

**ESTUDOS COMPARATIVOS SÔBRE A AÇÃO DO CLORIDRATO DE
TIAMINA E DO IÓDO-BISMUTATO DE TIAMINA NO ORGANISMO
ANIMAL**

YARO RIBEIRO GANDRA
Assistente

Desde a memorável descoberta de Eijkman, em 1897, alguns dos inúmeros estudos que se fizeram sôbre o "fator hidrossolúvel B" de McCollum marcaram verdadeiras fases do progresso da técnica de pesquisa dêste indispensável fator alimentar. Assim, em 1912, Funk¹ obteve a cura de ratos com polineurite, administrando-lhes extrato aquoso de farelo de arroz; Jansen e Donath em 1926², empregando um método de adsorção, isolaram um cloridrato, contendo enxofre, altamente ativo; em 1931-34 Windaws, Tschesche, Ruhkopf, Laquer e Schultz³ conseguiram estabelecer sua fórmula empírica; dois anos depois, Williams e outros elucidaram sua estrutura química e, mais tarde, Williams juntamente com Cline e Finkelstein⁴ realizaram sua síntese; em 1937 Lohmann e Schuster⁵ isolaram a cocarboxilase de Auhagen e demonstraram ser esta um éster pirofosfórico de tiamina; esta coenzima foi sintetizada nesse mesmo ano por Tauber⁶, Euler e Vestin⁷, Stern e Hofer⁸ e outros.

Uma série grande de estudos vem sendo feita, abordando o problema da tiamina sob todos os seus aspectos, dada a importância que ela tem demonstrado na regulação dos diferentes sistemas do organismo. O conhecimento da ação específica da tiamina tem sido largamente difundido e constitui, hoje, valorosa arma terapêutica amplamente aplicada nos centros médicos. A tiamina constitui agente terapêutico de grande utilidade e devido à sua rápida absorção, seu efeito é praticamente imediato; por outro lado, sua eliminação também é rápida, não conseguindo o organismo retê-la por maior tempo, usufruindo, assim, de seus benefícios por um período mais amplo. Preocupados, pois, com a sua rápida eliminação do organismo, tentamos uni-la a um radical pesado e de eliminação mais demorada, prolongando assim a ação terapêutica da tiamina.

Tivemos nossa atenção despertada por trabalhos que, unindo a tiamina a diferentes radicais, tornaram-na parte de sais e, portanto, com propriedades dêstes; entre tais trabalhos podemos citar o de Wachsmuth⁹, que estudou formas cristalinas de compostos duplos de tiamina e iodetos diversos (Ag, Sb, Sn, Pb, Hg, Bi). Dêstes compostos escolhemos o iôdo-bismutato de tiamina, cuja insolubilidade queríamos aproveitar.

Em estudo anterior¹⁰, tendo pombos como animais de experiência, pudemos admitir que a tiamina, sob a forma de iôdo-bismutato, não perdeu o seu efeito terapêutico e, ainda mais, a duração do efeito terapêutico da suspensão oleosa de iôdo-bismutato de tiamina, quando recentemente preparada, nos pareceu igual ou mesmo superior à da solução aquosa de cloridrato de tiamina.

Não ficando, entretanto, satisfeitos com a insuficiente homogeneidade do grupo de pombos utilizado, propusemo-nos repetir aquêles ensaios em um lote de animais rigorosamente padronizados para, assim, tentar confirmar, ou não, a hipótese por nós formulada, de, com êste composto, conseguirmos uma retenção mais duradoura no organismo e, portanto, o prolongamento da sua ação terapêutica.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Animais. — Conseguimos de nosso biotério ratos brancos, da raça Wistar, rigorosamente padronizados. Êste grupo de ratos, descendente de animais também padronizados, foi controlado desde o seu nascimento e era constituído por 30 exemplares, sendo 15 machos e 15 fêmeas, todos nascidos no mesmo dia e que no início da experiência contavam 128 dias de idade.

O lote de fêmeas apresentava-se no dia zero da experiência com pêsos individuais que oscilavam entre os valores extremos de 200 a 232 g, enquanto que o lote de machos apresentava-se com pesos individuais que oscilavam de 295 a 335 g, portanto representavam um lote de suficiente homogeneidade, muito útil para o nosso tipo de estudo.

Vários autores, trabalhando com vitamina B₁ e ratos, têm usado animais jovens, uma vez que aproveitaram para seus estudos a medição do atraso do crescimento que êstes apresentam quando sujeitos a uma dieta carente desta vitamina.

Preferimos, entretanto, com Von Peter e col. *in* Lorenzini¹¹ e outros, o uso de animais com aproximadamente 4 meses de vida, pois que prevíamos um longo tempo de experiência, fato que nos tornaria difícil dissociar o aumento intrínseco do pêso dado pela vitamina B₁ adicionada à dieta carentiada, daquele próprio do crescimento.

Método. — No estudo da vitamina B₁ vários métodos biológicos têm sido usados, e todos êles apresentam vantagens e desvantagens próprias, o que nos faz encontrar, na literatura sôbre o assunto, defensores dêste ou daquele método de experimentação biológica.

Podemos grupá-los em métodos preventivos e métodos curativos.

Os métodos preventivos cuidam de prevenir o aparecimento dos sintomas do beribéri provocado por uma dieta carente em vitamina B₁, ministrando ao mesmo tempo tiamina, quer sob a forma de preparações, quer sob a forma natural, existente em alimentos possuidores de taxas variadas de tiamina.

Os métodos curativos, mais usados, constituem, como o seu nome indica, um grupo de técnicas que têm como norma curar a síndrome beribérica provocada por uma dieta carente de tiamina. Neste grupo de métodos ainda encontramos variantes de técnicas, pois que umas anotam principalmente o tempo compreendido entre a ministração da tiamina e o início da regressão dos sintomas; outras, a dose de tiamina ministrada e a velocidade de regressão dos mesmos; enquanto que outras ainda, associando os dois grupos anteriores, estudam o prazo pelo qual as diferentes doses curativas protegem os animais de nova crise beribérica, quando mantidos em dieta carente.

A avaliação da duração do efeito terapêutico de uma substância em estudo, também pode ser feita de diferentes formas. Inúmeros trabalhos têm avaliado seus resultados pela regressão dos múltiplos sintomas da polineurite e o posterior reaparecimento dêles quando se sujeitam os animais de experiência, periodicamente, a doses conhecidas de tiamina.

Embora a sintomatologia das crises beribéricas em ratos seja muito característica e, ainda mais, específica, não achamos, entretanto, a sua observação aconselhável como base de um estudo no qual se quer ter uma idéia quantitativa do fenômeno e relativa sensibilidade nas respostas às diferentes doses ministradas. Dificilmente poderíamos saber, pela regressão dos sintomas, o momento exato em que, de fato, a cura da polineurite começou a se processar.

Foi também difícil, senão impossível, precisar em horas ou, mesmo, dias, o tempo exato de proteção que uma certa quantidade de tiamina permite. Os sintomas iniciam-se vagamente; o animal apresenta-se triste, quieto e com o pêlo eriçado por um tempo que varia desde algumas horas até 3 a 4 dias, antes que possamos identificar qualquer sintoma mais específico. Por êste motivo, tal método tornaria de difícil obtenção a rigorosa homogeneidade que desejávamos em nossas observações, pois se fazia sentir, certamente, a influência do fator pessoal na determinação precisa do tempo de proteção das substâncias em estudo.

Moura Campos e col.¹² também notaram esta ampla variação do aparecimento das perturbações nervosas quando disseram que “as perturbações nervosas foram registradas, em regra, de 6 a 8 semanas de alimentação carenciada. Em um caso (rato n. 206) apareceram precocemente, 5 dias, e em outro (rato n. 207) após 60 dias”.

Outra dificuldade consiste na verificação da maior nitidez desses sintomas, quando os animais são mantidos com dieta apenas parcialmente carente em tiamina, de maneira a permitir uma sobrevivência maior dos mesmos, fornecendo, pois, tempo suficiente para que os ditos sintomas se manifestem com maior clareza.

A observação da variação de crescimento de ratos de 25 a 40 dias de idade, quando submetidos a uma dieta carente, é uma boa técnica, pois que nos permite traçar uma curva e com esta ter uma idéia nítida da evolução da experiência. Esta técnica foi empregada por Chase e Sherman¹³ e adotada pela “American Association of Official Agricultural Chemists”¹⁴ com algumas modificações, e entre nós vários pesquisadores empregaram-na, também com ótimos resultados^{15, 16, 17, 18}. Outros associam-na à observação de um ou mais sintomas¹⁹.

Um excelente sintoma para se levar em consideração, em estudos biológicos sobre a tiamina, é a perda do apetite, pois que é um dos sintomas mais precoces e evidentes. O aumento da concentração sanguínea de substâncias intermediárias do metabolismo dos glicídios teria uma ação direta sobre o apetite, ocasionando uma anorexia evidente e persistente, anorexia esta que rapidamente é afastada quando, por intermédio da vitamina B₁, se removem êstes compostos intermediários por metabolização completa dos mesmos. Sendo um sintoma tão constante e sensível às diferentes taxas de vitamina B₁ introduzidas no organismo, alguns autores substituem a usual técnica de observação dos fenômenos convulsivos da polineurite beribérica pela medida da anorexia.

A medição da anorexia pode ser feita indiretamente, observando a curva de peso dos animais, ou, diretamente, pesando a quantidade de alimento fornecida e a sobra dêste 24 horas depois de fornecido; a diferença entre estas duas cifras nos dá a quantidade efetivamente consumida neste espaço de tempo de observação. Entretanto, êste método direto, tão evidente nos primeiros dias, logo depois nos trará dificuldades para avaliar a variação da intensidade da deficiência, pois que o consumo de alimento desce a um mínimo em tórno do qual as peque-

nas variações não nos permitiriam acompanhar diariamente a evolução, senão apenas saber de sua duração total.

Por êste motivo, pareceu-nos interessante acompanhar o fenômeno da carência tiamínica pela curva ponderal, pois que o seu aspecto homogêneo, constante para cada dose, nos dá uma idéia bem satisfatória tanto da duração como, e principalmente, da evolução da carência tiamínica.

Inúmeros autores têm usado as variações ponderais para indicar a curva de crescimento dos animais. Pareceu-nos, entretanto, que a simples medição do pêso não reflete somente a variação do crescimento em si, mas também um aumento dos tecidos de reserva do organismo.

Usamos um lote de animais com 128 dias de idade, o que nos permitiu diferenciar melhor uma variação ponderal independente do fator crescimento e, ainda mais, afastado o fator crescimento, pudemos acompanhar as variações ponderais durante um período de sete meses consecutivos, fato êste difícil de ser conseguido se se quisesse aproveitar também o período de crescimento.

A regularidade das respostas às doses de tiamina nos diferentes lotes e a homogeneidade dêstes, nos permitiram considerar muito satisfatória a sensibilidade ao método em questão, em estudos desta natureza.

Dieta. — Muitas são as dietas destinadas a provocar o beribéri em ratos. A que nos pareceu mais interessante e segura foi a citada por Hawk, Oser e Summerson²⁰, os quais, a uma dieta composta de caseína, sacarose, óleo vegetal hidrogenado, óleo de fígado de bacalhau e mistura salina, acrescentaram quantidades adequadas dos diferentes compostos orgânicos capazes de interferir em experiências desta natureza, tais como: riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido p-amino-benzóico, pantotenato de cálcio, biotina, ácido fólico, colina, inositol e menadiona.

Dieta excelente também é a de Miller e Baumann²¹, pois conseguiram ótimos resultados suplementando a dieta basal com quantidades conhecidas de ácido nicotínico, riboflavina, pantotenato de cálcio, piridoxina e colina.

Infelizmente, não nos foi possível adotar êstes tipos de dietas, por nos faltarem algumas das substâncias complementares.

Usamos, então, a dieta de Sherman e Chase, citada por Hawk, Oser e Summerson e que consta do seguinte:

Caseína (livre de tiamina)	18%
Amido	53%
Mistura salina	4%
Manteiga	8%
Óleo de fígado de bacalhau	2%
Levedo autoclavado	15%

A tiamina foi retirada da caseína por duas lavagens em álcool a 60% e finalmente uma com álcool a 95%, em tempos de contacto por nós prolongados, isto é, geralmente deixando-a em contacto com os álcoois por 1 ou 2 dias, depois de cada lavagem.

A mistura salina usada foi a de Osborne e Mendell.

O levedo em pó foi autoclavado durante 6 horas a 120°C e espalhado em camadas de não mais de 6 mm de profundidade e depois secado à temperatura de 45°C, conforme manda a técnica original.

Moura Campos demonstrou²², em experimentações biológicas, a presença de tiamina e piridoxina em amostras de nosso amido comercial, pois que ratos, quando submetidos à dieta livre de tiamina, mas contendo amostras de amido comercial, foram protegidos contra o aparecimento do beribéri e da dermatite pelagrosa.

Por esta razão, o amido comercial usado em nossa dieta foi também submetido à autoclavagem suficiente para destruir sua taxa tiamínica.

Esta dieta, assim como a água, foi fornecida *ad libitum*. No grupo testemunho aquela foi complementada com uma grama por cento de levedo em pó não autoclavado.

Grupos. — Ao dividir os animais nos respectivos grupos tivemos o cuidado de fazer uma distribuição homogênea, de maneira que cada grupo tivesse igual número de machos e de fêmeas, e as médias de pesos mais próximas possível. Assim conseguimos uma média de pesos dos grupos de 264 gramas, compreendida entre valores extremos de 261 a 269 gramas. Esse dado tem relativa importância, pois que estes pesos iniciais vão ser tomados como valor 100, e as variações subsequentes, como oscilações percentuais em torno deste ponto inicial de referência.

O grupo I, testemunho, foi constituído por 4 animais alimentados com a dieta basal, suplementada com levedo em pó não autoclavado, na razão de 1% do peso da dieta.

O grupo II, controle negativo, com 6 animais, recebeu tão somente a dieta basal. Quando apareceu o beribéri deixou-se que este evoluísse até levar o animal à morte, em crises características de polineurite.

O grupo III, controle positivo, constituído por 20 animais, recebeu a dieta basal. Este grupo foi redividido em dois sub-grupos, a saber: IIIa com 8 animais, nos quais as crises de beribéri foram prevenidas com uma injeção intramuscular de cloridrato de tiamina; IIIb com 12 animais, nos quais a prevenção da crise beribérica foi feita com uma injeção, também intramuscular, da substância em estudo, isto é, o iodo-bismutato de tiamina.

Substância de comparação. — Consistiu de soluções aquosas e de concentrações conhecidas de cloridrato de tiamina, por nós preparadas e controladas química e colorimetricamente.

Substância de prova. — Usamos para as nossas experimentações o iodo-bismutato de tiamina, sal este que, por nós preparado, foi controlado colorimetricamente uma série de vezes. Dada a constância dos resultados, que nos permitiu o conhecimento preciso do seu teor tiamínico, pudemos preparar diluições exatamente conhecidas. Pudemos outro tanto comprovar que, durante um período maior que um ano, o sal, quando em pó, manteve sua atividade tiamínica inalterada. Este sal foi suspenso em óleo de caroço de algodão para facilitar a homogeneidade da suspensão, uma vez que, em suspensão aquosa, a precipitação rápida dos grânulos de iodo-bismutato de tiamina dificultou a retirada de doses de igual concentração. O uso deste veículo oleoso poderia ser considerado uma causa provável de erro, embora se saiba que, de maneira geral, esta retenção mais duradoura, se existente, não se prolonga por mais de um ou dois dias. Entretanto, preocupados com a exatidão dos resultados, resolvemos comprovar este fato e afastar, assim, o fator "veículo".

Em dois grupos de ratos injetamos 2 mg de tiamina sob forma de iôdo-bismutato em veículo oleoso e veículo aquoso, respectivamente.

Conseguimos com êste ensaio demonstrar que não existe diferença quando o critério de observação for o mesmo, isto é, o uso do "dia" como unidade, afastando dêsse modo a possibilidade dessa causa de êrro.

Padronização das substâncias em estudo. — A quantidade relativa de tiamina dos dois sais foi verificada pelo método de Prebluda e McCollum usado por Tastaldi²³, o que nos permitiu trabalhar com quantidades equivalentes dos dois sais em relação ao teor tiamínico.

Fizemos a dissolução prévia do sal pesado de tiamina em piridina*, o que nos permitiu empregar, sem modificações, a técnica do método supracitado.

Dose. — Arnold e Elvehjem²⁴ acharam que, adicionando-se a 100 g de alimento 80-100 γ de tiamina, os ratos crescem normalmente; para muitas espécies de animais²⁵ a quantidade diária requerida de tiamina acha-se próxima a 1 γ por grama da dieta sólida. Hawk, Oser e Summerson²⁰ aconselham a complementar uma dieta sem o complexo B, com 40 γ de tiamina por rato e por dia.

Interessava-nos, sobretudo, uma taxa mais elevada, para ser dada de cada vez, por isto que queríamos curar os sintomas polineuríticos provocados pela dieta sem tiamina e, mais ainda, proteger os animais, por um certo espaço de tempo, de nova crise beribérica.

Injetamos na primeira vez, no início do que chamamos de período II de nossas experimentações, cloridrato de tiamina e iôdo-bismutato de tiamina em quantidades tais que cada dose de 1 cm³ correspondesse a 0,4 mg de tiamina.

A dose seguinte (período III) correspondeu, por cm³ injetado de cada preparado, a 1,2 mg de tiamina; as duas últimas doses, nos períodos IV e V, foram de 2,0 mg de tiamina cada uma, sempre por vez e por rato. Essas doses foram injetadas nos músculos das pernas posteriores, alternadamente e sempre em volume não superior a 1 cm³.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparativos. — Os animais foram registrados em fichas do modelo comum do Departamento, e todo e qualquer acidente ou sintoma aparecido foi nelas anotado.

Todos os animais foram pesados de 3 em 3 dias e seus pesos passados para os gráficos.

Os ratos foram mantidos em condições de igualdade absoluta. Kline, Friedman e Nelson²⁶ concluem em 1945 que "Maintenance of a uniform environmental temperature is essential for precision in performing the rat-curative essay for thiamine". A temperatura do biotério durante todo o ano foi mantida constante, pois que a variação máxima diária não ultrapassou de 1,5°C, enquanto que as médias das temperaturas máximas e mínimas foram, respectivamente, 23,8°C e 21,1°C.

* Sugestão do Prof. Derival da Fonseca Ribeiro, a quem agradecemos.

Desde os trabalhos de Fredericia e col.²⁷, Kon e Watchorn²⁸ em 1927-28, Kelly e Parson²⁹ em 1937, e outros, sabe-se da importância do fenômeno da refocação em ratos, quando se trabalha com vitamina B₁ e dieta glicídica por excelência. Atendendo a este fenômeno, os ratos foram colocados em gaiolas de chão telado, com malhas suficientemente grandes para permitir o afastamento imediato dos resíduos dos animais, evitando-se a coprofagia para, assim, alijar uma das possíveis causas de erro.

Recordando, então, podemos dizer que, para as nossas experiências, submetemos os animais a uma dieta carente de tiamina, e observamos a queda da curva ponderal, quando então injetamos as drogas que comparavamos para ver por quanto tempo estas mesmas drogas protegiam os animais de nova queda de peso. Estas medidas ponderais foram passadas em gráficos, de maneira que as oscilações das médias, para mais ou para menos, representavam variações percentuais em torno de uma base fixa, a média de pesos do dia zero da experiência, tomada como 100. Dadas as condições de experiência e, principalmente, dos animais nela empregados, pudemos prolongar o período experimental por prazo maior que 6 meses sem que isto comprometesse a sensibilidade do teste, como podemos observar pela regularidade das curvas, traduzida pela homogeneidade das respostas no que se refere tanto ao tempo de duração como à intensidade das mesmas.

No gráfico 1 podemos ver a evolução total da experiência e o comportamento dos diferentes grupos quando sujeitos às diversas doses das substâncias em estudo. A curva total foi dividida em quatro períodos distintos, para facilitar melhor a sua descrição.

O período I vai desde o dia zero até o 30.º dia de experiência, e compreende a fase de depleção de tiamina refletida pela queda de peso médio dos grupos II, IIIa e IIIb. O grupo I, testemunho, que recebeu na dieta carente uma complementação de levedo em pó não autoclavado, teve sua curva elevada progressivamente, e seu comportamento, durante todo o longo período experimental de 192 dias, nos permitiu confirmar a eficiência da dieta usada. A homogeneidade dos lotes pôde ser apreciada pelo início da queda de peso nos 3 lotes II, IIIa e IIIb (26 ratos), início este que se deu concomitantemente, nos três grupos, no 15.º dia de experiência.

O período II teve início quando a variação das médias dos lotes, em relação ao peso médio geral do dia zero de experiência considerado como 100, atingiu aproximadamente 80%. Estabelecemos em todos os períodos que o limite inferior mínimo das curvas dos lotes IIIa e IIIb não descesse abaixo de 80% do peso inicial, pois que, aquém deste limite já encontramos crises polineuríticas acentuadas e características, e cujas sequelas não nos permitiriam conservar o teste por um período longo e com a sensibilidade constante como a que tivemos durante todo o tempo de experiência. Neste período II, o grupo I, testemunho, continuou, como vemos no gráfico I, sua curva de ascensão. A curva do grupo II, controle negativo, isto é, o que continuou com a dieta carenciada, sofreu um descenso progressivo, apresentando seus componentes, a partir do 35.º dia, quando então já tinham 75% do peso inicial, sinais característicos da polineurite, sinais estes que, como já observaram muitos autores, não obedeceram a uma cronologia suficientemente regular para serem tomados como o ponto de referência de nossas experimentações. Neste período, 2 animais morreram em crises violentas de polineurite. Também este fato veio comprovar a eficiência da dieta no

que diz respeito à produção do beribéri típico, quando não suplementada com uma fonte de vitamina B₁.

Nos grupos IIIa e IIIb injetamos, no músculo, respectivamente, o cloridrato de tiamina e o iôdo-bismutato de tiamina em quantidades equivalentes e que corresponderam a 0,4 mg de tiamina por animal. A reação da curva não se fêz esperar e no dia subsequente à ministração de tiamina, quer sob forma de cloridrato de tiamina, quer sob forma de iôdo-bismutato de tiamina, já obtivemos uma ascensão correspondente a 3,1% e 4,1%, respectivamente. Daí por diante continuou a subida da curva, como consequência das substâncias injetadas, até o 39.º dia; quantidade equivalentes de tiamina promoveram um aumento constante de pêso durante 9 dias, após os quais as curvas ponderais começaram a cair de novo, isto é, não mais se fazia sentir o efeito específico das drogas injetadas que suplementaram a dieta carente. Como vemos, por êste período, as duas substâncias comportaram-se igualmente, pois que ambas conseguiram elevar a curva até o mesmo ponto (97,4% e 97,7%) e no mesmo tempo (9 dias). Por esta curva, então, não podemos tirar conclusões sôbre a maior ou menor durabilidade do efeito terapêutico de qualquer dos sais, senão, apenas, que ambos, nesta dose, comportaram-se anàlogamente.

Supusemos então que, talvez, o mecanismo de retenção e, portanto, a duração do efeito terapêutico nos animais de experiência, não fôsse suficientemente sensível a ponto de dar, com esta dose, uma diferença tal entre os dois sais, que pudesse ser medida em dias. Pensamos então em aumentar a dose dos mesmos e consequentemente da tiamina, e com isto acentuar a diferença que pudesse existir entre o tempo de ação de um e de outro sal. Assim o fizemos no período III. Quando a curva ponderal estava em franca descensão, injectamos, nos animais dos lotes IIIa e IIIb, respectivamente, cloridrato de tiamina e iôdo-bismutato de tiamina em quantidades que equivalessem a 1,2 mg de tiamina por dose e por animal (Gráfico 1, período III). As curvas ponderais elevaram-se de novo e obtivemos para o cloridrato de tiamina um período de ascensão que durou 10 dias, enquanto que, para o iôdo-bismutato de tiamina, prolongou-se por 16 dias, isto é, um tempo de proteção maior que o do cloridrato de tiamina, com uma diferença para mais de 6 dias, isto é, 60% maior. O grupo I, testemunho, continuou tendo uma curva ascendente e durante todo o tempo de experiência esta manteve-se alta. A curva ponderal do grupo II, contrôle negativo, continuou baixa e mais 2 animais morreram em crises polineuríticas, enquanto que os restantes continuaram com os sintomas do beribéri crônico.

Pela mesma razão já referida, resolvemos aumentar ainda mais a dose de tiamina a ser injectada sob forma dos dois sais em estudo. Iniciamos assim no 87.º dia de experiência o período IV de nossas observações. Neste, usando a mesma via de inoculação e as mesmas drogas para os mesmos grupos de animais, injectamos quantidades dos sais que, em pêso, equivalessem, cada uma, a 2,0 mg de tiamina (Gráfico 1, período IV). Os animais reagiram também rapidamente à ministração de tiamina e então, com dose aumentada desta, pudemos colocar em evidência indiscutível as diferenças de ação entre os dois sais, assim: o grupo IIIa, que recebeu a tiamina sob forma de cloridrato, apresentou uma curva de imediata ascensão, refletindo a rápida absorção da vitamina sob esta forma. Esta ascensão atingiu o máximo no 99.º dia de experiência, isto é, 12 dias após a injeção intramuscular de cloridrato de tiamina. Após êste dia a curva ponderal caiu rapidamente.

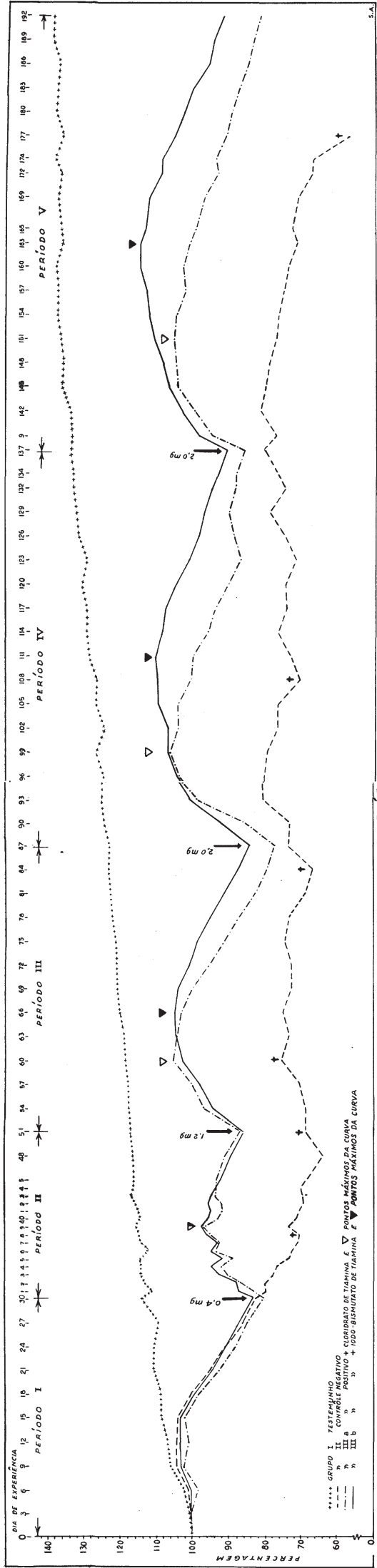


GRAFICO 1

No grupo IIIb outro tipo de curva ponderal ficou agora bem evidenciado, pois a curva apresentou uma ascensão mais lenta, porém mais persistente, o que indicaria um aproveitamento mais lento do iodo-bismutato de tiamina, uma eliminação mais demorada e portanto maior período de ação terapêutica, uma vez que, como já tínhamos provado em trabalho anterior¹⁰ e o confirmamos agora, esta ação fica conservada quando unimos a tiamina ao radical pesado em estudo.

Como vemos no gráfico 1, período IV, a curva ponderal do grupo IIIb tem o seu ápice deslocado para o 111.º dia de experimentação, o que nos dá, neste caso, um tempo de ação da tiamina, sob forma de iodo-bismutato, exatamente duplo daquele quando sob a forma de cloridrato de tiamina.

Em outras palavras, o iodo-bismutato de tiamina, quando injectado intramuscularmente e em pêso que corresponde a 2,0 mg de tiamina por animal e por vez, protegeu um lote de ratos por mais 12 dias do que o fez o cloridrato de tiamina quando injectado também em ratos pela mesma via e com igual riqueza tiamínica.

Estando já evidenciado o fenômeno, quisemos ainda ver se mais uma vez obtínhamos os mesmos resultados dêste último período.

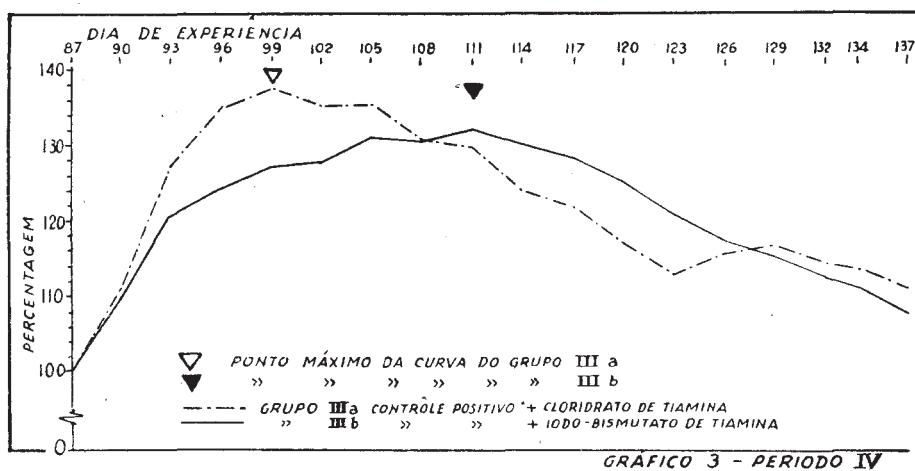
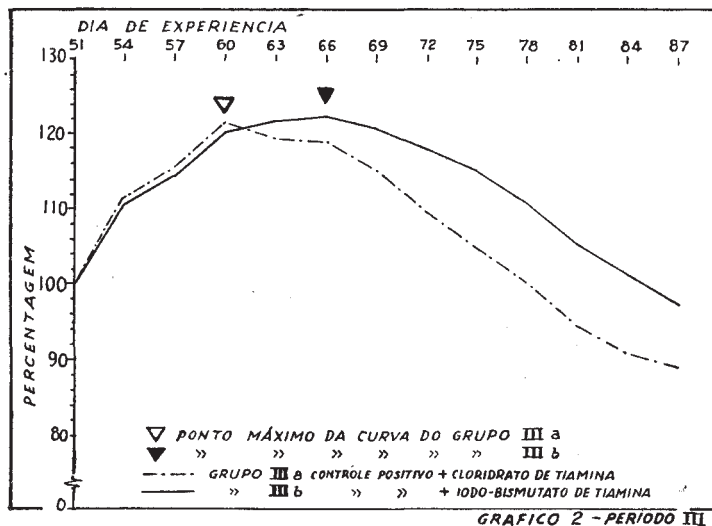
Quando a variação das médias dos lotes IIIa e IIIb, em relação ao pêso médio geral no dia zero da experiência, considerado como 100, aproximou-se dos 85%, nova dose dos mais foi injectada; e agora para perquirir da sensibilidade do material de experimentação propusemo-nos a repetir a mesma quantidade dos dois sais usados no período IV, isto é, cada dose correspondendo a 2,0 mg de tiamina por animal.

Nova ascensão obtivemos (Gráfico 1, período V) e o ápice da curva do pêso médio do lote IIIa localizou-se no 151.º dia da experiência, enquanto que para o lote IIIb esta curva continuou a ascensão até o 163.º dia de experiência. Portanto obtivemos a mesma diferença, de 12 dias, dos dois pontos máximos em favor do iodo-bismutato de tiamina, demonstrando assim que, de fato, a tiamina, quando ligada ao radical iodo-bismutato, tem sua ação prolongada, resultante provavelmente do maior tempo que o sal ficou retido no organismo.

Para melhor evidenciar o comportamento das duas curvas, relativas aos lotes IIIa e IIIb, nos períodos III, IV e V, fizemos, para cada período, duas séries de índices, tomando como base igual a 100, na primeira e na segunda série, o pêso médio dos ratos, respectivamente, do lote IIIa e IIIb, no dia inicial de cada período. (Gráficos: 2, 3 e 4).

Por outro lado, no gráfico 5 (período IV), fizemos uma translação da curva relativa ao lote IIIb, tal que o ponto representativo do pêso médio dos componentes dêste grupo no dia inicial dêsse período viesse a coincidir com o ponto representativo do pêso médio dos componentes do grupo IIIa nesse mesmo dia. O mesmo foi feito para o período V e apresentado no gráfico 6.

Definindo-se, por outro lado, no período V, a variável Z como igual a X—Y, em que X é igual ao pêso médio do grupo IIIb e Y é igual ao pêso médio do grupo IIIa no mesmo dia, acrescido da diferença da média do grupo IIIb em relação à do grupo IIIa no dia inicial dêsse período, projetamos no gráfico 7 os diferentes valores de Z.



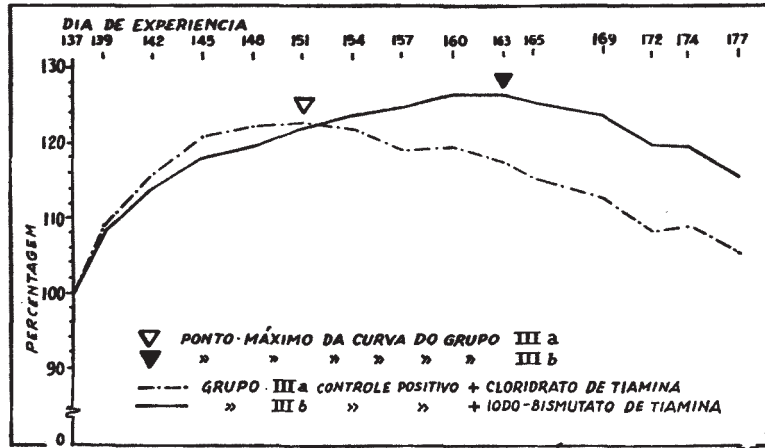


GRÁFICO 4 - PERÍODO V

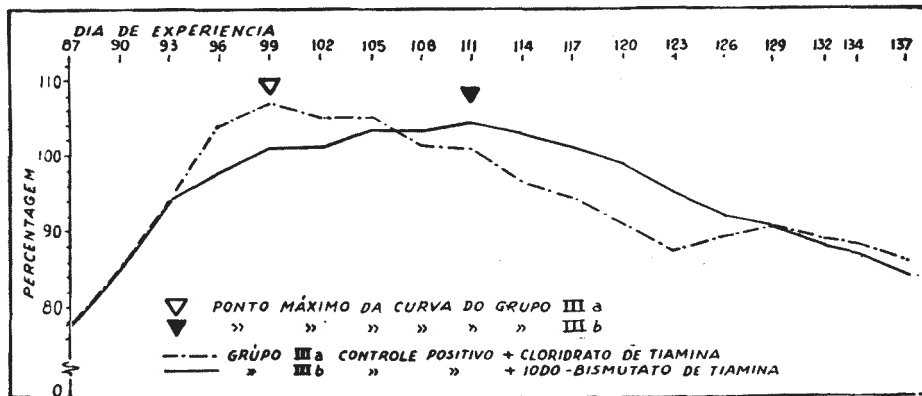
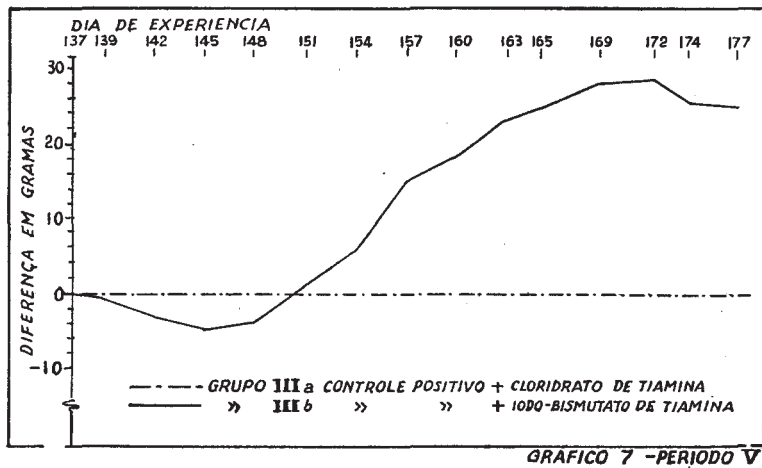
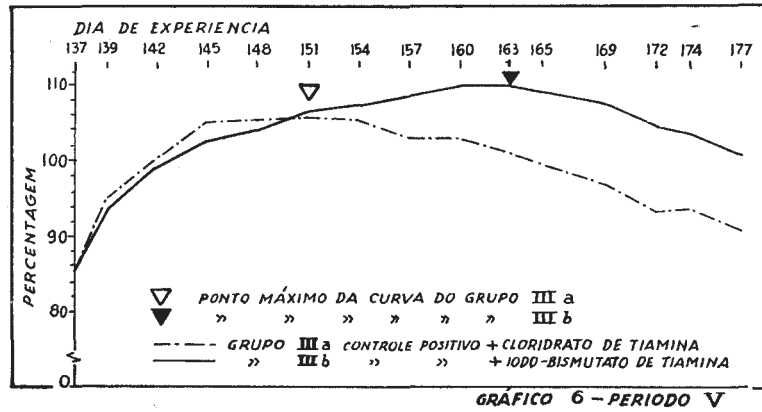


GRÁFICO 5 - PERÍODO IV



C O N C L U S Õ E S

O iôdo-bismutato de tiamina manteve em nossa experiência a ação específica característica da tiamina.

A duração do efeito terapêutico do iôdo-bismutato de tiamina foi em nossas experiências superior à do cloridrato de tiamina.

S U M Á R I O

Foram feitas experimentações em ratos, sôbre uma forma insolúvel de vitamina B₁ (iôdo-bismutato de tiamina), cuja ação terapêutica foi comparada à do cloridrato de tiamina.

A tiamina, sob forma de iôdo-bismutato, não perdeu o seu efeito terapêutico.

A duração do efeito terapêutico do iôdo-bismutato de tiamina foi superior à do cloridrato de tiamina.

As diferenças encontradas, e que foram constantes e proporcionais às doses, nos permitiram concluir que o iôdo-bismutato de tiamina tem, comparativamente ao cloridrato de tiamina, uma absorção mais lenta e um efeito terapêutico mais duradouro.

S U M M A R Y

Experiments were made on rats with an insoluble form of vitamin B₁ (iodo-bismuthate of thiamine) the therapeutic effect of which was compared with that of thiamine hydrochloride.

Thiamine in this form did not lose its specific therapeutics effect.

The duration of the therapeutic effect of iodo-bismuthate of thiamine was longer than that of the thiamine hydrochloride.

The differences found were constant and proportional to the doses and allow us to conclude that the iodo-bismuthate of thiamine has, comparatively to the thiamine hydrochloride, a slower absorption rate and a longer therapeutic effect.

B I B L I O G R A F I A

- 1 — Funk, C.: J. Physiol., 45:75 (1912).
- 2 — Jansen, B. C. P. e Donath, W. F.: Mededeel. Dienst. Volksgezondheid Nederland-Indie, 1926 (Pt. 1), 186; Chem. Weekblad, 23:201 (1926), Koninkl. Akad. Wetenschappen Amsterdam, Wisk. Naturk Afd., 35:923 (1926).
- 3 — Windaws, A., Tschesche, R., Ruhkof, H., Laquer, F., e Schultz, F.: J. Physiol. Chem., 204, 123 (1932); Nachr. Ges. Wiss. Göttingen., Mathphysik. Klasse, 1932, 207, 342.
- 4 — Cline, J. K., Williams, R. R., and Finkelstein, J.: J. Am. Chem. Soc., 59:1052 (1937).
- 5 — Lohmann e Schuster: Naturwissenschaften, 25:26 (1937).
- 6 — Tauber, H.: Science, 86:180 (1937).
- 7 — Euler & Vestin: Naturwissenschaften, 25:416.
- 8 — Stern, K. G., & Hofer, J. W.: Science, 85:483-484 (maio, 14) 1937.

- 9 — Wachsmuth, H.: Some crystalline double compounds of vitamin B1 and iodine. *Naturwissenschaften, Tijdschr.*, 25:186-192 (1943); *Chem. Zentr.* II, 1930 (1943).
- 10 — Gandra, Y. R.: Estudos comparativos preliminares sobre a ação do cloridrato de tiamina (hidrossolúvel) e do iodo-bismutato de tiamina (insolúvel em água). *Arq. Fac. Hig. S. Publ. Univ. S. Paulo*, 1:281-286 (dezembro) 1947.
- 11 — Lorenzini, G. et al.: Vitaminas e síndromes de avitaminoses. Trad. do italiano. Livraria Humberto Chiggine, S. Paulo, 1944.
- 12 — Moura Campos, C. de, Moura Campos, F. A. & Maffei, W. E.: Avitaminose B experimental. *An. Fac. de Med. da Univ. S. Paulo*, 11:9-26, 1935.
- 13 — Chase, E. L., citado por Sherman, H. C. and Smith, S. L.: *The Vitamins*. 2nd. ed., New York, The Chemical Catalog Co. Inc., 1931.
- 14 — *Methods of Analysis of the A.O.A.C.* 6th., Washington, 1945.
- 15 — Moura Campos, F. A. de: A presença do complexo vitamínico B na raiz tuberosa da mandioca. (Nota prévia). *An. Fac. de Med. da Univ. S. Paulo*, 11:27-31, 1935.
- 16 — Oliveira, J. D. de: Síndrome beribérico e avitaminose B experimental. *O Hospital*, 8:1-14 (janeiro) 1936.
- 17 — Moura Campos, F. A. de: A mandioca cozida e a batata doce estudadas em relação ao complexo vitamínico B. *Folia clinica et biologica*, 9:108-112, 1937.
- 18 — Oliveira, J. D. de, & Pimenta, N.: Avitaminose B. Influencia therapeutica da vitamina B. *O Hospital*, 12:1401-1406 (dezembro) 1936.
- 19 — Moura Campos, F. A. de: Complexo vitamínico B na mandioca. Valor da prova do nystagmo no diagnóstico da avitaminose B. *An. Fac. de Med. da Univ. São Paulo*, 13:33-53, 1937.
- 20 — Hawk, P. B., Oser, B. L., & Summerson, W. H.: *Practical Physiological Chemistry*, 12th. ed., 1947.
- 21 — Miller, E. C., & Baumann, C. A.: The maintenance of adult rats on diets low in certain B vitamins. *J. Nutrition*, 27:319-328, 1944.
- 22 — Moura Campos, F. A. de: A presença das vitaminas B1 e B6 em amostras de amido comercial. *Brasil Médico*, 60:125-134 (abril, 20 e 27) 1946.
- 23 — Tastaldi, H.: Determinação fotométrica da tiamina pela reação de Prebluda-Mac Collum. *O Hospital*, 23:545-551, 1943.
- 24 — Arnold, A., & Elvehjem, C. A.: Studies on the vitamin B1 requirements of growing rates. *J. Nutrition*, 15:429-443 (maio) 1938.
- 25 — Arnold, A., & Elvehjem, C. A.: Influence of the composition of diet on the thiamine requirement of dogs. *Amer. J. Physiol.*, 126:289-298 (junho) 1939.
- 26 — Kline, O. L., Friedman, L., & Nelson, E. M.: Effect of environmental temperature on thiamine requirement of rat. *J. Nutrition*, 29:35-42 (janeiro) 1945.
- 27 — Fredericia, L. S., Freudenthal, P., Gudjonsson, S., Johansen, G., & Schoubye, N.: Refection, a transmissible change in the intestinal content, enabling rats to grow and thriave without vitamin B in the food. *J. Hyg.*, 27:70-102 (novembro) 1927.
- 28 — Kon, S., & Watchorn, E.: Relation between the nature of the carbohydrate in the diet and refection in rats. *J. Hyg.*, 27:321-327 (março) 1928.
- 29 — Kelly, E., & Parsons, H. T.: Some quantitative studies on refection in the rat. *J. Nutrition*, 13:453-468 (maio) 1937.