

Ação inativante de corantes sobre a alexina ou complemento

F. Rocha Lagôa e J. Guerra Mercado (*)

A ação inativante que possuem alguns corantes sobre o complemento é conhecida desde os trabalhos de KLOPSTOCK, (7) em 1924, que a verificou em alguns corantes, como o azul noite, eosina e vermelho congo. Este autor considerou o fenômeno como uma adsorção do complemento pelo corante, dependente apenas do estado coloidal das substâncias reacionantes, tendo demonstrado ainda como esses corantes podem interferir no resultado de reações sorológicas como as de BORDET-WASSERMANN.

Igualmente, GORDON (4) constatou que o vermelho congo e outros corantes relacionados com ele, como o congo orange e congo brilhante g., inativavam o complemento e que o poder hemolítico do complemento assim inativado podia ser reativado pela adição de carvão, que adsorvia o corante, deixando em liberdade o complemento. Determinou, assim, que este fenômeno de inativação era puramente físico, e, como todo fenômeno desta natureza, não produz modificações fundamentais na estrutura das matérias reacionantes, sendo ainda reversível.

O mesmo autor, em 1931 (5), conclui que o vermelho congo também tem propriedades inibitórias sobre as hemolisinas do *Streptococcus hemoliticus* e do *Cl. welchii* e que este poder hemolítico pode ser reativado pela adição da sêda artificial de cupramônio, que adsorve o corante.

GORDON e WALKER, em 1945 (6), demonstraram que esta ação anti-complementar do vermelho Congo e de alguns corantes de sua série depende mais do tamanho molecular das substâncias reacionantes que de qualquer grupamento específico dentro da molécula.

Estes trabalhos focalizaram apenas alguns aspectos dos fatos verificados e foram realizados sempre com um número muito restrito de corantes, não estabelecendo quais as frações inativadas pelos corantes usados, com exceção do vermelho congo que inativa o terceiro componente, nem a possível importância das distintas séries químicas dos vários corantes sobre o fenômeno. Este fato nos levou a procurar a existência desta ação inativante

(*) Universidade de Cochabamba. Bolívia.

sobre o complemento entre um número maior de corantes solúveis na água, procurando verificar assim uma possível influência da estrutura química dos corantes sobre o fenômeno de inativação e, ao mesmo tempo, estudar, entre aqueles que demonstrassem possuir esta ação inativante, sobre qual fração do complemento elas a exercem.

MATERIAL E MÉTODOS

Os corantes empregados, 50 no total, todos solúveis na água, pertenciam a várias séries químicas e a diversos fabricantes.

Preparou-se estes corantes em solução a um por cento (1%) em água destilada. Foram filtrados e conservados fechados no refrigerador.

O complemento utilizado, na realização destes trabalhos, foi o de cobaia, sendo obtido de sôro e conservado sempre submerso em água gelada no refrigerador, até o momento de uso. Em nenhum caso, empregou-se complemento que ultrapassasse 24 horas de sua obtenção. Para inativação do complemento pelo corante, empregou-se sôro sempre puro, sem diluição.

Os glóbulos vermelhos empregados nas reações de hemolises, foram de carneiro, previamente lavados em água fisiológica e também conservados no refrigerador.

O sôro hemolítico usado possuía o título de 1:2000. Empregaram-se para cada reação, 10 unidades hemolíticas por ml. (diluição 1/200).

O sistema hemolítico foi preparado da seguinte forma: Empregou-se uma parte de suspensão de hemácias de carneiro lavadas, a 5 por cento em água fisiológica, para duas partes de sôro hemolítico diluído a 1 por 200 (10 unidades hemolíticas por ml.). Deixou-se permanecer a temperatura ambiente uma hora, a fim de sensibilizar os glóbulos.

Para a obtenção de complemento desprovido de frações conhecidas, utilizou-se complemento do qual retiraram-se previamente os componentes desejados, os termoestáveis terceiro (C3) ou quarto (C4) e os termolábeis (C1-C2). Para isto operou-se da seguinte forma:

A inativação do terceiro componente, foi obtida segundo a técnica recomendada por COSTA CRUZ e AZEVEDO PENNA (2) (3): emulsão de levedura preparada do produto comercial «Fermento Fleischmann» (Fleischmann's Yeast) em tabletes, 0,5 gr. desta levedura em 20 ml. de água fisiológica; banho-maria a 100 graus C., durante uma hora; centrifugação por cinco minutos; separar o líquido sobrenadante, lavar o resíduo em água fisiológica e tornar a centrifugar; repetir a operação até obter um líquido

sobrenadante claro, o que é conseguido geralmente ao cabo de três lavagens; desprezar este líquido; o depósito é finalmente emulsionado em 4 ml. de sôro frêsko de cobaia e colocado em banho-maria por duas horas à 37 graus C. Centrifuga-se e separa-se o líquido sobrenadante que é guardado no refrigerador. O aparecimento de qualquer acidez não influi no resultado. O complemento, assim tratado, nunca foi usado após as 24 horas de sua obtenção.

Para a inativação do quarto componente, foi empregada a técnica original recomendada por GORDON, WHITEHEAD e WORMALL (7): adiciona-se a cada um ml. de sôro frêsko de cobaia, 0,25 da solução de amoníaco (NH₄.OH) n/6,5; deixar permanecer a mistura em banho-maria, a 37 graus, pelo espaço de uma hora e 30 minutos e logo neutralizar cuidadosamente com ácido clorídrico n/10, ou seja adicionar \pm 1,5 ml. de HCl décimo normal a cada 4 ml. de sôro de cobaia. Conservar no refrigerador. O complemento assim inativado foi usado sempre dentro das 24 horas após sua obtenção.

Com estes dois métodos, obtivemos, sempre, resultados excelentes na destruição do terceiro e quarto componentes (C3 e C4).

Obteve-se a destruição das frações termolábeis, aquecendo o complemento a 56 graus, em banho-maria, pelo espaço de vinte minutos.

A inativação do complemento pelos corantes, utilizados no presente trabalho, se baseia na técnica empregada por GORDON e WALKER (6), com ligeiras modificações.

Para cada um ml. de sôro frêsko de cobaia, adicionaram-se as seguintes quantidades de corantes em solução a 1 por cento e recentemente preparados: 0,1 — 0,2 — 0,5 ml. Completou-se o volume a 2 ml. com água fisiológica. Estas misturas foram deixadas em banho-maria de 37 graus durante três horas e guardadas após no refrigerador. Estas misturas foram usadas sempre dentro de um espaço de tempo que não ultrapassou de 24 horas a sua inativação.

Para verificação da atividade anticomplementar dos corantes, se adotou o seguinte método :

De cada mistura do complemento e corante, incubadas por 3 horas a 37° C., tomou-se 0,2 ml. e juntou-se a ela 1,5 ml. do sistema hemolítico (glóbulos de carneiro sensibilizados com 10 unidades hemolíticas) completou-se o volume a 3 ml. com água fisiológica; misturou-se bem e incubou-se em banho-maria a 37° C. durante uma hora; fêz-se então a veri-

ficação da existência ou não de hemólise. Estas provas foram sempre acompanhadas com testemunhas:

a) Testemunha do complemento: 1,5 ml. do sistema hemolítico, mais 0,5 ml. do complemento à 1 por 20, mais 1 ml. de água fisiológica.

b) Testemunha do sistema hemolítico: 1,5 ml. de glóbulos de carneiro sensibilizados, mais 1,5 ml. de água fisiológica.

c) Testemunha do corante: 0,2 ml. de corante à um por cento (1%), mais 1,5 ml. do sistema hemolítico (glóbulos de carneiro sensibilizados com 10 unidades hemolíticas), mais 1,3 de água fisiológica.

Essas reações nos mostraram a existência ou não de poder inativante nos corantes estudados.

Após essas verificações, procederam-se a contraprovas com o complemento inativado pelos corantes, a fim de assim conhecer-se qual a fração do complemento achava-se afetada. Para essas verificações procedeu-se da seguinte forma:

Adicionou-se a cada 0,2 ml. de cada complemento previamente inativado pela ação do corante, 0,2 ml. de:

a) Complemento com o terceiro componente, mais as frações termolábeis (Sôro frêsko inativado pelo amoníaco.) (C1, C2 e C3 presentes, ausente C4).

b) Complemento com a 4.^a fração e frações termolábeis (sôro inativado pela levedura) (C1, C2 e C4 presentes, ausente C3).

c) Complemento somente com a 3.^a fração (sôro aquecido a 56° C. 20 minutos e inativado pelo amoníaco) (Presente C3, ausentes C1, C2 e C4).

d) Complemento somente com a 4.^a fração (sôro aquecido a 56° C. 20 minutos e inativado pela levedura) (C4 presente, ausentes C1, C2 e C3).

A cada uma destas misturas adicionou-se 1,5 ml. do sistema hemolítico e 1,5 ml. de água fisiológica. Levou-se ao banho-maria a 37° C. durante uma hora e após fêz-se a leitura.

Estas reações foram sempre acompanhadas com tubos testemunhas:

Testemunha a), testemunha do sistema hemolítico: 1,5 ml. de hemacias de carneiro sensibilizados mais 1,5 ml. de água fisiológica.

b) Testemunha do complemento: 1,5 ml. de hemacias de carneiro sensibilizados, mais 0,5 de complemento frêsko.

c) Testemunha do sôro inativado pelo amoníaco: 1,5 ml. de sistema hemolítico, mais 0,2 ml. do sôro inativado pelo amoníaco, mais 1,5 ml. de água fisiológica.

d) Testemunha do sôro inativado pela levedura: 1,5 ml. de sistema hemolítico, mais 0,2 ml. do sôro inativado pela levedura, mais 1,5 ml. de água fisiológica.

e) Testemunha do sôro inativado pelo amoníaco mais sôro inativado pela levedura: 1,5 ml. do sistema hemolítico, mais 0,2 ml. do sôro inativado pela levedura, mais 0,2 ml. do sôro inativado pelo amoníaco, mais 1,5 ml. de água fisiológica.

f) Testemunha do sôro inativado pelo aquecimento: 0,2 ml. de complemento frêsko inativado pelo calor a 56° C. 20 minutos, mais 1,5 ml. do sistema hemolítico, mais 1,5 ml. de água fisiológica.

RESULTADOS

O complemento (1 ml.), incubado durante três horas, a 37 graus, com diferentes quantidades de soluções de corantes: 0,1 — 0,2 — 0,5 ml., segundo a técnica previamente indicada, teve sua inativação comprovada, tomando-se 0,2 ml. de cada uma das misturas anteriores, e juntando-se-lhe o sistema hemolítico (glóbulos de carneiro sensibilizados pelo sôro hemolítico). Ao cabo de uma hora de banho-maria a 37° C., fêz-se a leitura de existência ou não de hemólise. Os detalhes dêste processo estão indicados no capítulo anterior. A ausência de hemólise indicou uma inibição complementar devida à sua inativação pelo corante.

Uma hemólise positiva, ao contrário, indica uma ausência do poder inativante para o complemento no corante, que então atua sobre o sistema hemolítico.

O quadro n.º 1 nos revela o poder inativante de todos os corantes empregados no presente trabalho. (Ver Quadro n.º I).

Neste quadro, vê-se que somente 11 dos corantes empregados revelaram possuir poder inativante sobre o complemento: ponceau, vermelho congo, violeta de metila, auramina, rosa bengala, eosina, verde verdadeiro, violeta Paris, azul de metila, pironima amarela e anilina azul.

Chama logo a atenção o fato de que todos êles tenham manifestado seu poder inativante na mesma quantidade: 0,5 ml. de diluição do corante à 1%.

Procuramos averiguar, então, qual a fração era a inativada por êsses corantes. Para êste fim, seguindo a técnica correspondente, já indicada no capítulo anterior, foram adicionadas aos sistemas de complemento inativado pelo corante porções de sôro frêsko com, somente, a primeira, se-

gunda, terceira e quarta frações do complemento. Juntando-se após a êstes sistemas glóbulos sensibilizados de carneiro, deduziu-se então, de uma hemólise negativa ou positiva, a ausência ou a presença das frações complementares, 1.^a, 2.^a, 3.^a e 4.^a, nos elementos examinados.

O quadro n.º 2 nos dá os resultados que pretendemos averiguar. Para inativar o complemento, empregamos sempre os corantes nas quantidades que seguramente o inativam, ou seja 0,5 ml. As provas foram sempre acompanhadas com tubos testemunhas, que nos garantiram a sua exatidão.

Segundo se pode deduzir da apreciação dêste quadro, existem corantes que por possuírem um fraco poder inativante, dão hemólises parciais, quando estão presentes as frações termolábeis (C1 e C2). São assim o ponceau e a auramina.

Caso interessante é o da rosa bengala, que verificamos possuir um poder inativante, demonstrado repetidas vêzes em várias reações, mas que, segundo o quadro anterior, pelos seus resultados de hemólise positiva, nos leva a crer que carece dêste poder inativante. É fato conhecido que o rosa bengala possui propriedades hemolíticas espontâneas, em presença da luz (ação hemolítica foto-dinâmica), fenômeno que se comprova colocando hemácias de carneiro em contato com a diluição do corante verificando-se então uma hemólise quase instantânea. O resultado obtido no quadro 1, nos mostra que esta propriedade hemolítica espontânea, desaparece quando se coloca o corante em presença do sôro frêsko. Provavelmente a adsorção do complemento sôbre o corante acarreta o desaparecimento de seu poder fotodinâmico.

Também é de importância assinalar o fato de que tôdas as contra-provas realizadas com o complemento aquecido a 56°, durante 20 minutos, foram mais nítidas, comprovando o fato de que o poder inativante dos corantes é um tanto interferido pela presença das frações termolábeis do complemento, fato aliás conhecido de que o C1 e C3, assim como o C2 e C4, possuem algumas ligações entre si.

Os resultados anotados no quadro anterior nos permitem tirar as seguintes conclusões:

O ponceau inativa a quarta fração termoestável do complemento (C4).

O vermelho congo inativa a 3.^a fração termoestável do complemento (C3).

O violeta de metila inativa a 3.^a fração termoestável do complemento (C3).

A auramina inativa a quarta fração (C4).

Com o rosa bengala, pelas propriedades hemolíticas que por si próprio possui, não se pôde determinar a fração que inativa.

A eosina inativa a 4.^a fração (C4).

O verde verdadeiro tem ação a 4.^a fração (C4).

A violeta paris inativa a 4.^a fração (C4).

O azul de metila inativa a 4.^a fração (C4).

A pironina amarela inativa ambas as frações termoestáveis C3 — C4, ou outra fração indispensável na ação da 3.^a e 4.^a.

A anilina azul, por último, inativa a 4.^a fração (C4).

Para melhor compreensão de qual fração do complemento sofre a inativação dos corantes, representamo-la em forma esquemática, no quadro III. Neste quadro, cada retângulo representa uma das frações do complemento. Os retângulos superiores representam os componentes do complemento ainda existentes depois da inativação pelos corantes; os inferiores, as diferentes frações que normalmente compõem o complemento, juntadas em cada uma das provas. Todos êles tendem a completar a série dos quatro componentes que normalmente possui o complemento. Se êle completar-se, haverá hemólise; caso contrário, não haverá.

COMENTÁRIOS

Vê-se, pois, do verificado que poucos são os corantes que revelaram possuir poder anticomplementar. Assim, dos 50 empregados, apenas 11 demonstraram possuir uma ação inativante do complemento, e dêles alguns o possuem fracamente.

O fato de que todos aqueles que atuaram sobre o complemento, inativando-o, o fizeram quando foram adicionados em uma concentração constante de 0,5 ml. (solução à um por cento), faz supor ser esta ação independente das peculiaridades químicas dêsses corantes dependendo mais das condições físicas em que se processa esta inativação. Êste fato vem reforçar o conceito de que êstes fenômenos não são combinações de natureza química, mas simplesmente fenômeno de natureza física, de adsorção, dependentes mais das condições de superfície, dos elementos um jôgo, e, por isso mesmo, reversíveis.

Por outro lado, ficou também demonstrado que esta ação é quase constante no que se refere à fração que êles inativam: a quarta fração termoresis-

tente, dando-se somente dois casos, o da violeta de metila e o vermelho congo, em que o inativado é o terceiro componente, e o da pironina amarela, que inativa ambas as frações termoestáveis C3 e C4. Com a rosa bengala, devido a seu poder hemolítico espontâneo, vimo-nos na impossibilidade de obter resultados claros, no referente à fração por ela inativada. Se a ação inativante dos corantes fôr de natureza puramente física, ter-se-á de admitir que não somente o 3.º componente (C3) é o susceptível de sofrer essas ações, mas que também o 4.º componente (C4) pode sofrê-la.

Verificou-se que, em certos casos, a presença dos elementos termolábeis interferem na inativação das frações termoestáveis. Isto pode-se eliminar, aquecendo previamente o soro em exame a 56° C. e destruindo-se assim os elementos termolábeis que o integram, obtém-se então, hemólises muito mais intensas.

Sob o ponto de vista da sua constituição química, as substâncias corantes que inativaram a alexina, possuem as mais diversas configurações estruturais, portanto, esta constituição não parece ter relação com esse poder anticomplementar.

A natureza das cargas elétricas e as curvas de absorção que possuem os corantes examinados, tampouco, se relacionam com esse poder.

RESUMO

Os autores estudaram a ação inativante de corantes sobre a alexina. Para isto, empregaram 50 corantes das diferentes séries químicas, chegando à conclusão que somente 11 deles possuem esta ação: o ponceau, vermelho congo, violeta de metila, auramina, eosina, rosa bengala, verde verdadeiro, violeta paris, azul de metila, pironina amarela e a anilina azul. Verificaram que eles inativam sempre em proporção constante: 0,5 ml. de uma solução à 1% e que esta ação parece ser independente das constantes físicas do corante (carga elétrica, peso molecular, absorção máxima no espectrômetro) e das peculiaridades intrínsecas de suas constituições químicas. Determinaram também que estes corantes inativaram em sua maioria o quarto componente termoestável (C4) da alexina, exceção feita do vermelho congo e da violeta de metila que inativavam o terceiro componente termoestável (C3). A pironina amarela revelou atuar sobre os 3.º e 4.º componentes (C3 e C4) ou sobre algum elemento indispensável a ação deles.

QUADRO N.º I

COMPLEMENTO (SORO FRESCO COBAIA)	CORANTE A 1%	ÁGUA FISIOLÓGICA	COMPLE- MENTO INATIVADO 3 HORAS PELO CORANTE	SISTEMA HE- MOLÍTICO 10 U.H. + 2,5% HEMÁCIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA	RESULTADO
	Pardo Bis- mark					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	+
	Ponceau					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	-
	Violeta metilo					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	-
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	-
	Vermelho Congo					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	-
	Auramina					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	-
	Safranina					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	+
	Rosa Ben- gala					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	-
	Azul água					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	+
	Azul algo- dão					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	+
	Cyanina (Alizarina)					
1 ml.....	0,1	0,9	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	+

Banho-Maria 37.º C. 3 horas

Banho-Maria 37.º C. 1 hora

QUADRO N.º 1

COMPLEMENTO (SORO FRESCO COBAIA)	CORANTE A 1%	ÁGUA FISIOLÓGICA		COMPLE- MENTO INATIVADO 3 HORAS PELO CORANTE	SISTEMA HE- MOLÍTICO 10 U.H. + 2,5% HEMÁCIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA	RESULTADO
	Eosina						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	—
	Azul de metileno						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,5	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,5	+
	Vermelho neutro						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Orange G.						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Tropaeolin						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Vermelho verdadeiro						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Verde verdadeiro						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	—
	Violeta de Cresyl						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Violeta de Genciana						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+

Banho-Maria 37.º C. 3 horas.

Banho-Maria 37.º C. 1 hora.

QUADRO N.º I

COMPLEMENTO (SORO FRESCO COBAIA)	CORANTE A 1%	ÁGUA FISIOLÓGICA		COMPLE- MENTO INATIVADO 3 HORAS PELO CORANTE	SISTEMA HE- MOLÍTICO 10 U.H. + 2,5% HEMACIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA	RESULTADO
	Tionina Pura						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Verde Ácido						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Verde Iódo						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Violeta Paris						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	-
	Azul Berlim (*)						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Azul de Cópia						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Azul de Metila						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	-
	Azul Nilo A.						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,1	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Azul Vitória						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+
	Amarelo Metanol						
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+

Banho-Maria 37.º C. 3 horas

Banho-Maria 37.º C. 1 hora

(*) Corante inorgânico: Fe3 (Fe Cy6) 2

QUADRO N.º I

COMPLEMENTO (SORO FRESCO COBAIA)	CORANTE A 1%	ÁGUA FISIOLÓGICA		COMPLE- MENTO INATIVADO 3 HORAS PELO CORANTE	SISTEMA HE- MOLÍTICO 10 U.H. + 2,5% HEMÁCIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA		RESULTADO
	Azul para- alizarina							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+
	Chinalizari- na							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+
	Croceína							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+
	Croceína M00							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+
	Fucsina Básica							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+
	Fucsina Ácida							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,5		+
	Pironina Amarela							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		—
	Prêto direto Benzo							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+
	Verde Vitória							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+

Banho-Maria 37.º C. 3 horas.

Banho-Maria 37.º C. 1 hora.

QUADRO N.º I

COMPLEMENTO (SORO FRESCO COBAIA)	CORANTE A 1%	ÁGUA FISIOLÓGICA		COMPLE- MENTO INATIVADO 3 HORAS PELO CORANTE	SISTEMA HE- MOLÍTICO 10 U.H.+2,5% HEMÁCIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA	RESULTADO	
	Anilina Violeta (Dália)							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+	
	Verde Guinea							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+	
	Azul Pyrrhol							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+	
	Anilina Azul							
1 ml.....	0,1	0,9	Banho-Maria 37.º C. 3 horas	0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	-	
	Azul de Thymol							
1 ml.....	0,1	0,9			0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8			0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,5	0,5			0,2	1,5	1,3	+
	Verde Brilhante							
1 ml.....	0,1	0,9			0,2	1,5	1,3	+
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+	
	Verde Malaquita.							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+	
	Rubi Pa- tente ácido)							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+	
	Azul de Parma							
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3	+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3	+	

Banho-Maria 37.º C. 1 hora

QUADRO N.º I

COMPLEMENTO (SORO FRESCO COBAIA)	CORANTE A 1%	ÁGUA FISIOLÓGICA		COMPLE- MENTO INATIVADO 3 HORAS PELO CORANTE	SISTEMA HE- MOLÍTICO 10 U.H. + 2,5% HEMÁCIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA		RESULTADO	
	Azul de azo								
1 ml.....	0,1	0,9	Banho-Maria 37.º C. 3 horas.	0,2	1,5	1,3	Banho-Maria 37.º C. 1 hora.	+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+	
	Verde Jânus								
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+	
1 ml.....	0,2	0,8		0,2	1,5	1,3		+	
1 ml.....	0,5	0,5		0,2	1,5	1,3		+	
	Azul Patente								
1 ml.....	0,1	0,9		0,2	1,5	1,3		+	
1 ml.....	0,2	0,8	0,2	1,5	1,3	+			
1 ml.....	0,5	0,5	0,2	1,5	1,3	+			

LEGENDA: — (+), Hemólise positiva
 (—), Ausência de hemólise

QUADRO N.º II

COMPLEMENTO INATIVADO POR 0,5 ml. DE CORANTE A 1%	COMPLEMENTO INATIVADO PELO LEVEDO FRAÇÃO DESTRUÍDA: C3	COMPLEMENTO INATIVADO PELO AMONIA FRAÇÃO DESTRUÍDA: C4	COMPLEMENTO INATIVADO A 56° + LEVEDO FRAÇÕES DESTRUÍDAS: C1, C2 e C3	COMPLEMENTO INATIVADO A 56° + AMONIA FRAÇÕES DESTRUÍDAS: C1, C2 e C4	SISTEMA HEMOLÍTICO 10 U.H. + 2,5% HEMACIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA	RESULTADO
Ponceau							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	++
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	—
Vermelho Congo							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	—
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	—
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	+++
Violeta Metila							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	—
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	—
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	+++
Auramina							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	++
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	—
Rosa Bengala							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	+++
Eosina							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	—
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	—
Verde Verdadeiro							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	—
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	—
Violeta Paris							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	+
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	—
Azul de Metila							
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3	—
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3	+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3	—

Banho-maria 37° C. 1 hora.

COMPLEMENTO INATIVADO POR 0,5 ml. DE CORANTE A 1%	COMPLEMENTO INATIVADO PELO LEVEDO FRAÇÃO DESTRUÍDA: C3	COMPLEMENTO INATIVADO PELO AMÔNIA FRAÇÃO DESTRUÍDA: C4	COMPLEMENTO INATIVADO A 56° + LEVE FRAÇÕES DESTRUÍDAS: C1, C2 e C3	COMPLEMENTO INATIVADO A 56° + AMO NÍACO FRAÇÕES DESTRUÍDAS: C1, C2 e C4	SISTEMA HEMOLÍTICO 10 U.H. + 2,5% HEMACIAS	ÁGUA FISIOLÓGICA		RESULTADO
Pironina Amarela								
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3		—
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3		—
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3		—
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3		—
Anilina Azul								
0,2	0,2	—	—	—	1,5	1,3	Banho-maria 37° C. 1 hora.	+++
0,2	—	0,2	—	—	1,5	1,3		+
0,2	—	—	0,2	—	1,5	1,3		+++
0,2	—	—	—	0,2	1,5	1,3		—

Convenções: (—) Ausência de hemólise
 (+) Traços de hemólise
 (++) Hemólise parcial
 (+++) Hemólise total.

SUMMARY

The authors studied the inactivating action of dyes on alexin. To do this research they used 50 dyes of the different chemical series, and arrived at the conclusion that only 11 of these dyes have that action: the ponceau, Congo red, methyl violet, auramin, eosin, Bèngal rose, 'ecth'green, Paris violet, methyl blue, pironin yellowish and blue anilin. It was verified that they always inactivate in constant proportion: 0,5 ml. of a solution at 1% and that this action seems to be independent of the physical constants of the dye (electric charge, molecular weight, maximum absorption in the espectrumeter) and the intrinsic peculiarities of their chemical constitutions. The authors also verified that these dyes in their majority inactivated the fourth component termo-stable (C4) of the alexin, with exception of the Congo red and the methyl violet which inactivated the third component termo-estable (C3). The pironin yellowish showed to act on the 3rd and 4th components (C3 and C4) or over any indispensable element to their action.

QUADRO N.º III

COMPLEMENTO

Frações termolábeis		Frações termoestáveis	
C1	C2	C3	C4
globulina	albumina	destruída pela levedura	destruída pela amônia

Ponceau

C1	C2	C3
----	----	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Vermelho Congo

C1	C2		C4
----	----	--	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Violeta de Metila

C1	C2		C4
----	----	--	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Auramina

C1	C2	C3
----	----	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Eosina

C1	C2	3
----	----	---

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C C4
----	----	----	------

Complemento normal.

QUADRO N.º III

Verde Verdadeiro

C1	C2	C3
----	----	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Violeta Paris

C1	C2	C3
----	----	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Azul de Metila

C1	C2	C3
----	----	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Pironina Amarela

C1	C2
----	----

Complemento após a ação do do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

Anilina Azul

C1	C2	C3
----	----	----

Complemento após a ação do corante.

C1	C2	C3	C4
----	----	----	----

Complemento normal.

BIBLIOGRAFIA

1. CONH, H. J. e col.
1936. Biological Stains.
Third Edition. Humprey Press. — N. Y.
2. COSTA CRUZ, J. e H. DE AZEVEDO PENNA.
1932. Ação do formol sobre a alexina de cobayo.
—
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 26 : 85-97.
3. COSTA CRUZ e AZEVEDO PENN.
1932. Constituição da alexina e mecanismo da hemólise específica.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 26 : 99-149.
4. GORDON, J.
1930. The action of certain dyes on the bactericidal activity of normal serum
and on Haemolytic complement.
J. Path. Bact. 33 : 47-55.
5. GORDON, J.
1931. The action of Congo Red on streptococcal haemolysin and on B. Welchii
haemolysin.
J. Path. Bact. 34 : 439-445.
6. GORDON, J. e WALKER, N.
1945. Features in the Congo red molecule associated with the inactivation of com-
plement.
J. Path. Bact. 57 : 451-456.
7. GORDON e WITEHEAD e WORWALL, A.
1926. The action of ammonium on complement The fourth component.
Biochem. J. 20 : 1.029-1.035.
8. KLOPSTOCK.
1924. Komplement adsorption durch Farbstoffe.
Bioch. Zeitschrift, Berlin. 331-338.
9. OSBORN, T. W. B.
1937. Complement or Alexin.
Oxford University Press. London.
10. SEYEWETZ e SISLEY.
1896. Chimie des Matières Colorantes artificielles. G. Mason Editeur. Paris.
11. SCHULTZ, G.
1931. Farbstofftabellen.
Band I, II. Akademische Verlagsgesellschaft. 7 Auflage. Leipzig.