc} de macerado, como recommendavam Nicolaś e Vallée. No segundo dia, depois das inoculações, fui encontrar mortos 4 coelhos; no 3.^o dia morreu outro, apenas um sobreviveu. Todos elles, mesmo o que não secumbiu, apresentaram no ponto de inoculação uma infecção putrida: ainda vivos exhalavam um cheiro nauseabundo. O coelho que sobreviveu apresentava uma escara do tamanho da palma duma mão, que consegui que fosse diminuindo com applicações de tinctura d'iodo; ainda hoje está vivo, continuando a sua preparação.

Querendo obviar estes effeitos tão violentos, ten-

tei empregar macerados mais diluidos, e injectados em menos quantidade. Comecei a empregar uma machina de picar carne, pois, alem de dividir melhor a carne, poupava tempo e trabalho.

Fiz um macerado de 50^{grs} de carne picada á machina em 100^{cc} de soro physiologico ; depois de 3 horas de maceraçãõ, filtrei apenas por panno ; obtive um soluto tendo 5^{gr} d'albuminoides por litro. Injetei subcutaneamente este macerado a quatro coelhos: um com 5^{cc}, dois com 10^{cc} e outro com 20^{cc}. O primeiro e um dos que foi injectado com 10^{cc} morreram no dia seguinte á inoculaçãõ, com os mesmos signaes locais que acima apontei. O que recebeu 20^{cc} morreu quatro dias depois. Apenas um dos que foi inoculado com 10^{cc} sobreviveu apresentando a infecçãõ local que, embora fosse sempre tratando a ella secumbiu 15 dias depois.

Em seguida tratei de augmentar ainda mais a diluiçãõ do macerado.

Assim é, que tomei 10^{cc} de macerado, feito nas mesmas condições e doses que o precedente, e juntandolhe 50^{cc} de soro physiologico, filtrando depois por papel filtro até transparencia. Deu esse macerado 1^{gr} d'albuminoides por litro. Inoculei 4 coelhos, 2 com macerado de carne de carneiro e os outros dois com macerado de carne de porco.

O que recebeu 10^{cc} de macerado de carneiro, morreu 5 dias depois de inoculado ; o que recebeu 5^{cc} do mesmo macerado sobreviveu e é um dos que ainda hoje continuo a preparar. Os dois que receberam macerado de carne de porco, um na dose de 10^{cc} e outro na de 5^{cc}, morreram ambos 8 dias depois.

Não restava, pois, duvida que a mortandade dos animaes de experiencia tinha como causa uma infecçãõ, provindo da carne, pois que por mais que me esforçasse, para que todas as operações fossem feitas o mais asepticamente possivel, já a carne vinha conspurcada de bacterias, que encontravam durante a maceraçãõ e o tempo de absorpçãõ da parte injectada, um optimo meio de polluaçãõ.

Com o fim de esterilizar o macerado, recorri á filtraçãõ por vella sob a pressãõ de 3 atmospheras ;

injectados 10^{cc} deste filtrado não se deu nenhuma reacção local. Porém, tive que desistir pois que a velha me retinha grande parte das albuminas : assim, um macerado, que antes da filtração dava 5^{gr} d'albuminoides por litro, deu depois de filtrado apenas 0,5^{gr} por litro.

Por ultimo tive que lançar mão dum methodo antiseptico, pois que o aseptico me era impossivel realizar com o material e condições de que dispunha. Lembrei-me de atalhar e destruir a polluição de bacterias, empregando para fazer o macerado, soro physiologico, contendo 1^{gr}. a 2^{gr}. de formol por litro.

Como testemunha, injectei primeiro a um coelho 50^{cc} de soro physiologico, contendo 2^{gr} de formol por litro ; isto é, o animal recebeu por via hypodermica 0,5^{gr}1 de formol e não se resentiu. Se por um lado eu injectava uma substancia inocua naquella dose, por outro lado impedia toda a fermentação putrida, que alias se dava apoz umas 6 horas de abandono do macerado, que tivesse sido feito apenas com soro physiologico. A diminuição do titulo de dissolução das albuminas, por precipitação pelo formol, era insignificante ; um desses macerados que conservei durante 48 horas apenas me deu uma differença de 0,5^{gr} por litro.

O primeiro macerado que fiz nestas condições foi com 75^{gr} de carne de porco, picada á machina, e 150^{cc} de soro physiologico com 2^{gr} de formol por litro ; depois de 3 horas de maceração filtrei apenas por panno : deu-me um macerado que continha 6^{gr} d'albuminoides por litro. Com este macerado inoculei 2 coelhos; um, que já estava em tratamento, com 10^{cc}, e um outro, ainda não servido, com 5^{cc}.

Fiz tambem, nas mesmas condições, um macerado com carne de carneiro, e injectei tambem 10^{cc} a um coelho já em preparação.

Como passados oito dias depois da inoculação, os animaes não apresentassem signaes de perturbação organica, quer geraes quer locais, achei que devia recorrer de novo ao processo apontado por Vallée, isto é, premindo a carne á prensa para assim obter o maximo de albuminas, e injectar doses maiores. E'

assim que já inoculei um coelho (de 1550^{gr} de pezo), ainda não servido, com 50^{cc} de macerado de carne de carneiro, feito nas seguintes condições: carne de carneiro, picada á machina, 50^{gr}, junta com 50^{cc} de soro physiologico contendo 1^g de formol por litro. Já são passados 4 dias e o coelho apresenta-se bem ; se resistir, continuarei a preparação por este processo, pois, é o unico a que pude chegar, parecendo ter viabilidade pratica.

Não queiram ver neste meu ainda incompleto trabalho uma barreira intransponivel á realização, *entre nós*, da obtenção dos soros precipitantes.

Não é mais do que um pequeno obstaculo, que eu ainda não consegui transpor por falta de tempo, de technica e de material.

Se me vir forçado a retirar desta Escola, antes de concluida a obtenção de soros, faço aqui um apello vehemente e sincero a todos os meus collegas, e em especial áquelles que tiverem em seu auxilio os fracos elementos do laboratorio desta Escola, para que consigam os resultados a que tanto aspiro e que desejaria vêr, em breve, postos em pratica no nosso paiz.

Se este meu primeiro balbucear da infancia da vida que vou encetar lhes fôr d'algum proveito, muito me regosijaria em ter sido util á nossa medecina veterinaria, que tanto estimo e anhele ver mais avançada no seu exercicio, de que dependerá, sem duvida, o augmento do seu conceito !

Lisboa, 25 de Setembro de 1912.



