ISSN 0073 – 9901
MIBUAH

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO, SP – BRASIL

Memórias do Instituto Butantan

vol. 47/48 — 1983/1984

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria dos Serviços Técnicos Especializados
Instituto Butantan, SP — Brasil

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

v. 47/48
1983/1984

DIRETOR DO INSTITUTO BUTANTAN
Willy Beçak

COMISSÃO EDITORIAL
PRESIDENTE — Henrique Moisés Canter
MEMBROS — Adolpho Brunner Júnior
Raymond Zelnik
Saul Schenberg
Sylvia Lucas

BIBLIOTECÁRIAS — Denise Maria Mariotti
Ruth Ishimoto

SÃO PAULO, SP — BRASIL
1986

Endereço/Address

Biblioteca do Instituto Butantan
Av. Vital Brazil, 1500
Caixa Postal 65
05504 — São Paulo, SP — Brasil

Publicação anual/Annual publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN. (Secretaria de Estado da Saúde) São Paulo, SP — Brasil, 1918-

1918-1983/84, *1-47/48*

ISSN 0073-9901
MIBUAH

CDD 614.07205

Mem. Inst. Butantan
47/48, 1983/84

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. *FINALIDADE*

As MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN são publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores. Têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos da Biologia e da Medicina, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros que se enquadrem no Regulamento dos Trabalhos.

2. *REGULAMENTO DOS TRABALHOS*

2.1 *Normas gerais*

2.1.1 Os trabalhos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à revista "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN".

Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.

2.1.2 *Estrutura do trabalho*

2.1.2.1 *Elementos preliminares*

a) cabeçalho — título do trabalho e nome do(s) autor(es);
b) filiação científica e endereço para correspondência.

2.1.2.2 *Texto*

Sempre que possível deve obedecer à forma convencional do artigo científico:

a) Introdução — Estabelecer com clareza o objetivo do trabalho relacionando-o com outros do mesmo campo e apresentando de forma sucinta a situação em que se encontra o problema investigado. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

b) Material e métodos — A descrição dos métodos usados deve limitar-se ao suficiente para possibilitar ao leitor a perfeita compreensão e repetição dos métodos; as técnicas já descritas em outros trabalhos devem ser referidas somente por citação, a menos que tenham sido consideravelmente modificadas.

c) Resultados — Devem ser apresentados com clareza e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado.

d) Discussão — Deve restringir-se à apresentação dos dados obtidos e dos resultados alcançados, relacionando-se novas contribuições aos conhecimentos anteriores. Evitar hipóteses ou generalizações não baseadas nos resultados do trabalho.

e) Conclusões — Devem ser fundamentadas no texto.

Dependendo do assunto do artigo, as divisões acima poderão ser modificadas de acordo com o esquema do trabalho, porém o artigo deve conter obrigatoriamente:

— Introdução;
— Desenvolvimento do tema (com as divisões a critério do autor);
— Conclusão.

2.1.2.3 *Agradecimentos*

Devem ser mencionados antes das referências bibliográficas.

2.1.2.4 *Material de Referência*

Todo trabalho deve vir obrigatoriamente acompanhado de:

a) Resumos — Um no mesmo idioma do texto, outro em inglês, redigidos pelo(s) próprio(s) autor(es), devendo expressar o conteúdo do artigo, salientando os elementos novos e indicando sua importância. O resumo na língua em que está redigido o trabalho deve ser colocado antes do texto e o em inglês, no final. Só excepcionalmente excederá a 200 palavras. Os títulos dos trabalhos devem ser traduzidos para o inglês e vice-versa.

b) Palavras-chave — Correspondendo a palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo, devem ser em número necessário para a completa descrição do assunto e assinaladas com asteriscos (*) as 3 palavras-chave principais. Para escolha das palavras-chave usar o vocabulário protótipo do campo especializado.

c) Referências bibliográficas — Devem ser incluídas no texto e arranjadas em ordem alfabética do sobrenome do autor, numeradas consecutivamente.
Periódico:

MACHADO, J. C. & SILVEIRA F.º, J. F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:1-9, 1976/77.

Livro:

BIER, O. *Bacteriologia e imunologia.* 18 ed. São Paulo, Melhoramentos, 1977.

As citações no texto devem ser em números-índice correspondendo às respectivas referências bibliográficas.

Exemplos:

As investigações sobre a fauna flebotomínica no Estado de São Paulo foram feitas em várias ocasiões 1, 3, 4,..... método derivado de simplificação de armadilha de Disney [2] (1968)...

Referências bibliográficas (correspondentes aos números-índice).

1. BARRETO, M.P. *Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo* (Diptera, Psychodidae). São Paulo, 1943 (Tese — Doutoramento — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

2. DISNEY, R. H. L. Observations on a zoonosis: leishmaniosis in British Honduras, *J. app. Ecol., 5*:1-19, 1968.

3. FORATTINI, O. P. Algumas observações sobre a biologia dos Flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 8*:15-136, 1954.

3. *NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS*

3.1 *Datilografia*

Os originais devem ser datilografados em 3 (três) vias, com espaço duplo, em uma só face, mantendo as margens laterais com aproximadamente 3 cm. Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, no canto superior direito.

3.2 *Tabelas*

Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo seu título. Os dados apresentados em tabelas não devem ser, em geral, repetidos em gráficos. As notas de rodapé das tabelas devem ser restritas ao máximo possível e referidas por asteriscos.

3.3 *Ilustrações*

3.3.1 *Desenhos e gráficos*

3.3.1.1 Devem ser feitos com tinta nanquim preta, em papel Schoeller Hammer 3G e 4G. Não usar papel vegetal porque este retrai com o calor e abranda com o frio, e o nanquim tende a ficar mais falhado, devido à porosidade do papel vegetal. Na impressão as ilustrações tendem a ter ligeira deformidade e traços levemente acinzentados, sobretudo os gráficos saem totalmente fora de esquadro.

3.3.1.2 O tamanho, quando ocupar página inteira, deve seguir rigorosamente estas medidas 12,6 x 19,8 cm ou 16,8 x 26,3 cm ou 21 x 33 cm ou 25,2 x 39,6 cm, pois em geral as gráficas com as quais nós trabalhamos, têm um determinado tamanho de letra e as ilustrações precisam ser proporcionais a estes tamanhos existentes. Para uma boa reprodução, não precisa ser maior, pois sendo maior perde muitos detalhes na redução.

3.3.1.3 Aplicar cola no verso do desenho ou do gráfico só na margem superior, numa faixa de aproximadamente 1 cm e colar sobre um cartão um pouco maior.

3.3.1.4 Para melhor proteção, cobrir com papel vegetal de comprimento um pouco maior, de maneira a poder ser dobrado para trás na parte superior e colado.

3.3.2 *Fotografias*

3.3.2.1 Devem ser bem nítidas e contrastadas, pois fotos muito acinzentadas dão péssima impressão.

3.3.2.2 Devem vir soltas dentro de um envelope.

3.3.2.3 Devem ser entregues inteiras e não recortadas, em papel fotográfico liso. O papel fotográfico crespo (martelado) dá péssima reprodução.

3.3.2.4 O tamanho é muito importante. Uma foto para ganhar mais qualidade na impressão necessita sempre sofrer redução. Portanto, mandem fotos sempre de tamanho maior do que o que vai ser impresso. Ex.: para página inteira fotos 18 x 24 cm, para meia página fotos 18 x 12 cm.

3.3.2.5 Colocar um papel vegetal em cima da foto que tiver qualquer anotação a ser feita, ou simplesmente para limitar a parte importante a ser usada. Tomar muito cuidado para não pressionar o lápis ou caneta, a fim de não marcar a foto. Não colocar letras ou números sobres as fotos.

3.3.3 Os textos e números que completam os desenhos, gráficos e fotos devem ser feitos em manuscrito legível ou datilografado (os algarismos sempre em arábicos) direto sobre o papel vegetal que foi colocado para proteção (não pressionar a fim de não marcar as ilustrações) ou em papel branco e colocado no papel vegetal, pois os textos e números serão feitos em tipos gráficos.

3.3.4 A numeração dos desenhos, gráficos e fotos será feita com algarismos arábicos na parte inferior do papel vegetal, não importando se é foto, desenho ou gráfico. Seguir sempre com uma numeração só. Ex.: Um trabalho que tenha 2 fotos, 1 gráfico e 1 desenho segue com a numeração (fig.), (fig. 2), (fig. 3), e (fig. 4), se as 2 fotos vão numa página só, colocar na parte inferior (figs. 1 e 2) e determinar em cima da foto (no papel vegetal) qual é (fig. 1) e qual é (fig. 2). Quanto aos demais elementos necessários à identificação das ilustrações (nome do autor e título do trabalho) devem ser escritos atrás do cartão em que as mesmas estiverem colocadas.

3.3.5 As legendas devem ser apresentadas à parte em folhas datilografadas, constando a numeração correspondente à ilustração. Ex.: Fig. 1 — Legenda.

A Revista admite até 6 clichês (branco e preto) no texto, para cada trabalho, devendo os demais serem pagos pelo autor. Para clichês coloridos deverá haver prévia combinação entre a Comissão Editorial e o autor.

De cada trabalho serão impressas 50 (cinqüenta) separatas, devendo o autor pagar as separatas que excedam a esse número, quando solicitar uma quantidade maior. As separatas em excesso devem ser solicitadas quando o manuscrito for encaminhado à Comissão Editorial.

Os trabalhos poderão ser redigidos, além da língua portuguesa, em inglês, francês e espanhol. Outras línguas ficarão a critério da Comissão Editorial.

A reprodução total ou parcial dos trabalhos em outros periódicos — com menção obrigatória da fonte — dependerá de autorização prévia da Comissão Editorial.

Para fins comerciais serão proibidas a tradução e a reprodução dos trabalhos publicados pela revista.

Mem. Inst. Butantan
47/48, 1983/84

SUMÁRIO/SUMMARY

HOMENAGEM PÓSTUMA/POSTHUMOUS HOMAGE

Rosa Pavone Pimont (1930-1983) 1-2

Wolfgang Bücherl (1911-1985) 3-4

ARTIGOS ORIGINAIS/ORIGINAL ARTICLES

1. O gênero *Rachias* Simon, 1892, Araneae, Ctenizidae, Nemesieae.

The genus *Rachias* Simon, 1892, Araneae, Ctenizidae, Nemesieae.

Sylvia LUCAS; Irene KNYSAK & Livia ZVEIBIL 5-11

2. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral' *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular.

Presgnaptic and postsynaptic action of the venom of the coral snake *Micrurus corallinus* at the neuromuscular junction.

Oswaldo Vital BRAZIL & Marcos Dias FONTANA 13-26

3 Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Phoneutria nigriventer* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno em camundongos.

Evaluation of the toxic activity of *Phoneutria nigriventer's* venom in terms of DL_{50} and titration of the antivenom in mice.

Regina Maria Barretto CICARELLI; Medardo SILES VILLAR-ROEL & Raymundo ROLIM ROSA 27-32

4. Estudo imunoquímico dos venenos aranêicos das espécies *Loxosceles gaucho, Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha.*

Immunochemistry study of spider venoms of species *Loxosceles gaucho, Phoneutria nigriventer* and *Lycosa erythrognatha.*

Regina Maria Barretto CICARELLI; Medardo SILES VILLAR-ROEL; Rosalvo GUIDOLIN & Omar CRIVELLARO 33-43

5. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno específico em camundongos.

Evaluation of the toxic activity of *Loxosceles gaucho's* venom in terms of DL_{50} and titration of the specific antivenom in mice.

Regina Maria Barretto CICARELLI; Medardo SILES VILLAR-ROEL & Flávio ZELANTE 45-53

6. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Lycosa erythrognatha* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno em camundongos.

Evaluation of the toxic activity of *Lycosa erythrognatha's* venom in terms of DL_{50} and titration of the antivenom in mice.

Regina Maria Barretto CICARELLI; Medardo SILES VILLAR-ROEL & Sylvia LUCAS 55-60

7. *Henneguya pisciforme* n. sp., mixosporídeos parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae).

Henneguya pisciforme n. sp., myxosporidians parasite from the gill of freshwater fish, *Hyphessobrycon anisitsi* (Pices, Characidae).

Nelson da Silva CORDEIRO; Paulo de Toledo ARTIGAS; Ismael GIÓIA & Rosana Souza LIMA 61-69

8. *Apostolepis dimidiata* (Jan, 1862), nova combinação, e a validade de *A. erythronota* (Peters, 1880) e *A. ventrimaculata* Lema, 1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae).

Apostolepis dimidiata (Jan, 1862) a new combination, and the validity of *A. erythronota* (Peters, 1880) and *A. ventrimaculata* Lema,

1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae).
Thales de LEMA 71-80

9. Produção de Vacina Pertussis por diferentes processos. Níveis de proteção e aspectos econômicos.
Production of Pertussis Vaccine by different processes. Protection levels and economical aspects.
Maria Ivette Carboni MALUCELLI & João Pessoa de Paula CARVALHO 81-94

10. Ultrastructural changes in neuromuscular junction of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*.
Alterações ultraestruturais na junção neuromuscular do diafragma de camundongo provocadas pela peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus*.
Maria Alice da Cruz HOFLING; Lea RODRIGUES-SIMIONI & Oswaldo Vital BRAZIL 95-105

11. Nematóides de Passalidae (Coleoptera). Descrição de *Klossnema repentina* n. gên., n. sp. (Nematoda: Hystrignathidae).
Nematode of Passalidae (Coleoptera). Description of *Klossnema repentina* n. gên., n. sp. (Nematoda: Hystrignathidae).
Nelson da Silva CORDEIRO & Paulo de Toledo ARTIGAS 107-111

12. Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro.
Infectious ulcerative stomatitis in *Boa constrictor constrictor* maintened in captivity.
Hideyo IIZUKA; Henrique Moisés CANTER; Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA; Hisako Gondo HIGASHI & Raymundo ROLIM ROSA 113-120

13. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. Clinical report of human envenomation by *Philodryas olfersii*.
Marcos Vinicius da SILVA & Marcus Augusto BUONONATO ... 121-126

14. Loxoscelismo: relato de um acidente humano atribuído a *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Scytodidae, Loxoscelinae).
Loxoscelism: report of a human accident atributed to *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Scytodidae, Loxoscelinae).
Sylvia LUCAS; João Luiz CARDOSO & Angelina Cirelli MORAES 127-131

15. Escorpionismo por *Tityus stigmurus* no Nordeste do Brasil (Scorpiones; Buthidae).
Scorpionism in the northeastern region of Brazil by *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae).
Vera Regina D. von EICKSTEDT 133-137

16. A ocorrência de ácido ursólico em *Citharexylum myrianthum* (Verbenaceae).
The occurrence of ursolic acid in *Citharexylum myrianthum* (Verbenaceae).
Amabile K. MATIDA; Ema RABENHORST & Raymond ZELNIK 139-142

17. Ectoparasitismo em serpentes: observações gerais e algumas considerações sobre o gênero *Ixobioides* Fonseca, 1934 (Acarina).
Snakes ectoparasitisms: general observations and considerations about the genus *Ixobioides* Fonseca, 1934 (Acarina).
Nélida M. LIZASO 143-155

18. Bionomia comparativa de Triatomíneos. II — *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae).
Comparative bionomy of Triatominae. II — *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae).
Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE 157-164

19. Bionomia comparativa de Triatomíneos. V — *Triatoma lenti* Scherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae).
Comparative bionomy of Triatominae. V — *Triatoma lenti* Scherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae).
Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE 165-174

20. Bionomia comparativa de Triatomíneos. VI — Híbridos de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 X *Triatoma lenti*, Scherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae).

Comparative bionomy of Triatominae. VI — *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 X *Triatoma lenti*, Scherlock & Serafim, 1967 hybrids (Hemiptera, Reduviidae).

Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE 175-181

21. Bionomia comparativa de Triatomíneos. VII — *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae).

Comparative bionomy of Triatominae. VII — *Rhodnius neglectus* Lent 1954 (Hemiptera, Reduviidae).

Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE 183-188

22. Necrose de ponta de cauda em *Eunectes notaeus* Cope, 1862 (Serpentes, Boidae, Boinae).

Caudal necrosis in *Eunectes notaeus* Cope, 1862 (Serpentes, Boidae, Boinae).

Tatiana VEINERT; Hélio Emerson BELLUOMINI; Hideyo IIZUKA & José Daniel Luzes FEDULLO 189-194

23. Estudo da biologia de *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844), em infestações experimentais de *Bufo marinus* (L., 1758) sob condições variadas de umidade relativa e de temperatura do ar.

Biological studies of *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844), in experimental infestation with *Bufo marinus* (L., 1758) under differents conditions of relative humidity and temperature.

Maria Shirley Pizolato OBA & Teresinha T. Sato SCHUMAKER .. 195-204

24. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, *39-46*, 1975/82.

Remissive list of papers published in Memórias do Instituto Butantan, *39-46*, 1975/82 205-216

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX 217-218

ÍNDICE DE ASSUNTO 219-222

SUBJECT INDEX 223-226

Mem. Inst. Butantan
47/48, 1983/84

HOMENAGEM

ROSA PAVONE PIMONT

1930 — 1983

Rosa Pavone Pimont faleceu em 13/07/83, vítima de acidente em Belém do Pará, para onde fora a fim de participar da reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

Nascida em São Paulo, a 14/05/30, possuía os seguintes títulos universitários: Bacharel e Licenciada em Pedagogia (1953), Especialista em Bacteriologia e Imunologia (1959), Especialista em Orientação Educativa (1968), Educador em Saúde Pública (1971) e Doutor em Educação (1972).

Iniciou sua vida profissional pelos magistérios primário e secundário. A nível universitário lecionou Saúde Pública, Orientação Vocacional e Orientação Educacional na Escola de Saúde Pública, Brasília, D.F., na Universidade de São Paulo e em outras faculdades do Estado de São Paulo.

Ingressou no Instituto Butantan em 1954, como Técnico de Laboratório, no Laboratório de Anaeróbios da Seção de Imunologia, passando a Chefe Substituto do mesmo, em 1956. Em 1961, como Assistente Técnico de Cursos

e Assessor da Diretoria Técnica, organizou e coordenou inúmeros cursos técnicos, de especialização, atualização e divulgação, a eles imprimindo seu ritmo dinâmico de trabalho. A partir de 1963 tornou-se, sucessivamente, Chefe Substituto da Seção de Cursos Técnicos e Especializados do Instituto Butantan, Chefe da Seção de Cursos (1968) e Diretor da Divisão de Extensão Cultural do Instituto Butantan (1981), posição que ocupou até a data do falecimento. Chefiando a Divisão, realizou amplo planejamento para sua reestruturação e para o estabelecimento de diretrizes de trabalho. Ampliou a área de recursos humanos, com vários graduados de nível universitário, custeados por bolsas do CNPq e da Fundap e incentivou-os grandemente a comparecerem e a participarem ativamente de congressos e reuniões. Ultimava um projeto objetivando divulgar as atividades do Instituto Butantan através de recursos audiovisuais, para demonstrar a importância da Divisão de Extensão Cultural numa instituição de pesquisa como é a nossa, quando sobreveio sua morte.

Em 1976, foi Consultora Individual do Ministério da Educação e Cultura, na área de Saúde.

Em 1977, transferiu-se para Brasília, D.F., ao ser nomeada Diretora da Divisão Nacional de Educação Sanitária, no Ministério da Saúde e, até 1980, foi Representante deste Ministério em Comitês Científicos, Membro de Conselhos Consultivos, Organizadora e Coordenadora de inúmeros projetos sobre Educação em Saúde a nível nacional, dentre os quais ressalta o Programa Nacional de Controle da Poliomielite. No período 1977-1980, viajou continuamente por todo o território brasileiro, no desempenho seguro e objetivo de suas funções, estimulando seus colaboradores com seu exemplo, sua dedicação e os elevados propósitos de profissional de gabarito.

Realizou vários estágios: em Portugal, Costa Rica, Panamá, Peru e Inglaterra, sob patrocínio da OPS/OMS, por convite expresso das entidades estrangeiras, interessadas em usufruir de sua sólida experiência.

No período de 1980-1981, militou no CNPq, tendo sido Técnico em Desenvolvimento Científico, Coordenadora do Programa Integrado de Ecologia Humana e sua Representante em programa da Unesco.

Seu desempenho profissional resultou na publicação de mais de 36 artigos científicos sobre sua especialidade. Participou intensa e ativamente em mais de 60 congressos, conclaves e simpósios científicos, no Brasil e no Exterior, comunicando seu trabalho, mediando ou coordenando sessões em sua área específica.

Avaliar devidamente sua capacidade, dedicação ao trabalho e seu elevado padrão não é tarefa fácil; avaliar suas qualidades de mulher, amiga e colega, torna-se ainda mais difícil.

Mem. Inst. Butantan
47/48, 1983/84

HOMENAGEM

WOLFGANG BÜCHERL

1911 — 1985

Wolfgang Bücherl, nascido na Alemanha, iniciou a sua vida profissional como professor da primeira cátedra de Biologia Educacional na Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

Ingressou no Instituto Butantan em 1939, após terminar o seu doutorado em Münster, Alemanha, passando a dedicar a sua vida ao estudo dos Animais Peçonhentos, principalmente das aranhas, escorpiões e quilópodos.

Publicou ao longo dos anos mais de cem trabalhos de pesquisa, livros didáticos e de divulgação sobre a sua especialidade. Foi editor e escreveu dois capítulos sobre aranhas e escorpiões no "Animals Venoms and their Venoms" publicado pela Academic Press nos Estados Unidos.

Recebeu a Medalha de Ouro do Prêmio Mello Leitão como recompensa ao mérito do trabalho: "A sistemática das aranhas caranguejeiras, importância dos bulbos copuladores e apófises tibiais, conferido pela Academia Brasileira de Ciências. Foi laureado também com a Medalha

LUCAS, S. Homenagem. Wolfgang Bücherl (1911-1985). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:3-4, 1983/84.

VITAL BRAZIL por ocasião do centenário do nascimento do ilustre fundador do Instituto Butantan; em reconhecimento aos seus trabalhos de pesquisa.

Ocupou o cargo de Chefe da Divisão de Zoologia Médica, a partir de 1949, que compreendia as Seções de Ofiologia, Artrópodos, Parasitologia e Museu do Instituto Butantan.

Organizou o Museu do Instituto Butantan que é visitado anualmente por milhares de pessoas do país e do exterior.

Em 1966 organizou o Simpósio Internacional sobre Venenos Animais e editou os três fascículos comemorativos do citado Simpósio nas MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN.

Trabalhou por longos anos como Secretário-Tesoureiro do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan e também da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

Foi bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas e participou do julgamento de várias teses de mestrado e doutorado.

Participou do Conselho Preparatório da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e depois membro de seu Conselho Superior.

O seu maior mérito porém foi a idealização dos viveiros para a manutenção de aranhas e escorpiões em laboratório. Introduziu o método da coleta dos venenos por choque elétrico obtendo as peçonhas puras, utilizadas tanto para a elaboração de antivenenos como na pesquisa.

Descobriu nos arredores de São Paulo as aranhas do gênero *Loxosceles,* causadoras de acidentes graves, obtendo pela primeira vez no Brasil o veneno que permitiu a elaboração do soro antiloxoscélico.

Incentivou o ingresso na carreira de pesquisa de numerosos jovens, como também foi responsável pelo meu ingresso no Instituto Butantan, como a sua assistente na Seção de Artrópodes Peçonhentos, a partir de 1961 e ocupando o seu cargo de chefia após a sua aposentadoria em 1967.

Através de cursos especializados, palestras e conferências contribuiu para a divulgação do Instituto Butantan tanto no país como no exterior.

Após a sua aposentadoria continuou os seus trabalhos de pesquisa e alcançou o ápice de sua carreira ao ingressar, através de concurso, na carreira de pesquisador científico no nível mais alto.

Todos nós lhe devemos a nossa gratidão.

Mem. Inst. Butantan
47/48:5-11, 1983/84

O GÊNERO *RACHIAS* SIMON, 1892, ARANEAE, CTENIZIDAE, NEMESIEAE

Sylvia LUCAS *
Irene KNYSAK **
Livia ZVEIBIL **

RESUMO: São acrescentados novos caracteres para a identificação do gênero *Rachias* Simon, 1892, a partir do estudo dos tipos de *Rachias dispar* (Simon, 1891), *R. piracicabensis* Piza, 1938 (= *R. intermedia* Soares, 1944) e de material pertencente às coleções do Instituto Butantan, do Museu de Zoologia de São Paulo e do Museu Nacional do Rio de Janeiro. É estabelecida a sinonimia de *R. intermedia* com *R. piracicabensis*.

PALAVRAS-CHAVE: Sistemática. ARANEAE. CTENIZIDAE. Gênero *Rachias*. *R. intermedia* Soares, 1944 sinônimo de *R. piracicabensis* Piza, 1938.

INTRODUÇÃO

O gênero *Rachias* Simon, 1892, possui grande afinidade com o gênero *Hermacha* Simon, 1888, como já havia constatado o próprio autor. Os caracteres até então estabelecidos: olhos anteriores quase iguais e bem separados, formando uma linha pouco procurva, os médios muito maiores que os laterais, último artículo das fiandeiras muito menor que o médio e cônico, além dos caracteres válidos apenas para os machos, ausência de uma apófise tibial e presença de espinhos nos tarsos posteriores, tornavam difícil a identificação, principalmente devido à variação que os mesmos apresentam.

O Instituto Butantan recebe, com relativa freqüência, exemplares pertencentes a ambos os gêneros. Neste trabalho procuramos estabelecer outros caracteres para a determinação de *Rachias,* através do estudo de exemplares pertencentes às espécies: *Rachias dispar* (Simon, 1891), espécie tipo do gênero; *Rachias piracicabensis* Piza, 1938 *(Rachias intermedia* Soares, 1944).

Rachias dispar (Simon)

1891 — *Hermacha dispar* Simon, Annls. Soc. ent. Fr., *60*:303.
1892 — *Rachias dispar* Simon, Hist. Nat. Ar., *1* (1) Paris: 114.
1924 — *Rachias dispar* Mello Leitão, Rev. Mus. paul., *13*:69.

INSTITUTO BUTANTAN — * Divisão de Biologia, ** Seção de Artrópodes Peçonhentos
Caixa Postal 65 — CEP 05504 — São Paulo — Brasil.

Material examinado:

Sintipos, macho e fêmea, n.º 10581 do Museu de História Natural de Paris, loc. Teresópolis, Rio de Janeiro — Brasil.

Macho s/n.º do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), loc. Represa de Mendanha, Rio de Janeiro — Brasil. Fêmea s/n.º do MNRJ, loc. Rio de Janeiro — Brasil.

Macho n.º 2.280/ref. 20.061 da Coleção Orthognatha do Instituto Butantan (Col. IB. O), loc. Vassouras, Rio de Janeiro — Brasil. Dois machos, n.º 2.280/ref. 11.201 Col. IB. O, loc. Estação Andrade Costa, Rio de Janeiro — Brasil.

Acrescentamos à descrição original o seguinte:

macho: a fóvea é reta; os lobos maxilares apresentam junto ao lábio, cúspides delicadas, lábio sem cúspides; o rastelo é formado por cerdas, mais abundantes próximo ao bordo, junto aos ferrões; as escópulas tarsais, no tarso I são inteiras, apresentando lateralmente algumas cerdas curtas, no tarso II com escópulas e alguns espinhos no lugar de cerdas, no tarso III com escópulas e espinhos curtos, nos lados do tarso IV com escópulas divididas por linha ventral de cerdas, com muitos espinhos laterais e com terceira garra; sem apófises tibiais, tíbia do palpo dilatada na base e estreitando-se para o ápice, com 7 a 9 espinhos distribuídos como mostra nas figs. 1 e 2; bulbo com membrana delicada.

fêmea: fóvea levemente procurva; lobos maxilares com cúspides maiores do que as do macho; lábio com duas cúspides no exemplar tipo e sem nenhuma no outro, rastelo de cerdas mais fortes e mais abundantes do que no macho, escópulas tarsais, nos tarsos I e II inteiras, com apenas algumas cerdas laterais, curtas, tarso III com espinhos laterais e IV com linha ventral de cerdas divisórias e espinhos laterais; com terceira garra; receptáculos seminais como na Fig. 3. O sintipo é uma fêmea subadulta.

Rachias piracicabensis Piza

1938 — *Rachias piracicabensis* Piza, Fol. Clin. et Biol., São Paulo *10* (1): 21.

1944 — *Rachias intermedia* Soares, Papéis Dep. Zool. São Paulo *4* (10): 160, (figs. 4, 5 e 6).

1952 — *Rachias plerumque,* Zool. Rec., 1952: 61 (error typhograph. pro *Rachias piracicabensis* Piza, 1938).

Material examinado:

Sintipos, Rachias piracicabensis, fêmeas n.º A 0033 da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, col. Piraciba, São Paulo — Brasil; duas fêmeas, n.º 5575 do Museu de Zoologia de São Paulo (MZSP), col. Barueri, São Paulo, Brasil; uma fêmea n.º 6630 do MZSP, col. Itapetininga, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 3044 do MZSP, col. Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 3207 do MZSP, col. Cachoeira das Emas, Pirassununga, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 6819 do MZSP, col. Sumaré, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 5863 do MZSP, col. Barueri, São Paulo — Brasil; um macho e uma fêmea, n.º 5193 do MZSP, col. Ipiranga, São Paulo — Brasil e da mesma proce-

dência: duas fêmeas, n.º 5789 do MZSP; uma fêmea, n.º 2732 do MZSP; uma fêmea, n.º 5843 e uma fêmea, s/n.º do MZSP.

Tipo, do sinonimo *Rachias intermedia,* n.º E 546 (C629) do MZSP, macho, Col. Monte Alegre, Município de Amparo, São Paulo — Brasil.

Uma fêmea do MNRJ, col. Lavras, Minas Gerais — Brasil.

Coleção de Orthognatha do Instituto Butantan:

Um macho, n.º 98/ref. 4415, Capital, São Paulo — Brasil; um macho n.º 98/ref. 4225, Capital, São Paulo — Brasil; dois machos, n.º 1263/A e B, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea 1263/ref. 17007, Capital, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 2280/ref. 16969, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 3719/ref. 371, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 4050/ref. 15421, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea n.º 4176/ref. 17681, Capital, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 3722/ref. 381, Casa Branca, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4214/ref. 16439, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 4363/ref. 23091, Capital, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4472/ref. 25669, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 4472/ref. 30999, Capital, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4583/ref. 28955, Capital, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4583/ref. 41754, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 98/ref. 21062, Capital, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 2254/ref. 17271, Nazaré Paulista, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 2280/ref. 23149, Rio Claro, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 2280/ref. 16790, Barueri, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 3977/ref. 15447, Barueri, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 3722/ref. 381, Casa Branca, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4050/ref. 13201, Cotia, São Paulo — Brasil; um macho n.º 4072/ref. 3306, Campinas, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4214/ref. 1176, Campinas, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4214/ref. 21322, São Roque, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 4530/ref. 26248, São Roque, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 3722-381, Casa Branca, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 4478/ref. 25622, Cabreúva, São Paulo — Brasil; três machos, n.º 4517/ref. 26454, Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo — Brasil; uma fêmea, n.º 4593/ref. 27371, Mairiporã, São Paulo — Brasil; um macho, n.º 4671/ref. 30517, São Luiz do Paraitinga, São Paulo — Brasil; um fêmea, n.º 4622-A/ref. 29658, São Gonçalo do Sapucaí, Minas Gerais — Brasil; uma fêmea, n.º 4533/ref. 23888, Guaranésia, Minas Gerais — Brasil.

Acrescentamos à descrição original o seguinte:

macho: fóvea procurva; lobos maxilares com poucas cúspides pequenas; lábio com nenhuma, uma ou duas cúspides; rastelo formado por cerdas longas, encobrindo os ferrões à semelhança de um pente; escópulas tarsais com linha ventral de cerdas divisórias, mais nítida nos tarsos posteriores, onde com raras exceções ocorrem espinhos entre as cerdas, presença de espinhos laterais curtos nos tarsos, que podem ou não ser levemente curvos; terceira garra presente no tarso IV; sem apófise tibial; forma do palpo como em *R. dispar:* com 8 a 11 espinhos; o bulbo com êmbolo apresentando uma membrana delicada (Figs. 4 e 5). *fêmea:* fóvea procurva; cúspides nos lobos maxilares mais acentuadas, de zero a duas cúspides no lábio; escópulas tarsais nas pernas anteriores com poucas cerdas divisórias, medianas, nos posteriores sempre com cerdas divisórias, entremeadas por espinhos curtos ou não, espinhos laterais presentes apenas nos tarsos II e III. Receptáculos seminais em forma de duas vesículas duplas, como na Fig. 6.

LUCAS, S.; KNYSAK, I. & ZVEIBIL, L. O género *Rachias* Simon, 1892, Araneae, Ctenizidae, Nemesieae. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:5-11, 1983/84.

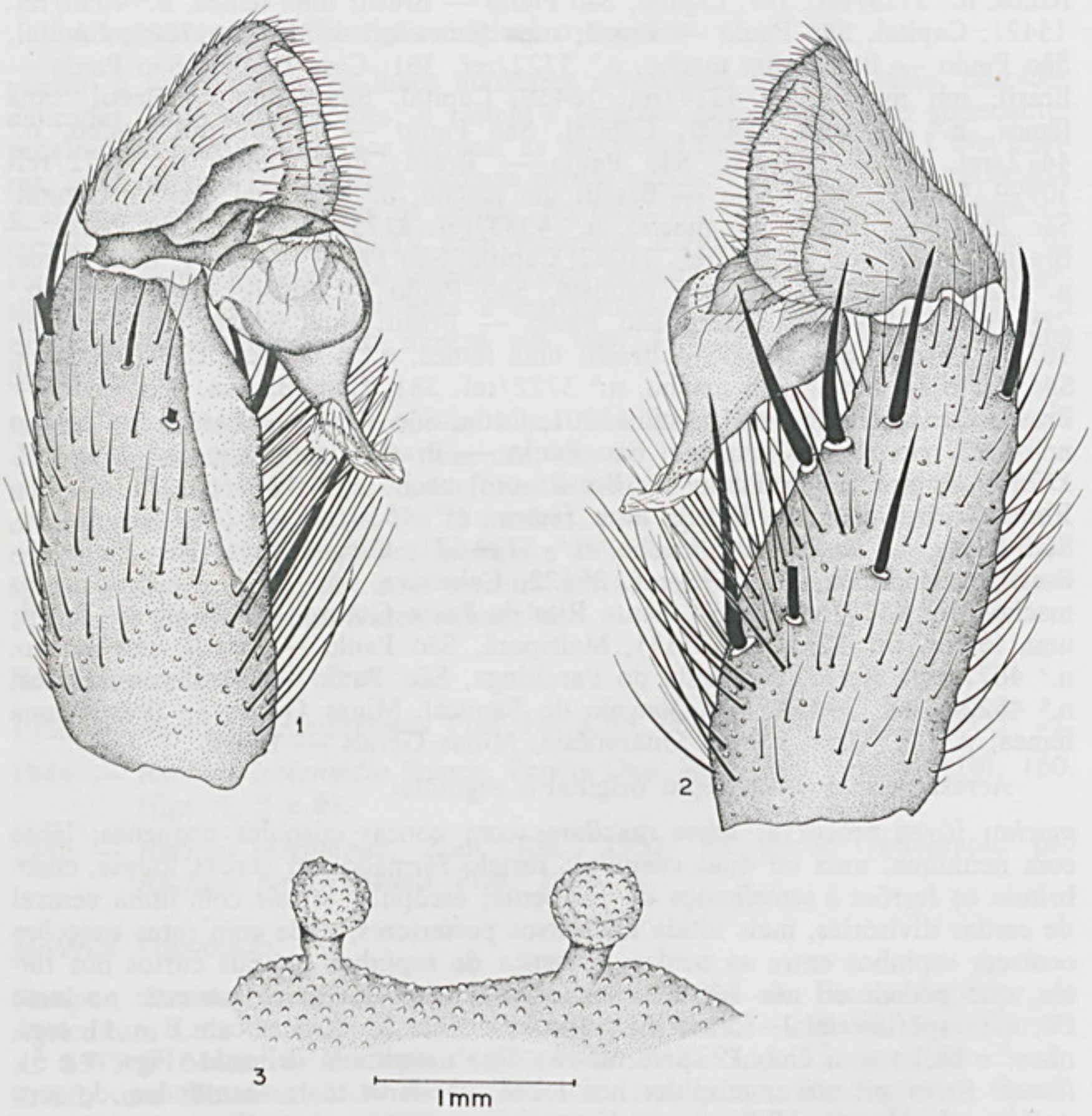


Fig. 1 — *Rachias dispar* (macho) — tíbia do palpo e bulbo direitos, face externa.
Fig. 2 — *Rachias dispar* (macho) — tíbia do palpo e bulbo direitos, face interna.
Fig. 3 — *Rachias dispar* (fêmea) — receptáculo seminal.

LUCAS, S.; KNYSAK, I. & ZVEIBIL, L. O gênero *Rachias* Simon, 1892, Araneae, Ctenizidae, Nemesieae. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:5-11, 1983/84.

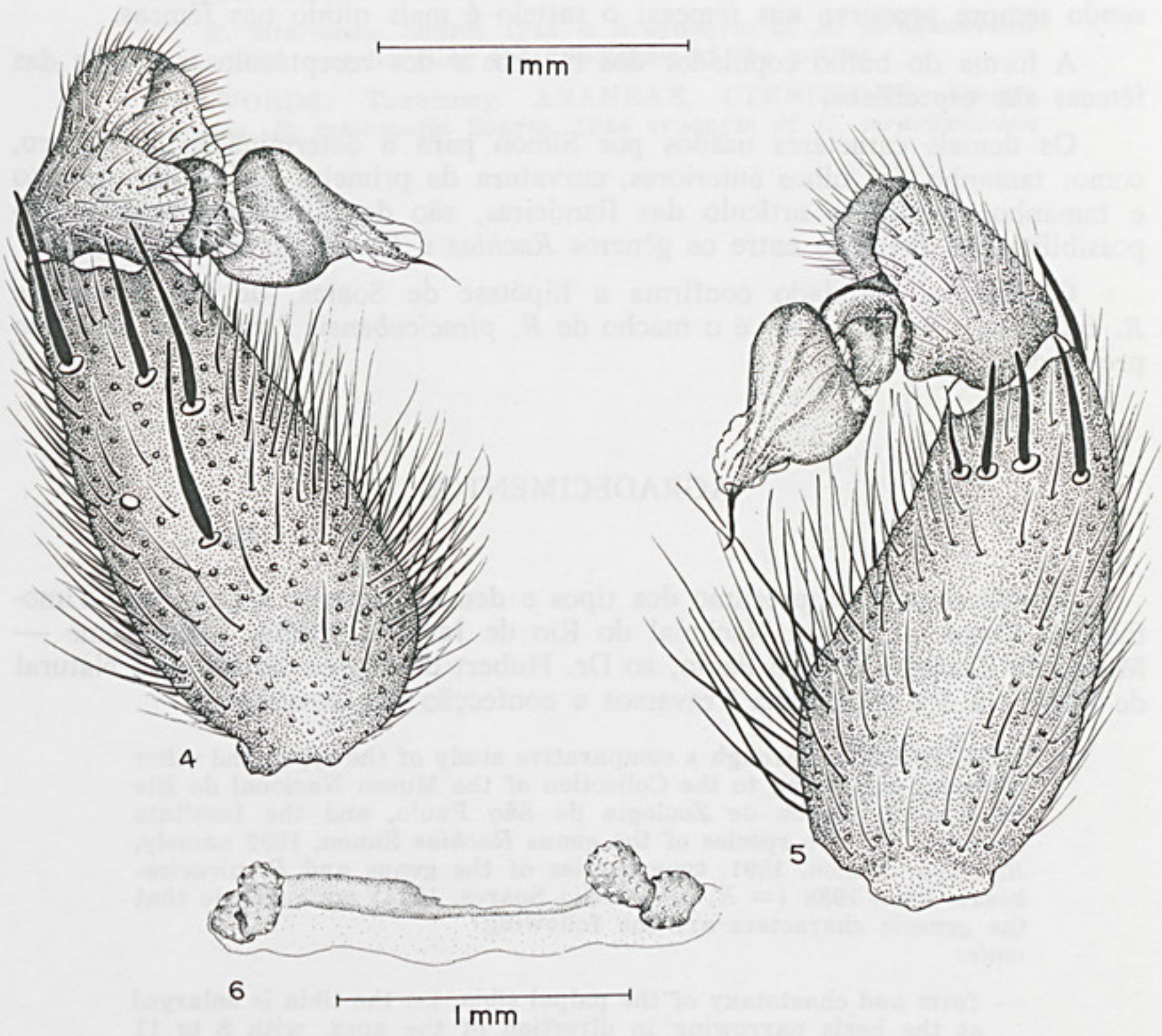


Fig. 4 — *Rachias piracicabensis* (macho) — tibia do palpo e bulbo esquerdos, face interna.
Fig. 5 — *Rachias piracicabensis* (macho) — tíbia do palpo e bulbo esquerdos, face externa.
Fig. 6 — *Rachias piracicabensis* (fêmea) — receptáculo seminal.

CONCLUSÃO

Após o exame dos exemplares pudemos concluir que o gênero *Rachias* apresenta os seguintes caracteres:

macho: tíbia do palpo dilatada na base e estreitando-se para o ápice, com 7 a 11 espinhos, geralmente 4 apicais e 3 basais na face interna e apicais na face externa; não há apófise tibial; nos lobos maxilares, junto ao bordo interno, próximo ao lábio, ocorrem pequenas cúspides, nunca dispostas em forma triangular; presença de espinhos laterais nos tarsos, mais acentuadas nos tarsos posteriores; o tarso IV com escópula rala, dividida por uma linha de cerdas, que é ou não entremeada por pequenos espinhos, terceira garra presente no tarso IV.

fêmea: lobos maxilares com cúspides conspícuas no canto interno, junto ao lábio; presença de espinhos laterais nos tarsos anteriores ou posteriores.
A fóvea torácica pode ser desde reta até levemente procurva, nos machos, sendo sempre procurva nas fêmeas; o rastelo é mais nítido nas fêmeas.

A forma do bulbo copulador dos machos e dos receptáculos seminais das fêmeas são específicos.

Os demais caracteres usados por Simon para a determinação do gênero, como: tamanho dos olhos anteriores, curvatura da primeira fila ocular, aspecto e tamanho do último artículo das fiandeiras, são de difícil avaliação e não possibilitam a distinção entre os gêneros *Rachias* e *Hermacha* Simon, 1888.

O material estudado confirma a hipótese de Soares, de que a espécie *R. intermedia* Soares, 1944 é o macho de *R. piracicabensis* Piza, 1938, devendo prevalecer este último.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o empréstimo dos tipos e demais material à Dra. Ana Timotheo da Costa — Museu Nacional do Rio de Janeiro, à Dra. Lícia Neme — Museu de Zoologia de São Paulo, ao Dr. Hubert do Museu de História Natural de Paris e à Sra. Delminda Travassos a confecção dos desenhos.

ABSTRACT: Through a comparative study of the types and other material pertaining to the Collection of the Museu Nacional do Rio de Janeiro, Museu de Zoologia de São Paulo, and the Instituto Butantan, of two species of the genus *Rachias* Simon, 1892 namely, *R. dispar* Simon, 1891, type species of the genus and *R. piracicabensis* Piza, 1938 (= *R. intermedia* Soares, 1944) we conclude that the generic characters are the following:
male:

— form and chaetotaxy of the palpal tibia, i.e. the tibia is enlarged at the basis narrowing in direction of the apex. with 8 to 11 spines;
— tibial apophysys absent;
— at the maxilla presence of delicate cuspulae, next to the inner corner close to the labium;
— comb composed by Bristles, consealing partially the fangs;

— presence of lateral spines at the tarsi, more frequent at the posterior tarsi;
— presence of a sparse scopula and divided by a Bristles covered band in general interspersed with spines at the tarsus IV;
— presence of a third claw a tarsus IV.

female:

— comb composed of stiffer Bristles and more abundant;
— maxilla with accentuated cuspulae;
— presence of lateral spines at the anterior or posterior tarsi, and the same scopula at the IV tarsus as in the male.

The features, form of the bulb and aspect of the spermathecae are specific.

Other characters, considered by Simon as valid for the genus, such as aspect of the anterior eyes and curvature of the first ocular row, as well as aspect and size of the last segment of the spinnerets, are of difficult appreciation, and do not allow a distinction between the genera *Rachias* and *Hermacha* Simon 1888.

R. intermedia Soares 1944 is a synonym of *R. piracicabensis* Piza, 1938, corroborating the hypothesis of the author.

KEYWORDS: Taxonomy. ARANEAE. CTENIZIDAE. Genera *Rachias*. *R. intermedia* Soares, 1944 synonym of *R. piracicabensis* Piza, 1938.

Recebido para publicação em 17/08/1983 e aceito em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:13-26, 1983/84

AÇÕES PRÉ-JUNCIONAIS E PÓS-JUNCIONAIS DA PEÇONHA DA COBRA CORAL *MICRURUS CORALLINUS* NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Oswaldo Vital BRAZIL *
Marcos Dias FONTANA *

RESUMO: A peçonha de *M. corallinus* produz bloqueio neuromuscular irreversível na preparação isolada nervo frênico-diafragma de rato, aumenta a liberação espontânea de acetilcolina e inibe a causada pelos impulsos nervosos. No hemidiafragma cronicamente desnervado e isolado de rato, inibe reversivelmente as respostas do músculo à acetilcolina. Não altera o potencial de membrana das fibras do diafragma de rato, nem a excitabilidade desse músculo. Aumenta consideravelmente a freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura do diafragma de rato, reduzindo depois progressivamente a sua amplitude, efeito que os faz desaparecer. A despolarização, provocada pelo carbacol na região das placas terminais das fibras do diafragma é, reversivelmente, inibida pela peçonha de *M. corallinus*. Estes resultados mostram que a peçonha exerce ações pré e pós-sinápticas, sendo a última reversível. A pré-sináptica é irreversível. Na preparação *in situ* nervo ciático-músculo tibial anterior de cão, a administração de nostigmina na vigência do bloqueio parcial causado pela peçonha de *M. corallinus* provoca apenas ligeiro aumento nas respostas do músculo à excitação indireta. Este resultado favorece a hipótese de que a ação pré-sináptica da peçonha prepondera sobre a pós-sináptica na gênese do bloqueio.

PALAVRAS-CHAVE: Junção neuromuscular; peçonha de cobra coral; ação pré-sináptica; ação pós-sináptica; acetilcolina; neostigmina.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (Vital Brazil *et al*, 1976/77), mostramos que o bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha de *Micrurus frontalis* é devido à ocupação dos receptores colinérgicos da placa terminal por sua ou suas neurotoxinas. No presente, relatamos pesquisa sobre as ações da peçonha de *M. corallinus* na junção neuromuscular. Verificamos que a peçonha desta espécie de cobra coral, ao contrário das de *M. fulvius* (Weiss & McIsaac, 1971), *M. leminiscatus* (Vital Brazil, 1963) e *M. frontalis* (Vital Brazil *et al.*, 1976/77) exerce ação nas terminações nervosas motoras, além da posjuncional. *M. coral-*

* Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp.

linus é espécie de larga distribuição no Brasil (Hoge e Romano, 1972), ocorrendo também, segundo Roze (1981), no norte da Argentina e provavelmente no Uruguai.

MATERIAL E MÉTODOS

Atividade bloqueadora neuromuscular — Usou-se a preparação nervo frênico-diafragma de rato em banho de 40 ml a 37°C. A solução nutritiva utilizada foi a de Tyrode com a seguinte composição em mM por litro: NaC1 136,8; KC1 2,7; $CaC1_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 11,9; $MgC1_2$ 0,25; NaH_2PO_4 0,3; glicose 11,0. A oxigenação foi mantida com carbogênio (95% O_2 e 5% Co_2) e o registro das contrações, feito no papel esfumaçado de quimógrafo, através da pena inscritora de alavanca cardíaca de Starling. Fez-se a estimulação do nervo com pulsos maximais de 0,1 Hz de freqüência e 0,2 milissegundos de duração (estimulador Grass S4); na excitação direta do músculo usaram-se estímulos de igual freqüência mas de maior voltagem (50-100V) e duração (2 milisseg.). Nestas e em outras experiências em que se usou a preparação nervo frênico-diafragma, o hemidiafragma com seu nervo foi retirado de ratos brancos Wistar de 230 a 250 g.

Liberação de acetilcolina (ACh) — O efeito da peçonha sobre a liberação de ACh foi pesquisado na preparação nervo frênico-diafragma de rato, em banho de 4 ml a 37°C. Usou-se solução de Tyrode, de composição já indicada com 5 µg/ml de metilsulfato de neostigmina. A oxigenação foi mantida com carbogênio como no grupo anterior de experiências. Fizeram-se as seguintes operações após a suspensão do diafragma no banho: (1) deixou-se a preparação em repouso pelo espaço de 40 minutos, findo o qual, a solução foi trocada; (2) o músculo foi deixado em repouso por período adicional de 20 minutos, findo o qual, a solução foi coletada para dosagem de ACh liberada (liberação espontânea) e uma solução nova de Tyrode, colocada na cuba; (3) o nervo frênico foi estimulado por um período de 23 minutos, após o qual, o líquido foi coletado para a dosagem de ACh, a preparação lavada e colocada na cuba solução Tyrode com 10 µg/ml de peçonha; (4) deixou-se a preparação em contato com a solução até a ocorrência de bloqueio completo (o nervo frênico era estimulado de quando em vez para a verificação do grau de bloqueio), após o que substituiu-se a solução por uma nova; (5) deixou-se a preparação em repouso por um período de 20 minutos, após o qual, coletou-se a solução para a dosagem de ACh (liberação espontânea após o bloqueio causado pela peçonha) e colocou-se, na cuba, nova solução de Tyrode; (6) estimulou-se o nervo frênico por um período de 23 minutos, como em (3), findo o qual, a solução foi coletada para a dosagem de acetilcolina. O nervo foi sempre estimulado com pulsos supramaximais de 0,2 milissegundo de duração. Empregou-se a freqüência de 0,1 Hz nos 3 primeiros minutos e a de 25 Hz nos restantes 20 minutos. As soluções coletadas para a dosagem de ACh foram imediatamente acidificadas a pH 5-5,5 com solução de HC1 após a sua retirada da cuba.

As dosagens de ACh foram realizadas no íleo isolado de cobaia. Usou-se solução de Krebs com 10 µg/m1 de cloridrato de morfina, 5 ng/m1 de metilsulfato de neostigmina e 5 ng/m1 de cloridrato de difenidramina, de acordo com o procedimento de Paton e Vizi (1969) modificado (inclusão do anti-histamínico). Oxigenou-se a preparação com carbogênio e registraram-se as respostas no papel esfumaçado de quimógrafo por meio de alavanca frontal.

Fizeram-se ensaios de quatro pontos para avaliar as quantidades de acetilcolina liberada.

Contratura causada pela acetilcolina no músculo desnervado — As experiências foram levadas a efeito na preparação hemidiafragma, cronicamente desnervado isolado de rato. O volume do banho, a temperatura, a solução nutritiva e o arejamento foram idênticos aos utilizados na preparação nervo frênico-diafragma de rato. Estimulou-se o músculo com 2,8 µg/m1 de ACh. Procedeu-se da seguinte forma: (1) após a suspensão do hemidiafragma no banho, foi ele deixado em repouso durante um período de 40 minutos, findo o qual, trocou-se a solução de Tyrode; (2) juntou-se a ACh ao banho e, após 1 minuto, lavou-se a preparação 5 vezes; (3) deixou-se a preparação em repouso durante 30 minutos, após os quais, adicionou-se a ACh ao banho e, como em (2), após 1 minuto, lavou-se 5 vezes a preparação; adicionou-se, então, a peçonha (2 µg/m1) à solução de Tyrode da cuba, (4) procedeu-se como em (3); (5) repetiu-se a operação descrita em (3) 3 ou 4 vezes de modo a verificar a reversibilidade de ação da peçonha.

Os ratos (de 200 a 230 g) foram desnervados pelo procedimento de Vital Brazil (1963) e os hemidiafragmas, retirados 20 a 30 dias após essa operação.

Excitabilidade muscular — Estudou-se a ação da peçonha sobre a excitabilidade muscular pela determinação de seu efeito sobre a curva de excitabilidade e cronaxia do diafragma isolado de rato. Fragmento triangular do hemidiafragma foi distendido horizontalmente, com sua face toráxica voltada para cima, em cuba de perspex de 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de altura, revestida de resina e silicone ("Dow Corning-Sylgard") e mantido fixo por meio de alfinetes colocados em sua porção tendinosa e no tecido conjuntivo da porção costal. A cuba, com a preparação, era colocada na platina de microscópio estereoscópio de fabricação Zeiss para aumentos de até 40 vezes. A temperatura, a solução nutritiva e o arejamento eram idênticos aos já descritos. A temperatura foi mantida a 37° C por meio de lâmpada de raios infravermelhos a, aproximadamente, 37 cm da cuba. O electródio ativo era constituído de fio de prata cloretada (Ag. AgC1) revestido, menos em sua extremidade, com verniz; o electródio indiferente era de fio de prata cloretada. O electródio ativo, sustentado por um dos braços do micromanipulador (Zeiss, Jena), era colocado na superfície de uma fibra ou entre duas fibras; o indiferente, no banho. Na estimulação usaram-se pulsos fornecidos por estimulador Grass S48 através de unidade isoladora de estímulos (Grass S1U5). As respostas aos estímulos liminares eram observados ao microscópio. Usaram-se estímulos de 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 e 0,01 milissegundos de duração e de intensidades (voltagens) crescentes.

Potencial de membrana, potenciais de placa terminal em miniatura (pp.p.t.m), despolarização pelo carbacol — Pesquisou-se a ação da peçonha sobre esses parâmetros no diafragma isolado de rato com o emprego de técnicas convencionais usadas me pesquisas com microeletródios intracelulares. A cuba utilizada, o modo de fixação do hemidiafragma, a maneira pela qual mantinha-se a temperatura do banho a 37°C, a solução nutritiva, a oxigenação da preparação assim como o tipo de microscópio e micromanipulador empregados foram idênticos aos descritos sob o item *Excitabilidade muscular*. Os microelectródios de vidros preparados com o auxílio de "Microelectrode Puller" CEP, mod. 8104 eram cheios com solução 3M KC1; a sua resistência achava-se

compreendida entre 5 a 25 M. O electródio indiferente era constituído de fio espiralado de prata cloretada incluído em tubo de vidro curvo (para adaptação à cuba) com agar-salina.

A determinação do potencial de membrana das fibras musculares era feita da seguinte forma: sob controle microscópico, inseria-se o microelectródio no interior de uma fibra muscular e media-se o deslocamento vertical sofrido pela varredura do canal do osciloscópio no momento da penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em dez fibras distintas em períodos de tempo não superiores a um minuto e calculava-se a média aritmética das dez leituras. O potencial de membrana era determinado multiplicando-se o valor da média obtida por fator de correção. Este era estabelecido introduzindo-se no circuito sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio.

Fazia-se a determinação da freqüência e amplitude dos pp.p.t.m. inserindo-se o microelectródio em uma fibra na região de sua placa terminal. Após a determinação de seus valores controles, a peçonha era adicionada ao banho e as alterações na freqüência e amplitude verificadas em tempos variáveis. Em 3 experiências, adicionou-se tetrodotoxina ao banho em quantidade suficiente para inibir as respostas à estimulação indireta. Determinou-se depois a influência da peçonha sobre a freqüência e amplitude dos pp.p.t.m.

Em 3 experiência pesquisou-se a influência da peçonha sobre a despolarização causada por 12,5 µg/m1 de carbacol (Datyner e Gage, 1973). As determinações da despolarização eram feitas 15 minutos após a adição do carbacol ao banho; depois se lavava a preparação pelo espaço de 30 minutos (6 lavagens).

Efeito da neostigmina no bloqueio neuromuscular causado pela peçonha de Micrurus corallinus — O efeito da neostigmina no bloqueio neuromuscular causado pela peçonha de *M. corallinus* foi investigado na preparação *in situ* nervo ciático-músculo tibial anterior de cão. Utilizaram-se no estudo sete cães anestesiados pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg, i.v.). Fixação de uma das patas posteriores do animal, região de exposição do nervo ciático popliteo externo, registro das contrações do músculo tibial anterior, tipo de eletródios e canulação da veia femoral de acordo com o exposto em trabalho anterior (Vital Brazil, 1966). Estimulou-se o nervo com pulsos supramaximais de 0,5 Hz e 0,2 mseg. (estimulador Grass S 4). Em todas as experiências registrou-se a pressão arterial carotídea por meio de manômetro de Ludwig. A peçonha de *M. corallinus* foi sempre injetada por via intramuscular enquanto a atropina e a neostigmina o foram por via venosa.

Peçonhas e drogas — Todas as experiências foram levadas a efeito com um "pool" de peçonha de *M. corallinus* proveniente da extração de exemplares capturados na região de Eldorado, São Paulo. A sua DL50 foi determinada em camundongos brancos de 18 a 22 g. Usaram-se seis animais por dose e quatro doses em progressão geométrica de razão 1,25. As diluições da peçonha em salina a 8 por mil foram administradas por via venosa em volume de 0,5 m1. Calcularam-se as doses medianas letais e seus intervalos e nível fiducial de 95% pelo processo de Weil (1952). Os valores encontrados em duas experiências foram: 400 (337 a 475) µg/kg e 414 (377 a 455) µg/kg. As drogas usadas na pesquisa foram as seguintes: iodeto de acetilcolina (Sigma), carbacol (Kock Light), tetrodotoxina (Sigma), metilsulfato de neostigmina (Prostigmine

"Roche"), cloridrato de morfina (Enila S/A), cloridrato de difenidramina (Benadryl "Park Dawes"), sulfato de atropina (C.H. Boehringer Sohn).

RESULTADOS

Atividade bloqueadora neuromuscular — Realizamos um total de 10 experiências na preparação nervo frênico-diafragma de rato para avaliar a sua atividade nessa preparação. Em seis, empregamos a dose de 10 µg/m1 de peçonha. Bloqueio completo ocorreu após 80 minutos em quatro, após 85 minutos em uma e após 90 minutos em outra. Essa dose de peçonha causou, portanto, bloqueio completo em 82 ± 2,55 minutos em média. Em uma experiência, obtivemos bloqueio completo em 100 minutos com o uso de 7,5 µg/m1 de peçonha e, em três outras, em 178 ± 10,4 minutos com o emprego de 5 µg/m1. Observamos aumento inicial bastante acentuado das respostas (100% e 350%) em duas experiências (com o uso de 10 µg/m1). Nas restantes o aumento foi discreto ou não ocorreu. Em todas as experiências o bloqueio foi irreversível. A excitação direta do diafragma após a ocorrência do bloqueio sempre provocou resposta de amplitude normal.

Liberação de acetilcolina — Os resultados das experiências realizadas com a finalidade de verificar o efeito da peçonha sobre a liberação de ACh acham-se na tabela I. Pelo seu exame constata-se que, após o bloqueio, houve aumento considerável (64,9%) na liberação espontânea enquanto a liberação produzida pelos impulsos nervosos foi muito reduzida (53,19%).

TABELA I

Efeito da peçonha de Micrurus corallinus sobre a liberação de acetilcolina, em nanogramas da base. Preparação nervo frênico-diafragma de rato

EXP.	Liberação antes da adição de peçonha à cuba		Liberação após o bloqueio provocado por 10 µg/ml de peçonha	
	Lib. espontânea	Lib. por impulsos nervosos	Lib. espontânea	Lib. por impulsos nervosos
1	6,4	55,6	9,1	21,1
2	8,4	64,8	14,0	28,0
3	8,5	49,0	15,0	30,0
Média ± erro padrão	7,7 ± 0,9	56,4 ± 0,9	12,7 ± 2,5	26,4 ± 3,8

Contratura causada pela acetilcolina no músculo desnervado — Realizaram-se 3 experiências. Em todas, a peçonha na dose de 2 µg/m1 inibiu reversivelmente a contratura do hemidiafragma cronicamente desnervado provocada pela adição de ACh ao banho (fig. 1).

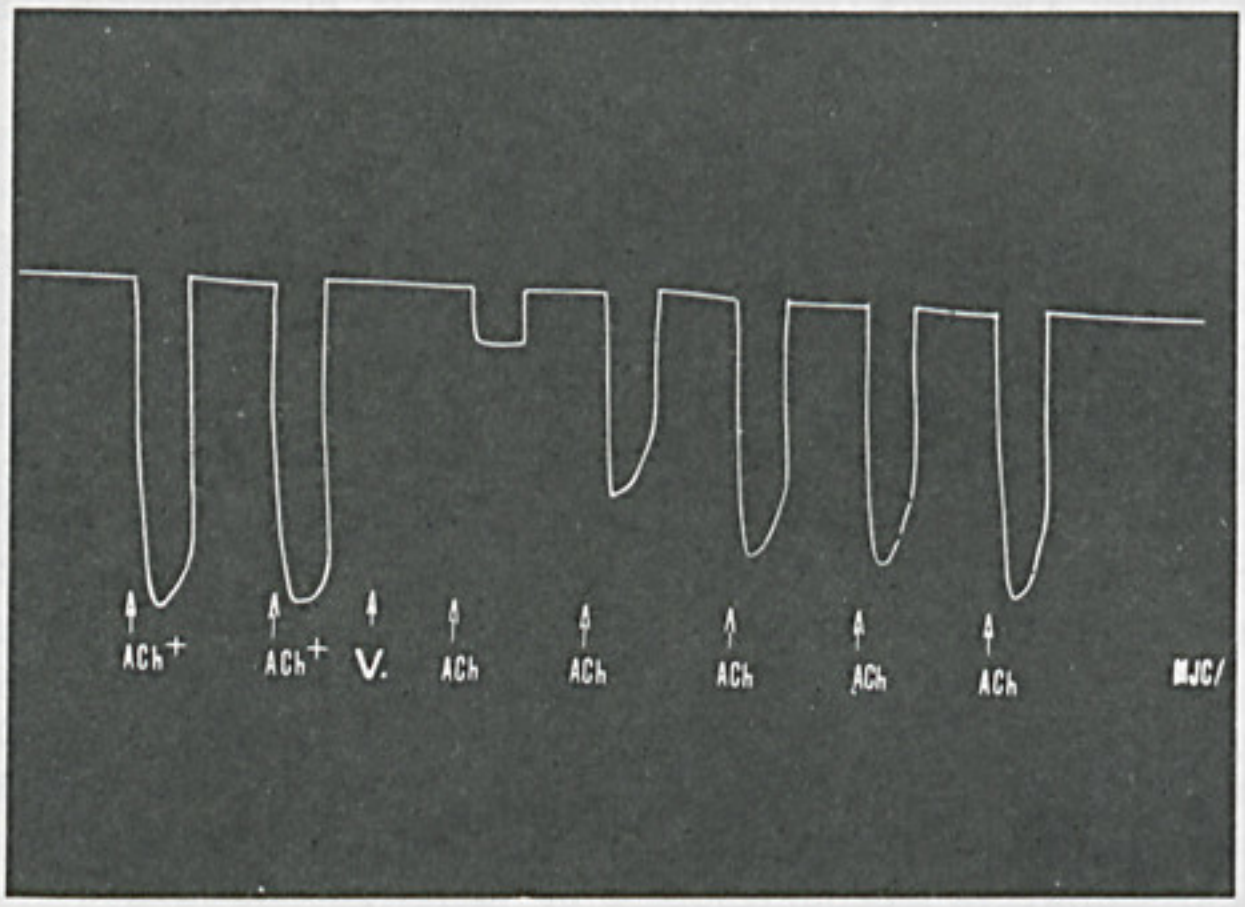


Fig. 1 — Respostas do hemidiafragma cronicamente desnervado e isolado de rato à ACh (4 μg do iodeto). Em V adicionou-se 2 μg/ml de peçonha de *M. corallinus* ao banho; a solução de Tyrode do banho com a peçonha permaneceu 30 minutos em contato com o hemidiafragma antes da adição da ACh. O efeito inibitório da peçonha sobre a contratura provocada pela ACh desapareceu com as lavagens sucessivas da preparação.

Excitabilidade muscular — A peçonha na dose de 20 µg/m1 não alterou as curvas de excitabilidade e a cronaxia do diafragma de rato determinados em região isenta de terminações nervosas (fig. 2).

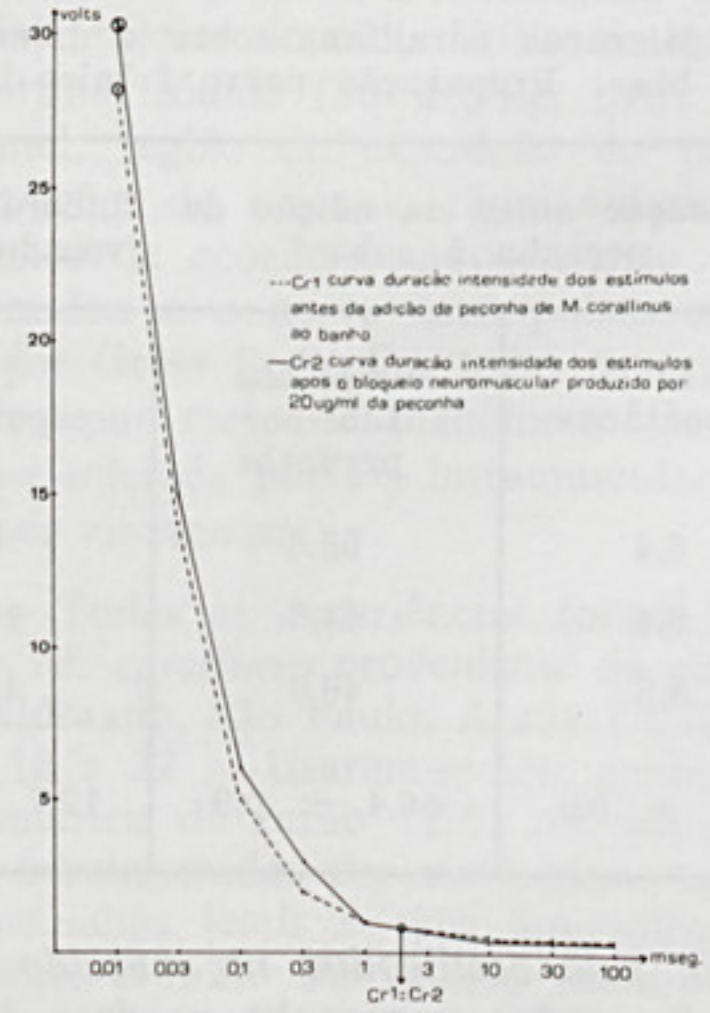


Fig. 2 — Curvas de excitabilidade do diafragma isolado de rato antes e após a adição de 20 μg/ml da peçonha de *M. corallinus*. As curvas foram determinadas em região do músculo isenta de terminação nervosa.

Potencial de membrana, potenciais de placa terminal em miniatura (pp.p.t.m.), despolarização pelo carbacol — O potencial de membrana das fibras musculares do diafragma não se alterou pela adição da peçonha (10 µg/m1) ao banho (tabela II), mesmo após a ocorrência do bloqueio neuromuscular. Nas experiências, por exemplo, cujos resultados se encontram na tab. II, bloqueio completo se deu em 75 minutos na primeira, 80 minutos na segunda e 90 minutos na terceira.

A freqüência dos pp.p.t.m aumentou consideravelmente a partir dos 10 a 15 minutos da adição de 5 µg/m1 de peçonha ao banho, atingindo, em geral, um máximo em torno dos 40 minutos (fig. 3). Esse aumento variou de 406,0% a 3.176,0% nas quatro experiências realizadas. Apareceram também potenciais de amplitude consideravelmente maior do que a dos anteriores à adição da peçonha ao banho (fig. 4). Após 50 a 60 minutos a amplitude do pp.p.t.m., começou a diminuir (fig. 3); desapareceram, regra geral, dentro de 70 a 80 minutos. A tetrodotoxina, em doses que inibiram as respostas do diafragma à estimulação indireta, não alterou os efeitos acima descritos da peçonha sobre os pp.p.t.m. Na dose de 10 µg/m1 a peçonha provocou desaparecimento rápido dos pp.p.t.m.

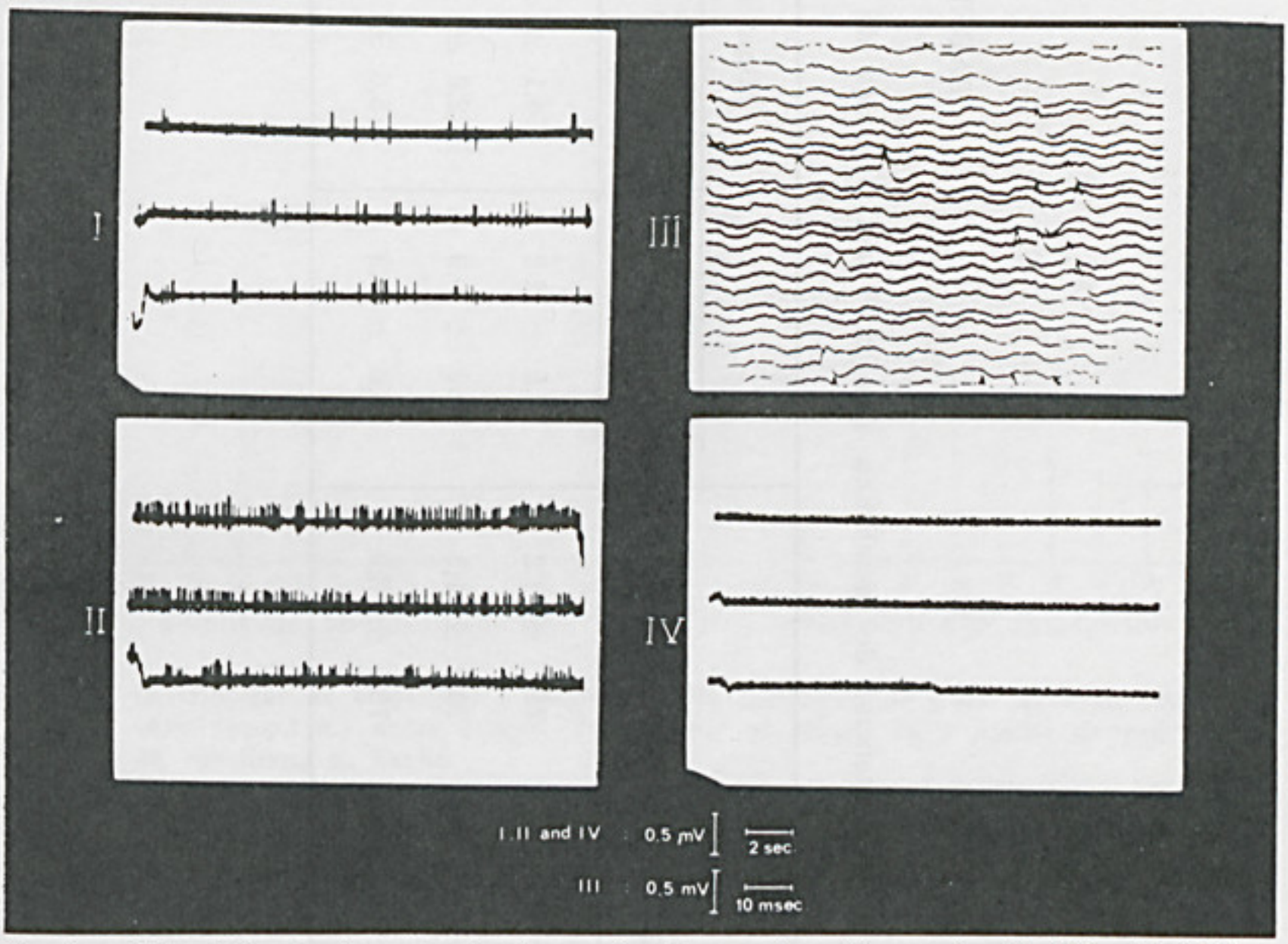


Fig. 3 — Potenciais de placa terminal em miniatura antes (I) e após 20 (II), 40 (III) e 60 (IV) minutos da adição de 5 µg/ml de peçonha de *M. corallinus* ao banho.

BRAZIL, O. V. & FONTANA, M. D. Ações pré-juncionais e pós-juncoonais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuocular. *Mem. Inst. Buiantan, 47/48*: 13-26, 1983/84.

TABELA II

Potencial de membrana (em mV) em presença da peçonha de *M. corallinus* (média ± erro padrão)

Exp.	Controle	Minutos após a adição de 10 μg/ml de peçonha				
		30'	60'	90'	120'	150'
1	74,7 ± 1,2	70,5 ± 2.2	74,1 ± 1.3	70,0 ± 1,4	73,5 ± 1,03	——
2	70,0 ± 1,5	70,0 ± 0,9	72,0 ± 1,9	75,0 ± 1,5	75,0 ± 2,1	72,0 ± 1,6
3	72,5 ± 2,0	75,0 ± 1,9	75,6 ± 2,2	74,5 ± 2,4	75,0 ± 2,3	75,3 ± 2,1

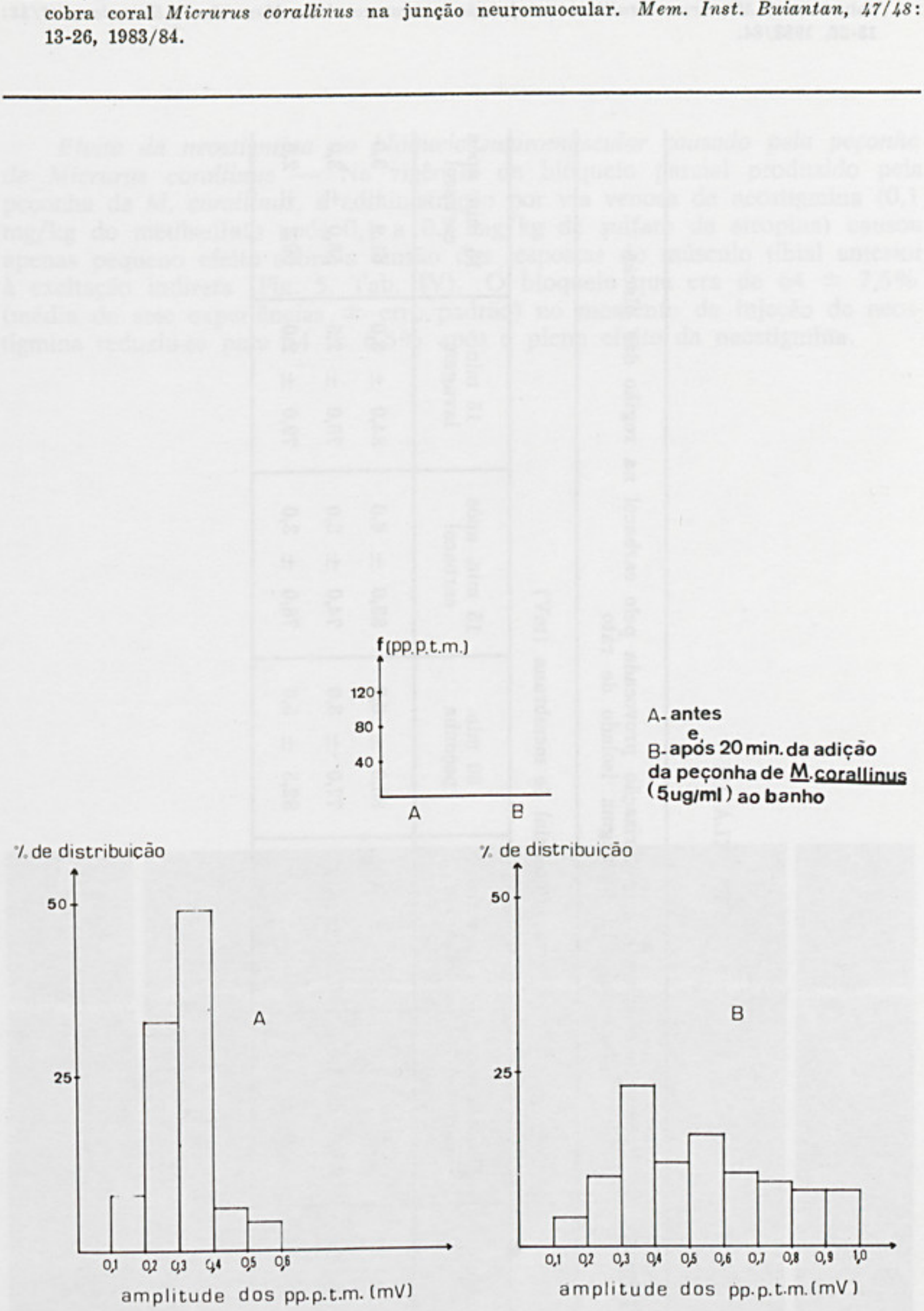


Fig. 4 — Distribuição da amplitude e freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pp.p.t.m.) antes e após 20 minutos da adição de 5 μg/ml de peçonha de *M. corallinus* ao banho.

A despolarização produzida pelo carbacol na região da placa terminal das fibras do diafragma foi inibida reversivelmente pela peçonha na dose de 10 µg/m1 (tabela III).

TABELA III

Efeito da peçonha* de *M. corallinus* sobre a despolarização provocada pelo carbacol na região das placas terminais do diafragma isolado de rato

Exp.	Potencial de membrana (mV)						
	Controle	15 min. após carbacol	15 min. lavagem	30 min. peçonha	15 min. após carbacol	15 min. lavagem	15 min. após carbacol
1	87,0 ± 2,8	61,0 ± 4,0	81,0 ± 7,0	83,0 ± 6,0	83,0 ± 6,0	84,0 ± 3,0	61,9 ± 3,9
2	79,2 ± 2,0	58,0 ± 3,0	77,0 ± 4,0	77,0 ± 3,0	74,0 ± 2,0	75,0 ± 2,5	58,0 ± 3,0
3	84,4 ± 4,0	60,0 ± 3,0	81,3 ± 2,5	82,5 ± 5,0	78,0 ± 3,0	79,0 ± 2,0	59,5 ± 2,0

* 10 μg/ml

Efeito da neostigmina no bloqueio neuromuscular causado pela peçonha de Micrurus corallinus — Na vigência de bloqueio parcial produzido pela peçonha de *M. corallinus,* a administração por via venosa de neostigmina (0,1 mg/kg do metilsulfato após 0,1 a 0,2 mg/kg de sulfato de atropina) causou apenas pequeno efeito sobre a tensão das respostas do músculo tibial anterior à excitação indireta (Fig. 5, Tab. IV). O bloqueio que era de 64 ± 7,5% (média de sete experiências ± erro padrão) no momento da injeção de neostigmina reduziu-se para 54 ± 6,5% após o pleno efeito da neostigmina.

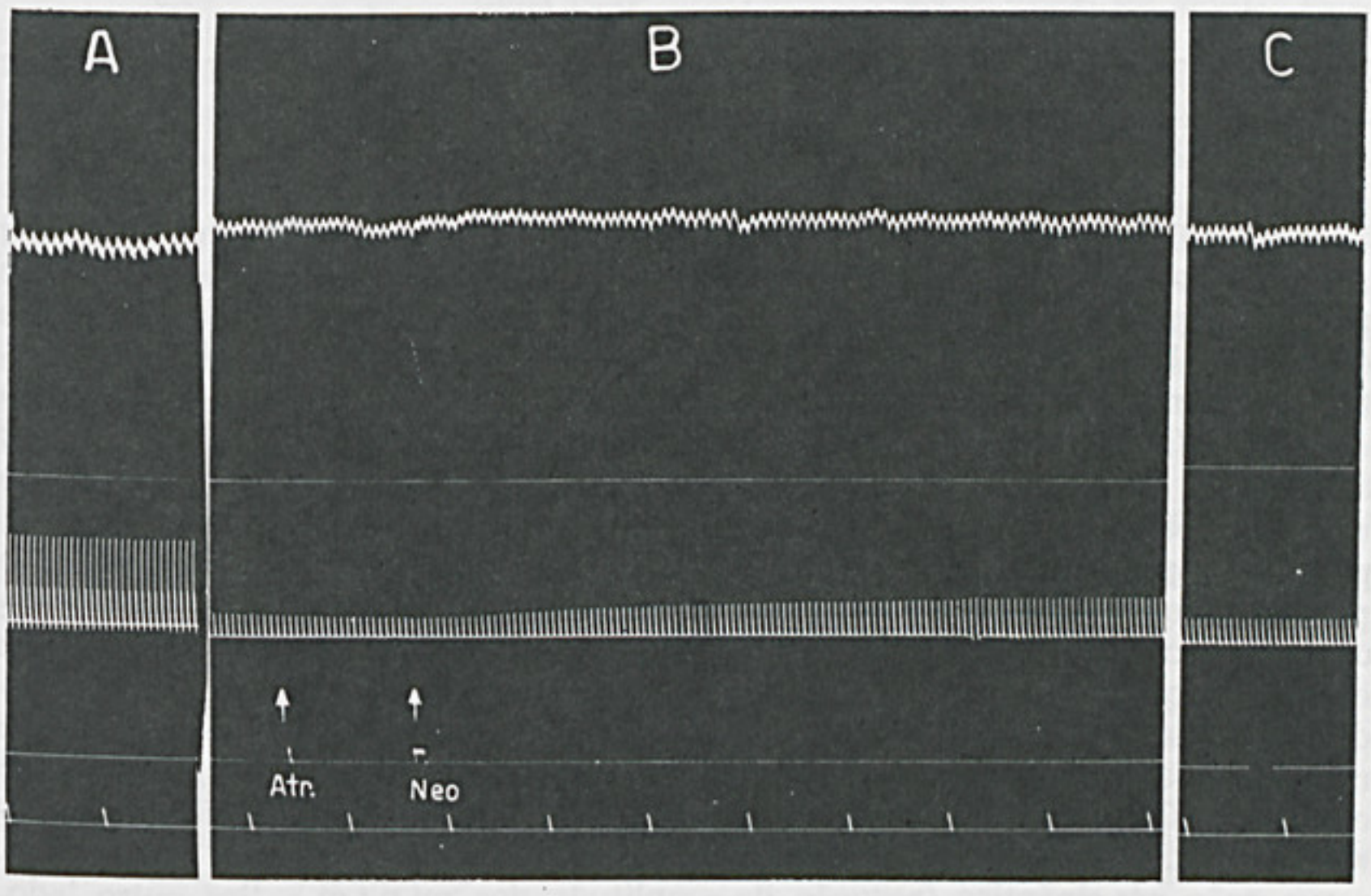


Fig. 5 — Efeito da neostigmina no bloqueio produzido pela peçonha de *Micrurus corallinus* na preparação nervo ciático-músculo tibial anterior *in situ* de cão; A. antes da injeção intramuscular de 0,5 mg/kg da peçonha, B. 90 min. após. Atr. 0,2 mg/kg de sulfato de atropina i.v., Neo 0,1 mg/kg de metilsulfato de neostigmina i.v. Estimulação do ciático popliteo externo com pulsos supramaximais de 0,5 Hz e 0,2 mseg.

TABELA IV

Efeito da neostigmina no bloqueio produzido pela peçonha de *Micrurus corallinus* em cães (preparação *in situ* nervo ciático-músculo tibial anterior)

Exp.	Dose de peçonha (i.m.) mg/kg	% de bloqueio	
		Imediatamente antes da administração de neostigmina	Após a administração de neostigmina (metil-sulfato, 0,1 (mg/kg)
1	0,8	88,4 (90 min.)	71,1
2	0,5	77,7 (90 min.)	73,3
3	0,5	75,0 (120 min.)	55,0
4	0,3	58,8 (240 min.)	47,0
5	0,3	27,7 (180 min.)	22,2
6	0,3	54,1 (215 min.)	50,0
7	0,3	66,6 (223 min.)	58,3

DISCUSSÃO

Verificou-se, na presente pesquisa, que, imediatamente após o bloqueio produzido pela peçonha de *M. corallinus* na preparação nervo frênico-diafragma de rato, a liberação espontânea de ACh achava-se extraordinariamente aumentada enquanto a causada pela estimulação elétrica do nervo frênico encontrava-se muito diminuída. O resultado destas experiências demonstra, portanto, que a peçonha exerce ação pré-sináptica e sugere que é ela a principal causa do bloqueio. Reforça esta última hipótese, o fato de ser irreversível o bloqueio provocado pela peçonha na preparação nervo frênico-diafragma enquanto são prontamente reversíveis as suas ações pós-sinápticas: inibição reversível da contratura causada pela ACh no hemidiafragma cronicamente desnervado e da despolarização pelo carbacol nas regiões de placas terminais de fibras do diafragma inervado. Caso a ação pós-sináptica da peçonha participasse de modo relevante na gênese do bloqueio, deveria ser este, pelo menos, parcialmente reversível. O estudo do efeito da peçonha sobre os pp.p.t.m. confirma plenamente sua ação pré-sináptica (aumento da freqüência dos pp.p.t.m.) e, também, a sua ação pós-sináptica (redução da amplitude dos pp.p.t.m.). Por outro lado, a peçonha de *M. corallinus* não altera o potencial de membrana das fibras musculares como o faz, por exemplo, a de *M. fulvius* (Weiss & Mac-Issaac, 1971). Não altera também a excitabilidade muscular mesmo em doses elevadas (20 μg/m1). Não deve conter, pois, componentes miotóxicos.

Poder-se-ia supor que a mesma ou as mesmas neurotoxinas da peçonha de *M. corallinus* exercessem as ações pré e pós-sinápticas acima referidas. Esta hipótese pode ser, entretanto, facilmente afastada. A ação pré-sináptica é, como vimos, irreversível enquanto a pós-sináptica mostrou-se reversível. É pouco provável que uma mesma neurotoxina combine-se reversivelmente com os receptores para a acetilcolina da placa terminal e, ao mesmo tempo, atue irreversivelmente nas terminações nervosas. Sabe-se, por outro lado, que algumas peçonhas elapídicas tais como a da *Bungarus multicinctus* de Formosa (Chang & Lee, 1963) e a de *Notechis scutatus* da Austrália (Karlsson *et al,* 1972, Datyner e Gage, 1973, Harris *et al,* 1973) encerram neurotoxinas de ação pré-sináptica ao lado das de ação pós-sináptica, as quais, segundo parece, encontram-se em todas ou quase todas as peçonhas de serpentes pertencentes a essa família. Esses fatos permitem-nos afirmar que a peçonha de *M. corallinus* contém neurotoxinas de ação farmacológica distinta: uma ou umas atuam nas terminações nervosas, outra ou outras fixam-se reversivelmente nos receptores colinérgicos de placa terminal.

A investigação do efeito da neostigmina no bloqueio produzido pela peçonha de *M. corallinus,* realizada na preparação nervo ciático-músculo tibial anterior de cão, mostrou que, na vigência do bloqueio parcial causado pela peçonha, a droga anticolinesterásica provoca apenas ligeiro aumento das respostas do músculo à excitação indireta. Este resultado contrasta com o obtido na pesquisa do efeito antagônico da neostigmina no bloqueio produzido pela peçonha de *M. frontalis* (Vital Brazil *et al.,* 1976/1977). Pode-se inferir, pois, que a ação pré-sináptica da peçonha de *M. corallinus* deve preponderar sobre a pós-sináptica na gênese do bloqueio neuromuscular que induz no cão. A ação pós-sináptica desta peçonha é, com efeito, prontamente reversível mesmo no diafragma cronicamente desnervado de rato em que a de *M. frontalis* é irreversível. Portanto, se o bloqueio decorresse preponderantemente da ação pós-sináptica, a neostigmina deveria causar efeito antagônico acentuado. A neostigmina, em virtude de sua ação no bloqueio da transmissão neuromuscular produzida pela peçonha de *M. frontalis,* é eficaz no tratamento do envenenamento experimental, em cães, causado pelo veneno desta espécie de cobra coral (Vital Brazil *et al.,* 1976/1977). Deve-se, portanto, esperar igual eficácia no tratamento dos acidentes provocados pela *M. frontalis* no homem. Os resultados da presente pesquisa mostram, por outro lado, que pequeno ou nenhum benefício é de se esperar de administração de neostigmina em casos de acidentes pela *M. corallinus.* Deve-se, entretanto, ter presente que, na gênese do bloqueio, há a possibilidade de a ação preponderante ser a pós-sináptica em peçonha de serpentes dessa espécie, de certas regiões, dada a extensão de sua distribuição geográfica na América do Sul.

ABSTRACT: The actions exerted at the neuromuscular junction and the muscle fibre membrane by the venom of *Micrurus corallinus*, a coral snake species of large distribution in Brazil, were studied in the isolated rat phrenic nerve-diaphragm preparation and the isolated and chronically denervated rat hemidiaphragm. It was found that the venom produces an irreversible neuromuscular blockade, reduces the evoked acetylcholine release and increases the spontaneous one. The responses of the denervated hemidiaphragm produced by acetylcholine were reversibly blocked by the venom. It did not alter either the resting membrane potential or the muscle fibre membrane excitability of the rat diaphragm. Miniature end-plate potential frequency was greatly increased by low concentrations of

the venom. Their amplitude was at first increased but later on decreased. The venom at last blocked the m.e.p.ps. Depolarization induced by carbachol at the end-plate region of the diaphragm was reversibly blocked by the venom. It is concluded that *M. corallinus* venom exerts both presinaptic and postsynaptic actions, being devoid of myotoxic properties. The irreversible presynaptic action and the reversible postsynaptic action must be ascribed to two different venom neurotoxins: presynaptic neurotoxin(s) and postsynaptic neurotoxin(s). The effect of neostigmine on the neuromuscular blockade induce by *M. corallinus* venom was investigated in the dog sciatic nerve-tibialis anterior muscle preparation, neostigmine being i.v. injected when there was a partial (64 ± 7.5%, mean of seven experiments ± S.E.M.) neuromuscular block. The antagonistic effect was very poor (54 ± 6.5% blockade after neostigmine administration). This result suggests that the venom presynaptic action is the main cause of the blockade.

KEYWORDS: Neuromuscular junction; coral snake venom; presynaptic action; postsynaptic action; acetylcholine; neostigmine.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG, C. C. & LEE, C. Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their mode of neuromuscular blocking action. *Arch. Int. Pharmacodyn., 144*:241-257, 1963.

DATYNER, M. E. & GAGE, P. W. Presynaptic and postsynaptic effects of the venom of the Australian tiger snake at the neuromuscular junction. *Br. J. Pharmac., 49*:340-354, 1973.

HARRIS, J. B.; KARLSSON, E. & THESLEFF, S. Effects of an isolated toxin from Australian tiger snake *(Notechis scutatus scutatus)* venom at the mammalian neuromuscular junction. *Br. J. Pharmac., 47*:141-146, 1973.

HOGE, A. R. & ROMANO, S. A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil (Serpentes Elapidae e Viperidae). *Mem. Inst. Butantan, 36*:109-208, 1972.

KARLSSON, E.; EAKER, D. & RYDÉN, L. Purification of a presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon, 10*:405-413, 1972.

PATON, W. D. M. & VIZI, E. S. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guineapig longitudinal muscle strip. *Brit. J. Pharmac., 35*:10-28, 1969.

ROZE, J. A. New world coral snakes (Elapidae): a taxonomic and biological summary. I International Symposium on Snakes and Venomous Arthropods. *Mem. Inst. Butantan, 46*:305, 1982.

VITAL BRAZIL, O. Ação neuromuscular da peçonha de Micrurus. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1963 (Publ. em *O. Hospital, 68*:183, 1965).

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D. & PELLEGRINI FILHO, A. Physiopathologie et therapeutique de l'envenomation experimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis. Mem. Inst. Butantan, 40/41*:221-240, 1976/77.

WEIL, C. S. Tables for the convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instruction in their use. *Biometrics, 8*:249-263, 1952.

WEISS, R. & MCISSAC, R. J. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius. Toxicon, 9*:219-228, 1971.

Recebido para publicação em 26/07/1983 e aceito em 07/08/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:27-32, 1983/84

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO VENENO DE *PHONEUTRIA NIGRIVENTER* EM TERMOS DE DL_{50} E TITULAÇÃO DO ANTIVENENO EM CAMUNDONGOS

Regina Maria Barretto CICARELLI *
Medardo SILES VILLARROEL **
Raymundo ROLIM ROSA ***

RESUMO: A toxicidade do veneno de *Phoneutria nigriventer* é determinada em camundongos, através de inoculações intravenosa e intraperitoneal. Seguindo a mesma metodologia, avalia-se a capacidade neutralizante do antiveneno aracnídico polivalente, fração antiveneno de *Phoneutria*, por inoculação intravenosa em camundongo. Os resultados sugerem que a metodologia proposta, apresenta-se como técnica prática, econômica e reprodutível para a titulação do veneno e antiveneno estudados.

PALAVRAS-CHAVE: veneno de *Phoneutria nigriventer*; antiveneno aracnídico.

INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Phoneutria* Perty, 1833 pertencem à família *Ctenidae,* subfamília *Phoneutriinae Bücherl,* 1969. São conhecidas popularmente com o nome de "aranhas-armadeiras". Seu veneno é bastante ativo e de propriedades neurotóxicas semelhantes às do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* [3, 4].

Brazil & Vellard [1, 2] (1925, 1926) fizeram experiências com os venenos de *Phoneutria fera* e *Phoneutria nigriventer* (denominadas por eles de *Ctenus fera* e *Ctenus nigriventer,* respectivamente), concluindo que os mesmos são dotados de ação neurotóxica, porém destituídos de ação local. Determinaram a Dose Mínima Mortal (DMM em cobaias, camundongos e coelhos, bem como prepararam, pela primeira vez, o soro antictênico específico, titulando-o em coelhos de 1 kg de peso, em termos de neutralização da DMM do veneno).

* Professora Assistente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

** Professor Livre Docente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

*** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Endereço para correspondência: Departamento de Imunologia — Edifício Biomédicas III — Cidade Universitária — CEP 05508 — São Paulo-SP.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Phoneutria nigriventer* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:27-32, 1983/84.

Na atualidade, a atividade tóxica do veneno de *Phoneutria* e a capacidade neutralizante da fração de antiveneno de *Phoneutria* no soro antiaracnídico polivalente são determinadas não mais em coelhos, mas em cobaias de 350 a 400 g, que recebem inoculações das misturas por via subcutânea e são observadas durante 48 horas.

No presente trabalho, os autores se propõem a determinar a atividade tóxica desse veneno, extraído por estímulo elétrico, em termos de DL_{50}, utilizando as vias intravenosa e intraperitoneal em camundongos e, além disso, verificar a possibilidade de utilização da via intravenosa de camundongos para doseamento da fração antiveneno de *Phoneutria* do soro antiaracnídico polivalente.

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno utilizado *

Os venenos de *Phoneutria nigriventer* Perty, 1833 foram extraídos por estimulação elétrica e dessecados a vácuo, segundo a técnica de Bücherl [3] (1953).

Antiveneno aracnídico polivalente *

No soro antiaracnídico (antiaranêico e antiescorpiônico) a fração antiaranêica foi obtida pela hiperimunização de cavalos [10] com mistura imunogênica constituída por triturado de cefalotórax de *Loxosceles* e *Lycosa* e com veneno obtido por estímulo elétrico de *Phoneutria.* A fração antiescorpiônica foi obtida pela hiperimunização de cavalos [10] com venenos obtidos por estímulo elétrico de espécimes dos gêneros *Tityus.*

O antiveneno foi purificado e concentrado pelo método de Pope [8] (1938) e Pope [9] (1939), modificado por Furlanetto [6] (1961).

Os títulos do soro apresentados na fração aranêica eram os seguintes: 1 ml de soro neutralizava 10 DMN do veneno loxoscélico, 1,5 DMM do veneno de *Phoneutria* e 15 DMN do veneno licósico.

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos brancos *(Mus musculus* Linnaeus, 1758), de ambos os sexos, pesando 20g ± 2g. Estes animais receberam inoculações pelas vias intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP), no volume de 0,5 ml. Foram utilizados lotes de 6 camundongos por dose que, após as inoculações, foram observados por um período máximo de 48 horas, com leituras parciais aos 30 e 60 minutos e 24 horas.

Determinação da DL_{50} do veneno

Foi realizada de acordo com o método de Kärber [7] (1931).

Doseamento do antiveneno

Na avaliação da potência do antiveneno foi mantido constante o volume do imunossoro diluído a 1/2, variando as doses do veneno.

* Fornecido pelo Instituto Butantan.

A mistura veneno-antiveneno, após incubação a 37°C por 30 minutos, foi inoculada nos camundongos.

Os resultados foram expressos em termos de mg e de DL_{50} de veneno neutralizado por 1 ml de antiveneno, baseando-se na técnica experimental utilizada por Siles Villarroel [11] (1977), Siles Villarroel e cols. [12] (1978/9 e Siles Villarroel e cols. [13] (1978/9), no estudo de antivenenos botrópicos.

RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados da determinação da DL_{50} do veneno de *P. nigriventer* inoculado pela via IV e pela via IP, respectivamente.

TABELA 1

Determinação da DL_{50} do veneno de *P. nigriventer*, inoculado pela via intravenosa em camundongos

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	5,00	7,50	11,25	16,87	25,31	37,97	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	1/6	4/6	6/6	6/6	
60 minutos	0/6	0/6	3/6	5/6	—	—	
24 horas	0/6	0/6	3/6	5/6	—	—	11,50 μg
48 horas	0/6	0/6	3/6	5/6	—	—	11,50 μg

TABELA 2

Determinação da DL_{50} do veneno de *P. nigriventer*, inoculado pela via intraperitoneal em camundongos

Tempos de observação	Doses em microgramas					
	10,0	20,0	40,0	80,0	160,0	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	2/6	3/6	6/6	
24 horas	0/6	2/6	4/6	6/6	—	28,29 μg
48 horas	0/6	2/6	4/6	—	—	28,29 μg

A tabela 3 apresenta os resultados dos ensaios para a determinação do título neutralizante do imunossoro específico, através da via IV.

TABELA 3

Doseamento do antiveneno aracnídico, colocado frente ao veneno de *P. nigriventer* e inoculado pela via intravenosa em camundongos

Veneno de *P. nigriventer* (DL_{50} = 11,50 µg)		Solução salina	Antiveneno aracnídico	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml	ml	ml		24 h	48 h
0,05	0,05	0,20	0,25	37°C	0/6*	0/6*
0,10	0,10	0,15	0,25		6/6	—
0,15	0,15	0,10	0,25	x	6/6	—
0,20	0,20	0,05	0,25	30 min	6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno aracnídico neutraliza 0,40 mg ou 34,78 DL_{50} do veneno de *P. nigriventer*

DISCUSSÃO

O uso de camundongos que sofreram inoculações intravenosa e intraperitoneal possibilitou a determinação da DL_{50} do veneno de *P. nigriventer* que, em dois experimentos, demonstrou reprodutibilidade satisfatória.

Apesar da ocorrência de mortes após 30 e 60 minutos, as mesmas não interferiram na regularidade das mortes observadas em função do aumento das doses. Em ambos os ensaios, foi possível determinar satisfatoriamente a DL_{50}, tanto pela via intravenosa (11,50 µg em 48 horas) como pela via intraperitoneal (28,29 µg em 48 horas). Observamos, também, que os animais apresentaram uma sensibilidade maior ao veneno quando este foi inoculado pela via intravenosa.

Nossos resultados mostraram-se diferentes daqueles obtidos por Bücherl [3, 5] (1953, 1956), que obteve uma DL_{50} de 7 µg por via intravenosa, enquanto que, para a via subcutânea, foi de 14 µg. Essa diferença pode ser compreendida quando se leva em consideração a metodologia de obtenção dos venenos, a época de extração do veneno e, também, a idade e o estado nutricional dos espécimes, fatores esses que podem alterar a atividade do veneno.

Até o presente momento, não existem normas ou padrões para a determinação da atividade tóxica desse veneno. Atualmente, a sua titulação vem sendo realizada em termos de Dose Mínima Mortal (DMM) por inoculação subcutânea em cobaias de 350 a 400 g de peso e observadas por 48 horas. Esse método exige um consumo maior de veneno e utilização de animais de maior custo, tornando-se antieconômico quando cotejado como a determinação da DL_{50}.

Com relação ao doseamento do soro antiaracnídico (fração antiveneno de *Phoneutria)* o mesmo raciocínio anterior é válido.

CONCLUSÕES

1. A atividade tóxica do veneno de *Phoneutria nigriventer* pode ser convenientemente padronizada em termos de DL_{50}, para as vias intravenosa e intraperitoneal de camundongos;

2. o antiveneno aracnídico polivalente pode ser titulado satisfatoriamente pela inoculação intravenosa da mistura veneno-antiveneno, cujo resultado seria finalmente expresso em mg ou número de DL_{50} de veneno, neutralizado por ml do antiveneno.

ABSTRACT: Toxicity of *Phoneutria nigriventer* venom in mice is determined through intravenous and intraperitoneal inoculations. According to the same methodology the neutralization capacity of the fraction of *Phoneutria* spider polyvalent antivenin is value, through intravenous inoculation in in mice. The results seem suggest that for the venom and antivenin titration, the methodology used is practical, economic and reproducible.

KEYWORDS: *Phoneutria nigriventer* venom, spider antivenin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan, 2*:5-78, 1925.

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan, 3*:243-301, 1926.

BÜCHERL, W. Novo processo de obtenção de veneno seco, puro, de *Phoneutria nigriventer* Keyserling, 1891 e titulação da LD_{50} em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 25*:153-74, 1953.

BÜCHERL, W. Dosagem comparada da atividade dos extratos glandulares e do veneno puro de *Phoneutria nigriventer* Keyserling, 1891. *Mem. Inst. Butantan, 25*:1-19, 1953.

BÜCHERL, W. *Studies on dried venom of Phoneutria fera.* Perty, 1833. In: VENOMS. Eds. E. Buckley and W. Porges. Washington, 1956. (AAAS Publication n.º 44), p. 95.

FURLANETTO, R. S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. (Tese de Livre-Docência — Faculdade de Farmácia e Odontologia da USP).

KÄRBER, G. Beitrag zur kollectiven Behand-lung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., 162*:480-3, 1931.

POPE, C. G. Disaggregation of proteins by enzimes. *Br. J. Exp. Pathol., 19*:245-51, 1938.

POPE, C. G. The actions of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immunesera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Br. J. Exp. Pathol., 20*:201-12, 1939.

ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M.; VIEIRA, E. G. J.; IIZUKA, H. & NAVAS, J. Produção do soro antiaracnídico polivalente mediante inoculações simultâneas de venenos em um mesmo animal. *Mem. Ins. Butantan, 44/45*:253-8, 1980/81.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Phoneutria nigriventer* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:27-32, 1983/84.

SILES VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos*. São Paulo, 1977 (Tese de Livre-Docência — Instituto de Ciências Biomédicas da USP).

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-23, 1978/9.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; GUIDOLIN, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:337-44, 1978/9.

Recebido para publicação em 14/10/1983 e aceito em 12/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:33-43, 1983/84

ESTUDO IMUNOQUíMICO DOS VENENOS ARANêICOS DAS ESPÉCIES *LOXOSCELES GAUCHO, PHONEUTRIA NIGRIVENTER* E *LYCOSA ERYTHROGNATHA*

Regina Maria Barretto CICARELLI *
Medardo SILES VILLARROEL **
Rosalvo GUIDOLIN ***
Omar CRIVELLARO ****

RESUMO: Os autores estudam o comportamento eletroforético e imunoquímico dos venenos das espécies *Loxosceles gaucho, Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha*.

Através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, demonstram a presença de onze frações no veneno de *Loxosceles* gaucho e 8 frações nos venenos de *Phoneutria nigriventer* e de *Lycosa erytrognatha*, verificando que os três venenos têm comportamento eletroforético distinto.

Utilizando as reações de imunodifusão e imunoeletroforese em gel de ágar, pode-se determinar o número de componentes imunogênicos específicos e paraespecíficos dos venenos. A imunoeletroforese mostra-se mais adequada na caracterização desses componentes.

Verificam, ainda, a ocorrência de soroneutralização cruzada "in vivo" e "in vitro" entre o antiveneno loxoscélico e os venenos de *P. nigriventer* e *L. erythrognatha*.

PALAVRAS CHAVE: eletroforese em gel de poliacrilamida; imunodifusão e imunoeletroforese; venenos aranêicos.

INTRODUÇÃO

Os venenos das espécies *Loxosceles gaucho, Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha* * foram pouco estudados quanto a seus aspectos imuno-

* Professora Assistente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
** Professor Livre-Docente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
*** Professor Colaborador do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
**** Professor Assistente Doutor do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP.
Endereço para correspondência: Departamento de Imunologia Edifício Biomédicas III — Cidade Universitária — CEP 05508 — São Paulo — SP.

* Essa espécie pode ser também encontrada nos Catálogos com o nome de *Scaptocosa raptoria*.

químicos. Raros são os trabalhos que contêm informes a respeito do número de frações que os compõem, e pequeno é o número de publicações referentes aos seus componentes imunogênicos. No que concerne a estudos sobre eletroforese em gel de poliacrilamida, praticamente inexistem informes que se refiram aos venenos por nós estudados.

Com relação aos componentes imunogênicos do veneno *Loxosceles,* Smith & Micks [25] (1968) trabalharam com os venenos das espécies *L. laeta, L. reclusa* e *L. rufescens* e com o antiveneno loxoscélico preparado pelo Instituto Butantan. Encontraram dois componentes imunogênicos com identidade total nas três espécies e três componentes idênticos entre *L. reclusa* e *L. rufescens.* Os mesmos autores verificaram, através de eletroforese, que os três venenos são distintos entre si. Furlanetto [7] (1961) fez observações sobre a composição imunogênica do veneno loxoscélico em função de seu antiveneno, por imunodifusão em gel, bem como estudou comparativamente, por esta técnica, os venenos de *Lycosa* sp. e *Phoneutria* sp. Assim, identificou quatro componentes imunogênicos no veneno de *Loxosceles* e sugeriu a inexistência de imunidade cruzada, tanto "in vivo" como "in vitro", entre o soro antiloxoscélico por ele preparado e os venenos de *Lycosa* sp. e *Phoneutria* sp.

Selecionamos alguns trabalhos sobre eletroforese em gel de poliacrilamida apenas como fonte de informações a respeito da diversidade de obtenção dos venenos, e metodologia empregada; esses trabalhos referem-se aos venenos das espécies *L. reclusa, L. laeta e Latrodectus mactans* [6, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 20, 27, 28, 29].

Quanto ao veneno de *Phoneutria,* Schenberg & Pereira Lima [21] (1966) estudaram o efeito de 14 determinantes antigênicos do veneno fracionado de *P. fera,* em cães, cobaias, camundongos, ratos e coelhos. Barrio [1] (1955), por eletroforese em papel, identificou duas frações. Fisher & Böhn [5] (1957) e Diniz [3] (1963), por eletroforese e cromatografia em papel, evidenciaram quatro frações, enquanto Pereira Lima & Schenberg [19] (1963), por eletroforese em acetato de celulose, distinguiram nove frações no veneno.

Em relação ao veneno licósico, encontramos apenas os trabalhos de Fisher & Böhn [5] (1957) e Diniz [3] (1963), que realizaram eletroforese e cromatografia em papel, analisando seus componentes ativos e verificando a presença de quatro frações.

Para elucidar melhor esses aspectos, o nosso trabalho tem por objetivos estudar, com os três venenos aranêicos obtidos por estímulo elétrico, os seguintes:

1 — o comportamento eletroforético em gel de poliacrilamida;

2 — as suas frações imunogênicas, através da imunodifusão e imunoeletroforese em gel de ágar;

3 — a soroneutralização cruzada entre o antiveneno loxoscélico e os venenos de *P. nigriventer* e de *L. erythrognatha,* "in vivo" e "in vitro".

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos utilizados

Os venenos utilizados das três espécies de aranhas foram extraídos por estímulo elétrico e foram fornecidos * sob a forma dessecada.

As soluções de venenos foram preparadas a 2% em salina.

Antivenenos específicos e paraespecíficos *

Os soros antiloxoscélico monovalente e antiaracnídico polivalente foram usados não-diluídos nas reações de imunodifusão e imunoeletroforese.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Esta técnica foi conduzida segundo o método de Davis [2] (1964).

Determinação de proteína total dos venenos

Foi realizada segundo o método proposto por Spector [26] (1978), utilizando como reagente o Coomassie Blue G e, como padrão de referência, a soroalbumina bovina (BSA). Para as determinações espectrofotométricas, foi utilizado o espectrofotômetro Gilford, em 595 nm de absorbância. Optamos por esse método porque os nossos ensaios preliminares, realizados com os métodos de Lowry, Biureto, Biureto UV e Büchner, não foram reprodutíveis.

Para todas as corridas eletroforéticas, utilizamos soluções de veneno a 1%, sendo que para o veneno de *Loxosceles gaucho,* aplicamos no gel 40 µl (456,4 µg de proteína), para o de *Phoneutria nigriventer,* 50 µl (553,5 µg de proteína) e, para o de *Lycosa erythrognatha,* 50 µl (286,5 µg de proteína).

Imunodifusão em gel de ágar

Para a realização desta prova, baseamo-nos na técnica original de Ouchterlony [17] (1948) e Ouchterlony [18] (1949), com modificações introduzidas por Siles Villarroel [22] (1972), Siles Villarroel e cols. [23] (1974) e Siles Villarroel e cols. [24] (1976/7).

Imunoeletroforese em gel de ágar

Seguimos as técnicas de Grabar & Williams [9] (1953) e Grabar & Williams [10] (1955), com as modificações propostas por Ferri & Cossermelli [4] (1964), relativas à aparelhagem e técnicas necessárias à adoção do micrométodo por nós utilizado.

Reações de soroneutralização cruzada "in vivo"

Em tais experimentos, utilizamos lotes de seis camundongos *(Mus musculus* Linnaeus, 1738), pesando 20 ± 2 g, que receberam inoculações intravenosas da mistura veneno-antiveneno, previamente incubada por 30 minutos a 37°C. O antiveneno utilizado foi o loxoscélico monovalente e os venenos foram o de *P. nigriventer* e de *L. erythrognatha.* Os resultados foram expressos em mg ou DL_{50} de veneno paraespecífico neutralizado por ml de antiveneno loxoscélico.

RESULTADOS

A tabela 1 e as figuras de 1 a 3 mostram, respectivamente, o número de frações eletroforéticas que constituem os venenos e os eletroferogramas dos venenos estudados.

* Fornecidos pelo Instituto Butantan.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M.; GUIDOLIN, R. & CRIVELLARO, O. Estudo imunoquímico dos venenos aranêicos das espécies *Loxosceles gaucho, Phoneutria nigriventer* e *Lâcosa erythrognatha. Mem. Inst. Butantan, 47/48*:33-43, 1983/84.

TABELA 1

Comportamento eletroforético, em EGP, dos três venenos aranêicos

Venenos	N.º de frações
Loxosceles gaucho	11
Phoneutria nigriventer	8
Lycosa erythrognatha	8

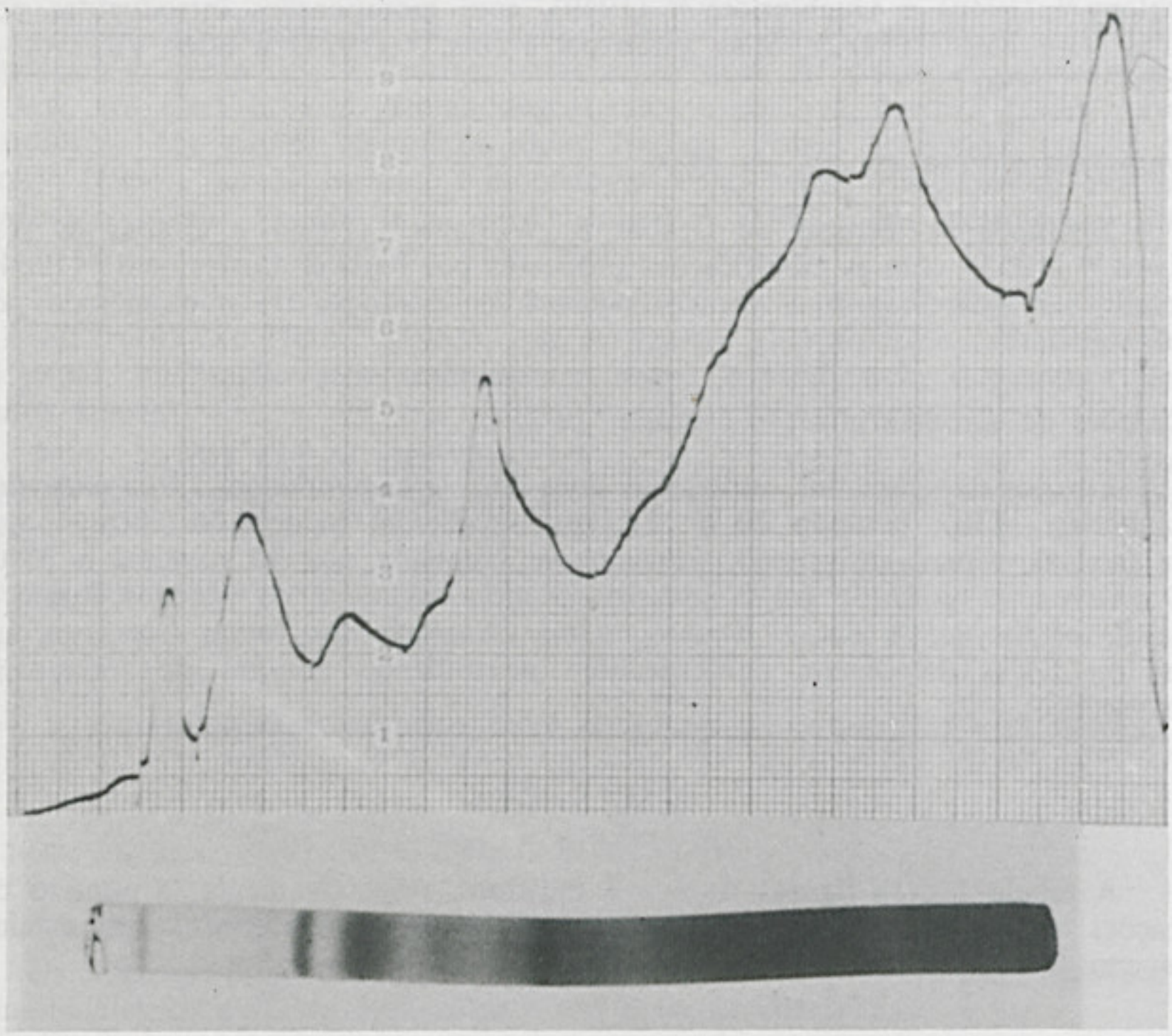


Fig. 1 — Eletroferograma do veneno de *Loxosceles gaucho*

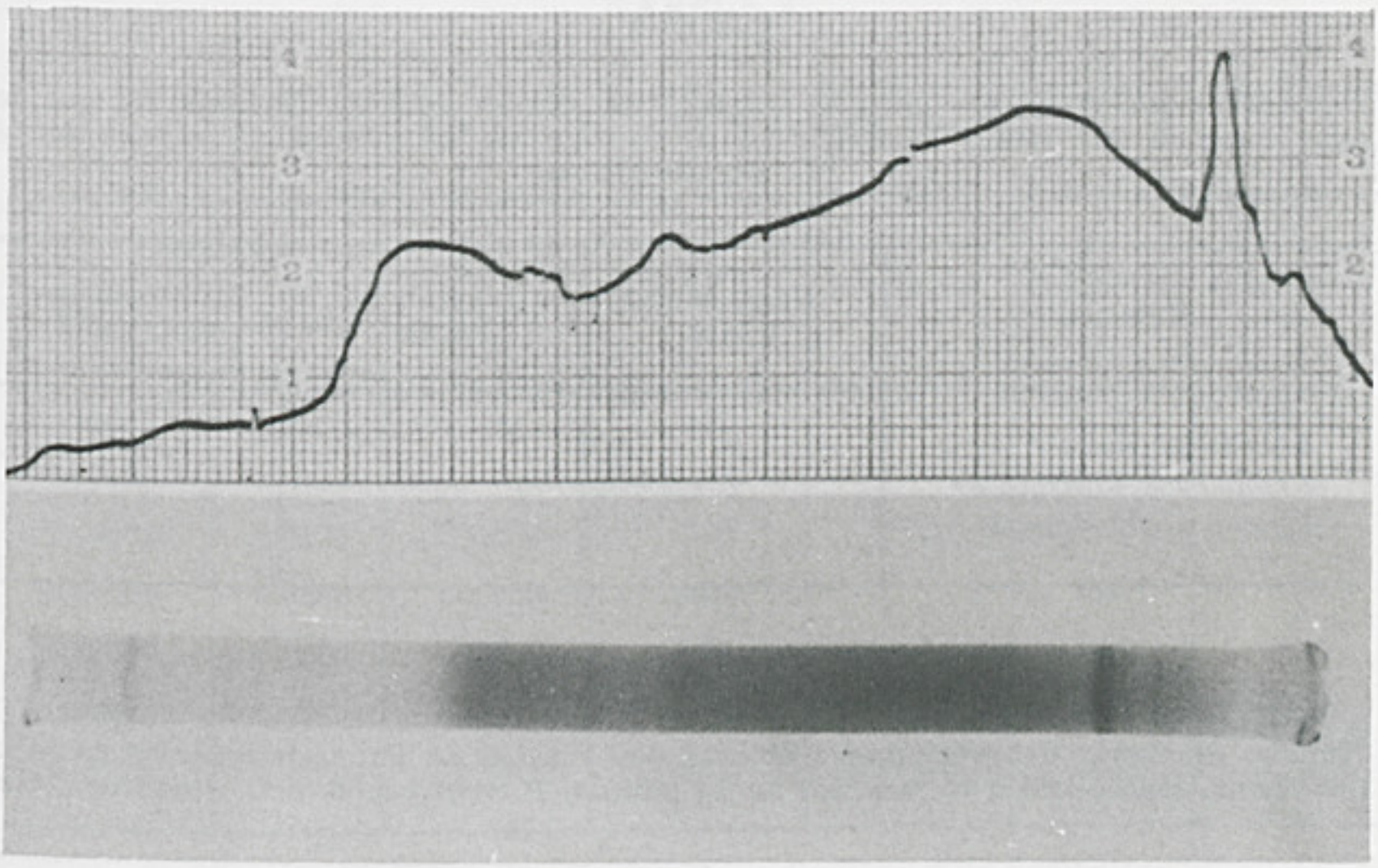


Fig. 2 — Eletroferograma do veneno de *Phoneutria nigriventer*

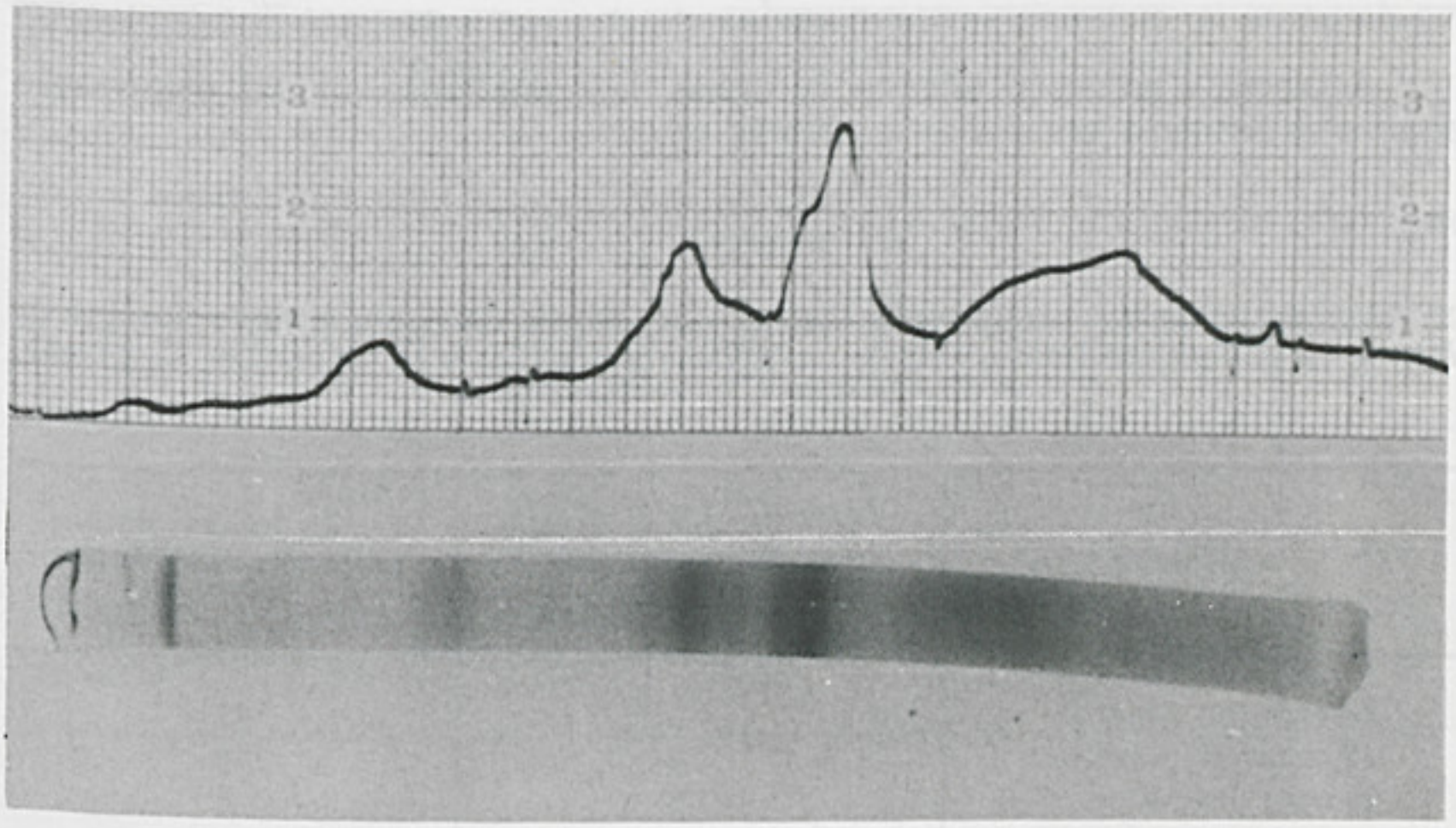


Fig. 3 — Eletroferograma do veneno de *Lycosa erythrognatha*

Os tabelas 2 e 3 apresentam o número de linhas de precipitação obtidas pela reação entre o antiveneno loxoscélico e os venenos de *L. gaucho, P. nigriventer* e *L. erythrognatha.*

TABELA 2

Número de linhas de precipitação obtidas nas reações de dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno loxoscélico e os venenos de *L. gaucho, P. nigriventer* e *L. erythrognatha*

Venenos	Número de linhas	Identidade Parcial	Ausência de Identidade
Loxosceles gaucho	5	—	—
Phoneutria nigriventer	2	1	1
Lycosa erythrognatha	1	1	—

TABELA 3

Número de linhas de precipitação obtidas nas reações de imunoeletroforese entre o antiveneno loxoscélico e os venenos de *L. gaucho, P. nigriventer* e *L. erythrognatha*

Venenos	N.º de linhas
Loxosceles gaucho	11
Phoneutria nigriventer	2
Lycosa erythrognatha	1

A tabela 4 mostra o número de linhas de precipitação obtidas pela reação entre o antiveneno aracnídico e os três venenos.

TABELA 4

Número de linhas de precipitação obtidas nas reações de dupla difusão em gel de ágar e na imunoeletroforese, entre o antiveneno aracnídico e os venenos de *L. gaucho, P. nigriventer* e *L. erythrognatha*

Venenos	N.º de linhas obtidas na dupla difusão em gel de ágar	N.º de linhas obtidas na imunoeletroforese
Loxosceles gaucho	5	11
Phoneutria nigriventer	6	13
Lycosa erythrognatha	2	4

As tabelas 5 e 6 apresentam os resultados dos testes de soroneutralizações cruzadas "in vivo".

TABELA 5

Doseamento do antiveneno loxoscélico, colocado frente ao veneno de *P. nigriventer* e inoculado pela via intravenosa em camundongos

Veneno de *P. nigriventer* (DL_{50} = 11,50 μg)		Solução salina	Antiveneno loxoscélico	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml	ml	ml		24 h	48 h
0,00125	0,0125	0,2375	0,25	37°C	0/6	0/6
0,00250	0,0250	0,2250	0,25		0/6	0/6
0,00500	0,0500	0,2000	0,25	x	0/6	0/6
0,00750	0,0750	0,1750	0,25		0/6*	0/6*
0,01000	0,1000	0,1500	0,25	30 min	6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *Loxosceles gaucho* neutralizada 0,060 mg ou 5,22 DL_{50} do veneno de *P. nigriventer*

TABELA 6

Doseamento do antiveneno loxoscélico, colocado frente ao veneno de *L. erythrognatha* e inoculado pela via intravenosa em camundongos

Veneno de *L. erythrognatha* (DL_{50} = 294,90 μg)		Solução salina	Antiveneno loxoscélico	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml	ml	ml		24 h	48 h
0,040	0,0040	0,2460	0,25	37°C	0/6	0/6
0,080	0,0080	0,2420	0,25		0/6	0/6
0,160	0,0160	0,2340	0,25	x	0/6*	0/6*
0,320	0,0320	0,2180	0,25	30 min	3/6	3/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *Loxosceles gaucho* neutraliza 1,28 mg ou 4,34 DL_{50} do veneno de *L. erythrognatha*

Para facilitar a análise dos resultados acima, apresentamos a tabela 7 que resume os títulos encontrados.

TABELA 7

Resumo dos títulos obtidos com o antiveneno loxoscélico frente aos venenos das três espécies de aranhas; os títulos neutralizantes estão expressos em mg/ml e apresentam a correspondência em termos de DL_{50}/ml

Venenos	Títulos do antiveneno loxoscélico (mg/ml)	Títulos do antiveneno loxoscélico (DL_{50}/ml)
Loxosceles gaucho	1,60	244,27
Phoneutria nigriventer	0,06	5,22
Lycosa erythrognatha	1,28	4,34

DISCUSSÃO

Conforme os resultados constantes da tabela 1 e ilustrados pelas figuras, caracterizamos onze frações no veneno loxoscélico, oito frações no veneno de *Phoneutria* e oito frações no veneno licósico; os eletroferogramas apresentaram-se distintos entre si.

Alguns autores realizaram eletroforese em gel de poliacrilamida dos venenos de *Loxosceles* [6, 8, 11, 13, 14, 27, 28] e encontraram um número de frações que variou de cinco e treze, na dependência do tipo de extração do veneno e da metodologia utilizada.

A falta de uniformidade na forma de extração do veneno empregado, a diversidade de metodologia, bem como a utilização de espécies diferentes, não permitiram uma comparação entre os resultados. O mesmo vale para os nossos resultados com os venenos de *P. nigriventer* e *L. erythrognatha.*

Na reação de imunodifusão (tabela 2), verificamos a formação de duas linhas de precipitação entre o antiveneno loxoscélico e o veneno de *P. nigriventer,* sendo uma com identidade parcial e outra com ausência de identidade em relação ao veneno loxoscélico. Estes resultados são idênticos àqueles obtidos por Furlanetto [7] (1961). Na reação entre o antiveneno e o veneno loxoscélico, cinco linhas de precipitação foram evidenciadas.

Em relação ao antiveneno loxoscélico e o veneno de *L. erythrognatha,* constatamos a presença de apenas u'a linha de precipitação com identidade parcial ao veneno loxoscélico. A positividade dessa reação cruzada, explica a neutralização parcial também observada por nós (tabela 6).

Nas reações de imunoeletroforese entre o antiveneno loxoscélico e os três venenos aranêicos (tabela 3), verificou-se a presença de onze linhas de precipitação com o venono loxoscélico, duas linhas com o veneno de *P. nigriventer* e uma com o veneno de *L. erythrognatha.*

Conforme consta da tabela 4, foram evidenciadas cinco linhas de precipitação por imunodifusão em gel de ágar entre o antiveneno aracnídico e o

veneno de *Loxosceles gaucho*. Por outro lado, por imunoeletroforese, foi-nos possível demonstrar onze linhas. O mesmo antiveneno, quando colocado frente aos venenos de *Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha,* permitiu demonstrar seis e duas linhas de precipitação por imunodifusão e treze e quatro linhas por imunoeletroforese, respectivamente.

Schenberg & Pereira Lima [21] (1960), realizando a imunoeletroforese em gel de ágar do veneno de *Phoneutria fera,* obtido por estímulo elétrico, demonstraram 14 linhas de precipitação, resultado este que se assemelha àquele por nós encontrado.

Pelos nossos resultados, conclui-se que a imunoeletroforese é mais adequada do que a imunodifusão em gel de ágar para a caracterização do número de determinantes antigênicos, fato observado também por Siles Villarroel [22] (1972) e Siles Villarroel e cols. [23, 24] (1974 e 1976/7), com serpentes do gênero botrópico.

CONCLUSÕES

1. A eletroforese em gel de poliacrilamida não só revela maior número de frações do que o relatado na literatura, com outras técnicas, como também permite distinguir claramente os três venenos estudados. Parece-nos, assim, ser o método mais adequado para a separação dos diversos componentes desses venenos;

2. através das reações de imunodifusão e, principalmente, de imunoeletroforese em gel de ágar, é possível determinar o número de componentes antigênicos específicos e paraespecíficos dos venenos estudados;

3. ocorre soroneutralização cruzada entre o antiveneno loxoscélico e os venenos de *Phoneutria nigriventer* e de *Lycosa erythrognatha* "in vivo", resultado este confirmado "in vitro" pelas técnicas imunoquímicas utilizadas.

ABSTRACT: The authors study the electrophoretic and immunochemistry behaviour of the *Loxosceles gaucho, Phoneutria nigriventer* and *Lycosa erythrognatha* venoms. Through polyacrylamide gel electrophoresis technic as showed, the presence of 11 fractions in *Loxosceles gaucho* venom and of 8 fractions in *Phoneutria nigriventer* and *Lycosa erythrognatha* venoms. By this way, they verify a distinct electrophoretic behaviour between these venoms. More than this, immunodiffusion and immunoelectrophoresis in agar gel technics were utilized to determine, the number of specific and nonspecific immunogenic components of the venoms. It was also verifyed crossed "in vivo" and "in vitro" serum neutralization between loxoscelic antivenin and *P. nigriventer* and *L. erythrognatha* venoms.

KEYWORDS: polyacrylamide gel electrophoresis; immunoelectrophoresis and immunodiffusion; spider venom.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRIO, A. Spastic action of the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Acta. Physiol. Lat. Am., 5*:132-43, 1955.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 121*:404-27, 1964.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M.; GUIDOLIN, R. & CRIVELLARO, O. Estudo imunoquímico dos venenos aranêicos das espécies *Loxosceles gaucho, Phoneutria nigriventer* e *Lâcosa erythrognatha*. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:33-43, 1983/84.

DINIZ, C. R. Separação de proteínas e caracterização de substâncias ativas em venenos de aranhas do Brasil. *An. Acad. Bras. Ciênc., 35*:283-91, 1963.

FERRI, R. G. & COSSERMELLI, W. Analyse immuno-eletrophorétique. Micro e macro méthodes. *Rev. Fr. Étud. Clin. Biol., 9*:134-8, 1964.

FISHER, F. G. & BOHN, H. Die giftsekrete der brasilianischen Tarantel *Lycosa erythrognatha* und der Wanderspinne *Phoneutria fera*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 306*:265-8, 1957.

FOIL, L. D. & NORMENT, B. R. Envenomation by *Loxosceles reclusa*. *J. Med. Entomol., 16*:18-25, 1979.

FURLANETTO, R. S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico*. São Paulo, 1961. (Tese de Livre-Docência — Faculdade de Farmácia e Odontologia da USP).

GEREN, C. R.; CHAN, T. K.; WARD, B. C.; HOWELL, D. E.; PINKSTON, K. & ODELL, G. V. Composition and properties of extract of fiddleback (*Loxosceles reclusa*) spider venom apparatus. *Toxicon, 11*:471-9, 1973.

GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A. Jr. Méthode permettant l'etude conjugée des propiétés élétrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Aplication and sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta, 10*:193-4, 1953.

GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A. Jr. Méthod immunoeletrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta, 17*:67-74, 1955.

JONG, Y. S.; NORMENT, B. R.; HEITZ & J. R. Separation and characterization of venom components in the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). I. Preparative disc electrophoresis. *Toxicon, 17*:307-12, 1979.

McCRONE, J. D. & NETZLOFF, M. L. An immunological and electrophoretical comparison of the venoms of North American *Latrodectus* spiders. *Toxicon, 3*: 107-10, 1965.

McCUMBER, J. D. & CROSS, H. F. Fractionation of the venom glands of the brown recluse spider by disc electrophoresis. *J. Miss. Acad. Sci., 17*:52-6, 1971.

NORMENT, B. R. & JARRATT, J. H. Electrophoresis and electrofocusing of venom of *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik. *(Araneidae: Scytodidae). J. Med. Entomol., 13*:143-7, 1976.

ODELL, G.; NAZHAT, N.; GROTHAUS, R. & HOWELL, D. E. Protein components of *Loxosceles reclusa* venom. *Proc. Okla. Acad. Sci., 47*:263-5, 1966.

ORNBERG, R. L.; SMITH, T. Jr. & BENTON, A. W. Isolation of a neurotoxin with a presynaptic action from the venom of the black widow spider (*Latrodectus mactans*, Fabr.). *Toxicon, 14*:329-33, 1976.

OUCHTERLONY, O. In vitro method for testing the toxin producing capacity of dyphteria bacteria. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 25*:186-9, 1948.

OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 26*:507-15, 1949.

PEREIRA LIMA, F. A. & SCHENBERG, S. Separação dos componentes ativos do veneno de *Phoneutria fera* por eletroforese em acetato de celulose (Oxoid). *Ciênc. Cult., 15*:268, 1963.

RUSSELL, F. E. & BUESS, F. W. Gel electrophoresis: a tool in systematics studies with *Latrodectus mactans* venom. *Toxicon, 8*:81-4, 1970.

SCHENBERG, S. & PEREIRA LIMA, F. A. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Mem. Inst. Butantan, 33*:627-38, 1966.

SILES VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do gênero Bothrops (B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox* e *B. cotiara)*. São Paulo, 1972. (Tese de doutoramento — Instituto de Ciências Biomédicas da USP).

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I. Análise

comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de veneno frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan, 38*:13-30, 1974.

SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R. S.; ZELANTE, F. & ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. III. Análise dos componentes antigênicos comuns através de dupla difusão em ágar. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:241-50, 1976/7.

SMITH, C. W. & MICKS, D. W. A comparative study of the venom and other components of three species of *Loxosceles. Am. J. Trop. Med. Hyg., 17*:651-6, 1968.

SPECTOR, T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for $\leqslant$ 0,5 to 50 μg of protein. *Anal. Biochem., 86*:142-6, 1978.

SUÁREZ, G.; BIGGEMANN, U. & SCHENONE, H. Estudios bioquímicos del veneno de *Loxosceles laeta* y sus mecanismos de acción. *Bol. Chil. Parasitol., 26*:60-2, 1971.

SUÁREZ, G.; SCHENONE, H. & SOCíAS, T. *Loxosceles laeta* venom partial purifaction. *Toxicon, 9*:291, 1971.

WRIGHT, R. P.; ELGERT, K. D.; CAMPBELL, B. J. & BARRETT, J. T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. and Bioph., 159*:415-26, 1973.

Recebido para publicação em 14/10/1983 e aceito em 12/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:45-53, 1983/84

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO VENENO DE *LOXOSCELES GAUCHO* EM TERMOS DE DL_{50} E TITULAÇÃO DO ANTIVENENO ESPECÍFICO EM CAMUNDONGOS

Regina Maria Barretto CICARELLI *
Medardo SILES VILLARROEL **
Flávio ZELANTE ***

RESUMO: Os autores demonstram que a atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* pode ser determinada satisfatoriamente, em termos de DL_{50}, através de inoculações intravenosa e intraperitoneal em camundongos. A sensibilidade é maior quando o veneno é inoculado intravenosamente. São testados três tipos de veneno: obtido por estímulo elétrico, por trituração de cefalotórax e por trituração de glândulas veneníferas. Na tentativa de padronização, seria recomendada a utilização do veneno extraído por estímulo elétrico. É demonstrado, também, que a potência de neutralização do antiveneno específico pode e deve ser determinada, utilizando-se a via intravenosa de camundongos, avaliando-se, assim, a atividade tóxica geral do veneno e não apenas a sua atividade necrosante.

PALAVRAS CHAVE: veneno de *Loxosceles gaucho;* antiveneno aracnídico.

INTRODUÇÃO

O gênero *Loxosceles* Heinecken e Lowe, 1832 pertence à família *Sicariidae,* também conhecida como *Scytodidae,* com espécies distribuídas nas zonas tropical, sub-tropical e temperada do mundo inteiro [5, 6, 9, 34]. A toxicidade do veneno de *Loxosceles* foi estudada por vários autores, principalmente em relação à atividade necrosante local [1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 19, 21, 23, 26, 31, 39].

* Professora Assistente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
** Professor Livre Docente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
*** Professor Titular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
Endereço para correspondência: Departamento de Imunologia — Edifício Biomédicas III — Cidade Universitária — CEP 05508 — São Paulo — SP.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno específico em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:45-53, 1983/84.

Além de necrosante, o veneno é hemolítico, determinando hemoglobinúria, hematúria e ictreícia, causando o quadro clínico conhecido como "araneísmo cutâneo-íctero-hemolítico", que pode ser agravado por um comprometimento renal, evoluindo para anúria e, às vezes, morte [11, 18, 24, 25, 38, 39].

Conforme Furlanetto [15] (1961), o acidente loxoscélico era confundido com o licósico, que apresenta menor gravidade. Assim, muitos pesquisadores estrangeiros acreditavam que, no Brasil, o veneno de *Lycosa* apresentava características diferentes dos encontrados em outros países, com espécies deste gênero. A partir dessas observações, Furlanetto propôs-se a estudar a atividade do veneno loxoscélico e preparar o soro específico, até então inexistente.

Alguns autores [2, 20, 26] estudaram o veneno extraído de glândulas de *Loxosceles reclusa,* a "aranha-marrom" da América do Norte, determinando a DL_{50} por via intraperitoneal em camundongos. Outros pesquisadores, como Schenone e cols. [33] (1970), usaram outras espécies animais para tal determinação.

Pelo exposto, verifica-se a necessidade de uma padronização para os estudos dos venenos e antivenenos desses animais peçonhentos. Os próprios informes da Farmacopéia Brasileira [14] (1977), da Organização Panamericana da Saúde [28] (1977) e da Organização Mundial da Saúde [27] (1981) são omissos nestes particulares.

Até o presente, a atividade do veneno loxoscélico, bem como a titulação do antiveneno específico são feitas em coelhos, em termos de Dose Mínima Necrosante (DMN), não se encontrando na Farmacopéia Brasileira nenhuma instrução normativa quanto à padronização de tais titulações.

Neste trabalho, os autores propõem-se a determinar a atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho,* em termos de DL_{50}, utilizando as vias intravenosa e intraperitoneal, em camundongos, e verificar, também, a possibilidade da utilização da via intravenosa de camundongos para o doseamento do antiveneno específico.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos *

Os venenos de *Loxosceles gaucho* Gertsch, 1967, foram extraídos por estimulação elétrica e por trituração de cefalotórax e de glândulas [15].

Antiveneno loxoscélico *

Foi obtido através de hiperimunização de cavalos [15] com antígenos do triturado de cefalotórax de *L. gaucho.* O soro é purificado e concentrado pelo método de Pope [29] (1938) e Pope [30] (1939), modificado por Furlanetto [15] (1961).

O título do soro era de 15 Unidades Antinecrosantes (UAN) por 1 ml de soro.

* Fornecidos pelo Instituto Butantan.

Animais

Foram utilizados, por dose, lotes de seis camundongos brancos *(Mus musculus* Linnaeus, 1758), de ambos os sexos, pesando 20g ± 2g. Os animais receberam inoculações pelas vias intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP), sempre com volume de 0,5 ml. Os animais foram observados por um período máximo de 72 horas, com leituras parciais aos 30 e 60 minutos, 24 e 48 horas.

Cálculo da DL_{50} do veneno

Realizada de acordo com o método de Kärber [22] (1931).

Doseamento do antiveneno

Na avaliação da potência foi mantido constante o volume do imunessoro, diluído a 1/2, variando a concentração do veneno. A mistura veneno-antiveneno, após incubação a 37°C por 30 minutos, foi inoculada nos camundongos.

Os resultados foram expressos em termos de mg e de DL_{50} de veneno neutralizado por 1 ml de antiveneno, baseando-se na técnica utilizada por Siles Villarroel [35] (1977), Siles Villarroel e cols. [36] (1978/9) e Siles Vilarroel e cols. [37] (1978/9), no estudo de antivenenos botrópicos.

RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados da determinação da DL_{50} do veneno obtido por estímulo elétrico, inoculado pela via intraperitoneal, respectivamente.

TABELA 1

Determinação da DL_{50} do veneno de *L. gaucho* obtido por estímulo elétrico, inoculado pela via intravenosa em camundongos

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	5,00	6,00	7,20	8,64	10,37	12,44	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	0/6	1/6	2/6	3/6	3/6	10,33 μg
48 horas	0/6	1/6	2/6	4/6	4/6	5/6	8,35 μg
72 horas	1/6	3/6	4/6	5/6	5/6	6/6	6,55 μg

TABELA 2

Determinação da DL_{50} do veneno de *L. gaucho* obtido por estímulo elétrico, inoculado pela via intraperitoneal em camundongos

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	10,00	12,00	14,40	17,28	20,74	24,88	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	1/6	2/6	4/6	4/6	5/6	16,76 μg
48 horas	1/6	1/6	4/6	5/6	5/6	6/6	13,97 μg
72 horas	1/6	1/6	4/6	5/6	6/6	—	13,55 μg

A tabela 3 mostra os resultados da determinação da DL_{50} do veneno obtido por trituração de cefalotórax, inoculado pela via intravenosa.

TABELA 3

Determinação da DL_{50} do veneno obtido por trituração de cefalotórax de *L. gaucho*, inoculado pela via intravenosa em camundongos

Tempos de observação	Solução inicial de veneno de **L. gaucho** diluído a 1:					
	22,0	30,8	43,1	60,4	84,5	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	6/6	3/6	1/6	0/6	0/6	1/32,60*
48 horas	—	5/6	3/6	1/6	0/6	1/43,11*
72 horas	—	6/6	3/6	2/6	1/6	1/51,00*

* As diluições a 1/32,60, 1/43,11 e 1/51,00 equivalem, aproximadamente, a 7,67 μg, 5,80 μg e 4,90 μg de veneno seco obtido por estímulo elétrico de *L. gaucho*

A tabela 4 apresenta os resultados da determinação da DL_{50} do veneno obtido por trituração de glândulas venenígeras, inoculado pela via intravenosa.

TABELA 4

Determinação da DL_{50} do veneno obtido por trituração de glândulas venenígeras de *L. gaucho*, inoculado pela via intravenosa em camundongos

Tempos de observação	Solução inicial de veneno de **L. gaucho** diluído a 1:					
	22,0	30,8	43,1	60,4	84,5	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	4/6	3/6	1/6	1/6	0/6	1/30,80*
48 horas	6/6	4/6	4/6	2/6	1/6	1/48,23*
72 horas	—	5/6	4/6	3/6	1/6	1/53,96*

* As diluições a 1/30,80, 1/48,23 e 1/53,96 equivalem, aproximadamente a 8,11 μg, 5,18 μg e 4,63 μg de veneno seco obtido por estímulo elétrico de *L. gaucho*

Com o objetivo de facilitar uma análise global, incluimos a tabela 5, que resume os valores das DL_{50} dos três tipos de venenos presentemente estudados.

TABELA 5

Comparação dos resultados de toxicidade dos três tipos de venenos de *L. gaucho*, inoculados pela via intravenosa em camundongos

Amostra de veneno	DL_{50} em μg 24 h	DL_{50} em μg 48 h	DL_{50} em μg 72 h
Obtidas por estímulo elétrico	10,33	8,35	6,55
Obtidas por trituração do cefalotórax	7,67	5,80	4,90
Obtidas por trituração de glândulas	8,11	5,18	4,63

A tabela 6 apresenta os resultados dos ensaios para a determinação do título neutralizante do imunessoro específico.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno específico em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:45-53, 1983/84.

TABELA 6

Doseamento do antiveneno loxoscélico, colocado frente ao veneno específico e inoculado pela via intravenosa em camundongos

Veneno de *L. gaucho* (DL_{50} = 6,55 μg)		Solução salina	Antiveneno loxoscélico	Incubação	Tempos de observação		
mg	ml	ml	ml		24 h	48 h	72 h
0,200	0,0400	0,2100	0,25	37°C	0/6	0/6	0/6*
0,240	0,0480	0,2020	0,25		0/6	4/6	6/6
0,288	0,0576	0,1924	0,25	x	6/6	—	—
0,346	0,0692	0,1808	0,25		6/6	—	—
0,415	0,0830	0,1670	0,25	30 min	6/6	—	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *Loxosceles gaucho* neutraliza 1,60 mg ou 244,27 DL_{50} do veneno específico

DISCUSSÃO

A utilização de camundongos que sofreram inoculações IV e IP possibilitou a determinação da DL_{50} do veneno de *Loxosceles gaucho,* que em duas experiências demonstrou reprodutibilidade satisfatória.

A regularidade de ocorrência de mortes, em função do tempo de observação e progressão das doses de veneno inoculadas, vias IV e IP, permitiu a determinação da DL_{50} após 72 horas de observação, 6,55 μg e 13,55 μg, respectivamente. Deve ser ressaltado que a sensibilidade ao veneno é maior, quando este é inoculado pela via IV do camundongo.

Furlanetto [15] (1961), determinou a DL_{50} do veneno extraído por estímulo elétrico e inoculado por via IV em camundongos, obtendo 6,82 μg em 48 horas. Os nossos resultados, 8,35 μg no mesmo período e 6,55 μg após 72 horas são diferentes daquele obtido por Furlanetto e, acreditamos, ser explicável por tratarem-se de partidas diferentes de veneno, e ainda, por variações a que estão sujeitos os ensaios biológicos.

Das tabelas 3 e 4, podemos depreeender que as DL_{50} do veneno de *L. gaucho,* provenientes de trituração de cefalotórax e de glândulas, apresentam-se muito próximas (4,90 μg e 4,63 μg em 72 horas, respectivamente) e mais tóxicas se comparadas com a DL_{50} do veneno obtido por estímulo elétrico (6,55 μg); isto se justifica pela utilização da quantidade total do veneno que está contida nas glândulas da aranha, não possível de ser extraído totalmente por estímulo elétrico.

Até o presente, a toxicidade do veneno de *Loxosceles* e a atividade neutralizante do antiveneno específico são determinadas segundo o método preconizado por Furlanetto [15] (1961). Esta avaliação determina unicamente o efeito da fração necrosante e não a ação tóxica geral do veneno, levando em consideração exclusivamente a neutralização do efeito local. Sabe-se, no entanto,

que indivíduos acidentados por esta aranha, apesar de apresentarem lesões cutâneas extensas, não morrem devido a esse efeito local, mas em decorrência de manifestações sistêmicas, principalmente caracterizadas pelo comprometimento renal [15, 17, 32].

Em nossa opinião, o doseamento do antiveneno loxoscélico seria mais correto se expresso em termos de ação neutralizante geral do veneno e não apenas em função do fator necrosante.

CONCLUSÕES

1. A atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho,* principalmente quando extraído por estímulo elétrico, pode ser convenientemente padronizada em termos de DL_{50}, para as vias intravenosa e intraperitoneal em camundongos;

2. o antiveneno loxoscélico monovalente deveria ser titulado em camundongos pela inoculação intravenosa da mistura, veneno-antiveneno e os resultados seriam, finalmente, expressos em mg ou número de DL_{50} de veneno neutralizados por 1 ml de antiveneno.

ABSTRACT: The authors show that through intravenous and intraperitoneal inoculations in mice, the toxic activity of *Loxosceles gaucho* venom can be determined in terms of DL_{50}. The sensibility is higher when venom is intravenous injected. Three types of venom were obtained and tested: through eletric stimulation, cephalothorax trituration and through venom glands trituration. Tentatives of standardization should be done with venom obtained from eletric stimulation. It is shown that the neutralization potency of the specific antivenin should be determined using the intravenous route in mice, estimating the toxic and necrotizing activity of the venom.
KEYWORDS: *Loxosceles gaucho* venom; spider antivenin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINS, J. A.; WINGO, C. W.; SODEMAN, W. A. & FLYNN, J. E. Necrotic arachnidism. *Am. J. Trop. Med. Hyg., 7*:165-84, 1958.

BABCOCK, J. L.; SUBER, R. L.; FRITH, C. H. & GEREN, C. R. Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider *(Loxosceles reclusa). Toxicon, 19*:463-71, 1981.

BERTIN, V. Consideraciones sobre aracnoidismo en Chile. *Rev. Chil. Hig. Med. Prev., 12*:37-50, 1950.

BÜCHERL, W. Aranhas do Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Butantan, 24*:127-56, 1952.

BÜCHERL, W. Aranhas do gênero *Loxosceles* e "Loxoscelismo" na América do Sul. *Mem. Inst. Butantan, 30*:167-86, 1960/2.

BÜCHERL, W. Aranhas do gênero *Loxosceles* e Loxoscelismo na América. *Ciênc. Cult., 13*:213-24, 1961.

BÜCHERL, W. Biologia de artrópodes peçonhentos. *Mem. Inst. Butantan, 31*:85-94, 1964.

BUTZ, W. C.; STACY, L. D. & HERYFORD, N. N. Arachnidism in rabbits. Necrotic lesions due to the brown recluse spider. *Arch. Pathol., 91*:97-100, 1971.

COSTA, R. S. & SALVERÁGLIO, F. J. Nota previa sobre araneísmo cutáneo en el Uruguay. *Arch. Urug. Med. Cir. Espec., 14*:417-30, 1939.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno específico em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:45-53, 1983/84.

COSTA, R. S. Araneísmo en nuestro país. Araneísmo cutáneo gangrenoso y araneísmo neurotóxico. Nuevas observaciones. *An. Inst. Hig. Montevidéo, 3*:57-66, 1949.

DENNY, W. F.; DILLAHA, C. J. & MORGAN, P. N. Hemotoxic effect of *Loxosceles reclusa* venom: in vivo and in vitro studies. *J. Lab. Clin. Med., 64*:291-8, 1964.

DONOSO BARROS, R. Consideraciones sobre el aracnoidismo cutáneo en Chile. *Arch. Urug. Med. Cir. Espec., 33*:184-206, 1948.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil, 2.ª Ed., Rio de Janeiro, Gráfica Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA brasileira, 3.ª Ed., São Paulo, Organização Andrei Editora S.A., 1977.

FURLANETTO, R. S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. (Tese de Livre-Docência — Faculdade de Farmácia e Odontologia da USP).

FURLANETTO, R. S.; BÜCHERL, W.; QUEIROGA, Y. & ROSENFELD, G. O problema dos acidentes licósico e loxoscélico. *Ciênc. Cult., 14*:253-4, 1962.

FURLANETTO, R. S.; BÜCHERL, W.; ROLIM ROSA, R.; SALIBA, F. & NAVAS, J. Observação dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliação de sua atividade. *Ciênc. Cult., 14*;254, 1962.

FUTRELL, J. M.; MORGAN, B. B. & MORGAN, P. N. An "in vitro" model for studyng hemolysis associated with venom from the brown recluse spider *(Loxosceles reclusa). Toxicon, 17*:355-62, 1979.

GAJARDO-TOBAR, R. Mi experiencia sobre loxoscelismo. *Mem. Inst. Butantan, 33*:689-98, 1966.

GEREN, C. R.; CHAN, T. K.; WARD, B. C.; HOWELL, D. E.; PINKSTON, K. & ODELL, G. V. Composition and properties of extract of fiddleback *(Loxoscoles reclusa)* spider venom apparatus. *Toxicon, 11*:471-9, 1973.

HUFFORD, D. C. The brown recluse spider and necrotic aracnidism: a current review. *J. Arkansas Med. Soc., 74*:126-9, 1977.

KÄRBER, G. Beitrag zur kollectiven Behand-lung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., 162*:480-3, 1931.

MACCHIAVELLO, A. V. La *Loxosceles laeta*, causa del aracnoidismo cutáneo o mancha gangrenosa de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat., 41*:11-9, 1937.

MACKINNON, J. E. Acidentes poco conocidos producidos por picaduras de arañas. Arañismo cutáneo-gangrenoso y hemolítico. *Arch. Urug. Med. Cir. Espec., 13*: 575-80, 1938.

MACKINNON, J. E. Observaciones sobre el arañismo cutáneo-gangrenoso y hemolítico y sobre la araña que lo produce. *An. Inst. Hig. Montevidéo, 2*:107-14, 1948.

MACKINNON, J. E. & WITKIND, J. Aracnidismo necrótico. *An Fac. Med. Montevidéo, 38*:75-100, 1953.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Caractérisation des venins et standardisation des séruns antivenimeux: progrés réalisés.* Genève, 1981. (OMS, Publication offset 58).

ORGANIZAÇÃO. PANAMERICANA DA SAÚDE. *Producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa: manual de procedimientos.* Ed. rev. Washington, OPAS, 1977.

POPE, C. G. Disaggregation of proteins by enzimes. *Br. J. Exp. Pathol., 19*:245-51, 1938.

POPE, C. G. The actions of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immunesera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Br. J. Exp. Pathol., 20*:201-12, 1939.

PRATS, F. & SCHENONE, H. Mordeduras de arañas. Nuevas consideraciones sobre loxoscelismo. *Bol. Chil. Parasitol., 12*:7-9, 1957.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno específico em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:45-53, 1983/84.

ROSENFELD, G. *Acidentes por animais peçonhentos.* In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7.ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982, p. 1068.

SHENONE, H.; COURTIN, L. & KNIERIM, F. Resistencia inducida del conejo a dois elevadas de veneno de *Loxosceles laeta. Toxicon, 8*:285-8, 1970.

SHENONE, H. & LETONJA, T. Notas sobre la biologia y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles. Bol. Chil. Parasitol., 30*:27-9, 1975.

SILES VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos.* São Paulo, 1977. (Tese de Livre-Docência — Instituto de Ciências Biomédicas da USP).

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R. S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-23, 1978/9.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & GUIDOLIN, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:337-44, 1978/9.

SOMMER, B. & GRECO, N. V. Arañidismo. VIII. Arañidismo cutáneo-ictero-hemolítico. *An. Rep. Nac. Hig.*, Buenos Aires, *21*:124-72, 1914.

VELLARD, J. La fonction venimeuse chez les araignées. *Mem. Inst. Butantan, 33*: 35-44, 1966.

Recebido para publicação em 14/10/1983 e aceito em 12/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:55-60, 1983/84

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO VENENO DE *LYCOSA ERYTHROGNATHA* EM TERMOS DE DL_{50} E TITULAÇÃO DO ANTIVENENO EM CAMUNDONGOS

Regina Maria Barretto CICARELLI *
Medardo SILES VILLARROEL **
Sylvia LUCAS ***

RESUMO: Os autores, utilizando veneno da espécie *Lycosa erythrognatha*, demonstram que a atividade tóxica desse veneno pode ser determinada, satisfatoriamente, em termos de DL_{50}, através de inoculações intravenosa e intraperitoneal em camundongos. A potência de neutralização do antiveneno licósico também pode ser determinada utilizando-se a via intravenosa de camundongos. Dessa maneira, a atividade tóxica do veneno, bem como a titulação do antiveneno é fundamentada na atividade geral do veneno e não só em função do fator necrosante presente neste.

PALAVRAS CHAVE: veneno de *Lycosa erythrognatha;* antiveneno aracnídico.

INTRODUÇÃO

O gênero *Lycosa* Latreille, 1804 pertence à família *Lycosidae,* com espécies distribuídas em todos os continentes [5, 7].

Estudos feitos por Brazil e Vellard [1] (1925) mostraram que o veneno dessas aranhas tem efeito necrosante local e é praticamente desprovido de ação geral. Os mesmos autores, em 1926 [2], prepararam o soro antictênico-licósico, usando o coelho como animal de prova para a determinação da atividade necrosante do veneno e titulação do antiveneno, metodologia que vem sendo empregada até a atualidade.

A atividade necrosante do veneno de *Lycosa* é bem menos intensa do que a de *Loxosceles,* sem efeitos sistêmicos proeminentes [17]. Kaiser [9] (1956),

* Professora Assistente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
** Professor Livre Docente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
*** Diretora da Divisão de Biologia do Instituto Butantan.
Endereço para correspondência: Departamento de Imunologia — Edifício Biomédicas III — Cidade Universitária — CEP 05508 — São Paulo — SP.

estudando a atividade enzimática desse veneno, verificou ausência de ação coagulante e hemolítica, porém com atividade semelhante à da hialuronidase.

Neste trabalho, os autores se propuseram a determinar a atividade tóxica do veneno de *Lycosa erythrognatha* *, extraído por estímulo elétrico, em termos de DL_{50} utilizando as vias intravenosa e intraperitoneal em camundongos, e verificar a possibilidade de utilização da via intravenosa de camundongos para o doseamento da fração antiveneno licósico do soro antiaracnídico polivalente.

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno utilizado **

Os venenos de *Lycosa erythrognatha* Lucas, 1 836 foram extraídos por estímulo elétrico e dessecados a vácuo, conforme a técnica de Bücherl [6] (1953).

Antiveneno aracnídico polivalente **

No soro antiaracnídico (antiaranêico e antiescorpiônico), a fração antiaranêica foi obtida pela hiperimunização de cavalos [13] com mistura imunogênica constituída por triturado de cefalotórax de *Loxosceles* e *Lycosa* e veneno obtido por estímulo elétrico de *Phoneutria*. A fração antiescorpiônica foi obtida pela hiperimunização de cavalos [13] com venenos obtidos por estímulo elétrico de espécimes dos gêneros *Tityus*.

O antiveneno foi purificado e concentrado pelo método de Pope [11] (1938) e Pope [12] (1939), modificado por Furlanetto [8] (1961).

Os títulos do soro apresentados na fração aranêica eram os seguintes: 1 ml de soro neutraliza 10 DMM do veneno loxoscélico, 1,5 DMM do veneno de *Phoneutria* e 15 DMN do veneno licósico.

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos brancos *(Mus musculus* Linnaeus, 1758), de ambos os sexos, pesando 20g ± 2g. Estes animais receberam inoculações pelas vias intravenosa ou intraperitoneal, no volume de 0,5 ml. Foram utilizados lotes de 6 camundongos por dose que, após as inoculações, foram observados por um período máximo de 48 horas, com leituras parciais de 30 e 60 minutos e 24 horas.

Determinação da DL_{50} do veneno

Foi realizada de acordo com o método de Kärber [10] (1931).

Doseamento do antiveneno

Na avaliação da potência do antiveneno foi mantido constante o volume do imunessoro diluído a 1/2, variando as doses do veneno. A mistura veneno-

* Essa espécie pode ser também encontrada nos Catálogos com o nome de *Scaptocosa raptoria*.
** Fornecidos pelo Instituto Butantan.

-antiveneno, após a incubação a 37°C x 30 minutos, foi inoculada nos camundongos.

Os resultados foram expressos em termos de mg e de DL_{50} de veneno neutralizado por 1 ml de antiveneno, baseando-se na técnica experimental utilizada por Siles Villarroel [14] (1977), Siles Villarroel e cols. [15] (1978/9) e Siles Villarroel e cols. [16] (1978/9), no estudo de antivenenos botrópicos.

RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados da determinação da DL_{50} do veneno de *Lycosa erythrognatha* inoculado pela via IV e pela via IP, respectivamente.

TABELA 1

Determinação da DL_{50} do veneno de *L. erythrognatha*, inoculado pela via intravenosa em camundongos

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	160,00	208,00	270,00	351,52	456,98	594,07	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	1/6	5/6	6/6	6/6	
60 minutos	0/6	0/6	1/6	5/6	—	—	
24 horas	0/6	0/6	2/6	5/6	—	—	294,9 μg
48 horas	0/6	0/6	2/6	5/6	—	—	294,9 μg

TABELA 2

Determinação da DL_{50} do veneno de *L. erythrognatha*, inoculado pela via intraperitoneal em camundongos

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	40,0	80,0	160,0	320,0	640,0	1280,0	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	0/6	0/6	1/6	4/6	5/6	570,0 μg
48 horas	0/6	0/6	0/6	1/6	4/6	6/6	508,0 μg

A tabela 3 apresenta os resultados dos ensaios para a determinação do título neutralizante do imunessoro específico, através da via IV.

TABELA 3

Doseamento do antiveneno aracnídico, colocado frente ao veneno de *L. erythrognatha* e inoculado pela via intravenosa em camundongos

L. erythrognatha (DL_{50} = 294,9 µg)	Solução salina	Antiveneno aracnídico	Incubação	Tempos de observações	
mg	ml	ml	ml		24 h	48 h
0,10	0,01	0,24	0,25	37°C	0/6	0/6
0,20	0,02	0,23	0,25		0/6*	0/6*
0,30	0,03	0,22	0,25	x	6/6	—
0,40	0,04	0,21	0,25		6/6	—
0,80	0,08	0,17	0,25	30 min	6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno aracnídico neutraliza 1,60 mg ou 5,42 DL_{50} do veneno de *L. erythrognatha*

DISCUSSÃO

A utilização de camundongos que sofreram inoculações IV e IP possibilitou a determinação da DL_{50} do veneno de *L. erythrognatha,* com reprodutibilidade satisfatória em dois experimentos realizados.

Constatou-se a ocorrência de mortes após 60 minutos, o que não se verificou quando da inoculação intraperitoneal. Comparando-se as sensibilidades apresentadas pelos animais, com relação às vias de inoculação, concluiu-se que a da intravenosa é consideravelmente maior (DL_{50} iguais a 294,9 µg — via IV e 508,0 µg — via IP).

A inexistência de trabalhos semelhantes, impossibilita-nos estabelecer qualquer análise comparativa, visto que, até hoje, a determinação da atividade tóxica do veneno licósico tem sido realizada conforme o método proposto por Brazil & Vellard [3] (1950).

Atualmente, o doseamento do soro antiaracnídico é realizado através dos métodos preconizados por Furlanetto [8] (1961) para o antiveneno de *Loxosceles* (em coelhos) e por Brazil e Vellard [1, 2, 3, 4] (1925, 1926, 1950 e 1950) para os antivenenos de *Phoneutria* e *Lycosa* (em cobaias e coelhos, respectivamente). Esses métodos apresentam alguns inconvenientes, seja quanto ao consumo de veneno, à falta de uniformidade em relação aos animais de prova e, principalmente, porque só avaliam a fração antinecrosante dos venenos loxoscélico e licósico.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M. & LUCAS, S. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Lycosa erythrognatha* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:55-60, 1983/84.

CONCLUSÕES

1. A atividade tóxica do veneno de *Lycosa erythrognatha* pode ser convenientemente padronizada em termos de DL_{50}, para as vias IV e IP de camundongos;

2. o antiveneno aracnídico polivalente pode ser titulado satisfatoriamente pela inoculação intravenosa da mistura veneno-antiveneno, cujo resultado seria finalmente expresso em mg ou número de DL_{50} de veneno, neutralizado por ml de antiveneno.

ABSTRACT: The authors show that the toxic activity of *Lycosa erythrognatha* species venom inoculated intravenous and intraperitoneal in mice, can be satisfatory determined in terms of DL_{50}. The neutralizing potency of the antivenin can also be determined through the intravenous route in mice. In this way, the toxic activity of the venom, as well the antivenin titration are supported by the general activity of the venom, not only by the necrotizing factor presents in it.

KEYWORDS: *Lycosa erythrognatha* venom; spider antivenin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan, 2*:5-78, 1925.

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan, 3*:243-301, 1926.

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Soro contra o veneno de *Lycosa raptoria*. Método de dosagem. *An. Paul. Med. Cir., 60*:473-9, 1950.

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Imunização por via intradérmica e por via subcutânea pelo soro anticténus. Método de dosagem e primeira aplicação no homem. *An. Paul. Med. Cir., 60*:555-62, 1950.

BÜCHERL, W. Aranhas do Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Butantan, 24*:127-56, 1952.

BÜCHERL, W. Novo processo de obtenção de veneno seco, puro, de *Phoneutria nigriventer* Keyserling, 1891 e titulação de LD_{50} em camundongos. *Mem. Int. Butantan, 25*:153-74, 1953.

BÜCHERL, W. Biologia de artrópodes peçonhentos. *Mem. Inst. Butantan, 31*:85-94, 1964.

FURLANETTO, R. S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico*. São Paulo, 1961. (Tese de Livre-Docência — Faculdade de Farmácia e Odontologia da USP).

KAISER, E. *Enzimatic activity of spider venoms*. In: VENOMS. Eds. E. Buckley and N. Porges, Washington, 1956. (AAAS Publication n.º 44) p. 91.

KÄRBER, G. Beitrag zur kollectiven Behand-lug pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., 162*:480-3, 1931.

POPE, C. G. Disaggregation of proteins by enzymes. *Br. J. Exp. Pathol., 19*:245-51, 1938.

POPE, C. G. The actions of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immunesera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Br. J. Exp. Pathol., 20*:201-12, 1939.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M. & LUCAS, S. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Lycosa erythrognatha* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:55-60, 1983/84.

ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M.; VIEIRA, E. G. J.; IIZUKA, H. & NAVAS, J. Produção do soro antiaracnídico polivalente mediante inoculações simultâneas de venenos em um mesmo animal. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:253-8, 1980/81.

SILES VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos.* São Paulo, 1977. (Tese de Livre-Docência — Instituto de Ciências Biomédicas da USP).

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R. S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-23, 1978/9.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & GUIDOLIN, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:337-44, 1978/9.

VELLARD, J. La fonction venimeuse chez les araignées. *Mem. Inst. Butantan, 33*:35-44, 1966.

Recebido para publicação em 14/10/1983 e aceito em 12/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:61-69, 1983/84

HENNEGUYA PISCIFORME N. SP., MIXOSPORÍDEO PARASITO DE BRÂNQUIAS DO LAMBARI *HYPHESSOBRYCON ANISITSI* (PISCES, CHARACIDAE)

Nelson da Silva CORDEIRO *
Paulo de Toledo ARTIGAS *
Ismael GIÓIA **
Rosana Souza LIMA **

RESUMO: Uma nova espécie de mixosporídeo é descrita de *Hyphessobrycon anisitsi* (Characidae), peixe de água doce coletado em Campinas, Estado de São Paulo. O nome *Henneguya pisciforme* n. sp. é dado. A morfologia e estágios do ciclo de vida do parasito são descritos. É discutida a prevalência da infecção e a ausência de patogenicidade do organismo.

PALAVRAS CHAVE: *Henneguya pisciforme* n. sp.; Myxosporea; *Hyphessobrycon anisitsi;* Characidae.

INTRODUÇÃO

A presença de mixosporídeos em peixes da região neotrópica foi assinalada por vários pesquisadores. Parece ter sido Müller [21] (1841) quem primeiro verificou tais protozoários, na América do Sul, encontrados em peixes da Guiana Holandesa (Suriname). Em 1893, as espécies assinaladas por Müller [21] foram classificadas por Gurley [11] no gênero *Myxobolus (M. inaequalis* e *M. linearis).* Esta última espécie, em 1899, foi transferida por Labbé [19] para o gênero *Henneguya (H. linearis).*

Splendore [29] (1910), médico italiano, radicado em São Paulo, constata a presença de mixosporídeos nas brânquias do bagre *Rhamdia quelen,* capturado nos arredores da cidade. Dunkerly [7] (1915) relata a existência de *Agarella gracilis* parasitando a pirambóia *Lepidosirem paradoxa,* capturada nos rios Paraguai e Amazonas. Migone [20] (1916), outro médico italiano, vivendo no Paraguai, refere o encontro de mixosporídeos em cinco espécies de peixes da

* Departamento de Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas.
** Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas.
Endereço para correspondência: IB — Universidade Estadual de Campinas — Caixa Postal, 6109 — Campinas — SP — Brasil.

Bacia do Rio Paraguai; todavia não foi feita a classificação desses protozoários. Cunha & Fonseca [4, 5] (1917, 1918), em peixes marinhos e fluviais do Rio de Janeiro, Ilha Grande, Rio Pardo (em Mato Grosso) e Rio Paraná, verificaram seis novas espécies de diferentes gêneros de mixosporídeos. Aragão [1] (1918), descreve *Myxobolus lutzi,* encontrado nos testículos de *Poecila vivipara.* Nemeczek [22] (1926) assinala *M. chondrophilus* nas brânquias de *Sardinella anchovina;* assinala ainda, três novos mixosporídeos, *M. associatus* e *Henneguya leporini* em *Leporinus mormyrops* e *H. occulta* em *Loricaia* sp.. Fonseca & Penido, referem mixosporídeos em peixes capturados em Mato Grosso; tais informações foram publicadas em 1927, por Penido [23]. Pinto [25] (1928a), em *Astyanax fasciatus,* adquiridos na cidade de São Paulo, encontra *H. wenyoni* em peixes colhidos no Rio Turvo, próximo à cidade de Pirangi, SP. Pinto [26] (1928b), verificou a presença de *M. noguchii, M. stokesi* e *H. iheringi;* em *Acestrorhampus* sp., Pinto [27] (1828c), verifica e descreve *Myxidium gurgeli.* Guimarães [8] (1931), publica sua tese doutoral, versando sobre mixosporídeos de peixes do Brasil. Em 1933 e 1934, Guimarães & Bergamin [9, 10] registram o encontro de *H. travassosi* e *H. santae,* respectivamente em *A. fasciatus* e *Lepomis copelandi* e em *Tetragnopterus santae.* Jokowska & Nigrelli [13] (1953), referem em *Electrophorus electricus* o encontro de *H. visceralis, H. electrica* e *Henneguya* sp.. Recentemente, Kent & Hoffman [14] (1984) tornam público a presença de *H. theca,* parasitando *Engemannia virescens.*

Atualmente desenvolvemos um projeto de pesquisa que inclui o levantamento da fauna parasitária de peixes de lago próximo à cidade de Campinas, SP.

Em *Hyphessobrycon anisitsi,* peixe characídeo de água doce, conhecido popularmente por lambari, verificamos, em 20% dos peixes examinados, a presença, nas brânquias, de grande número de cistos; esses cistos continham esporos de mixosporídeos do gênero *Henneguya* Thélohan, 1892.

Neste trabalho apresentamos o resultado de nossas pesquisas, pertinentes à morfologia do protozoário, aos estágios do ciclo biológico, prevalência da infecção assinalando inexistência de ação patogênica provocada pelo parasitismo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes foram sacrificados no laboratório e a necrópsia, com finalidade parasitária, efetuada imediatamente. O exame das guelras foi sempre minucioso, tanto o macro como o microscópico. Positivada a presença de cistos, estes eram examinados, para um conhecimento morfológico conveniente. Estudou-se material fresco e conservado em formol-Railliet.

Obtiveram-se fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina e de esfregaços do material fresco corado pelo Giemsa. A visualização do vacúolo iodófilo foi conseguida com emprego da solução de Lugol. A extrusão dos filamentos polares foi provocada em KOH 5% (Hoffman et al [12], 1965). Os desenhos foram feitos com auxílio de câmara clara.

DESCRIÇÃO

Henneguya pisciforme n. sp.

Estádio vegetativo: Numerosos cistos de coloração brancacento-amarelada, localizados nos tecidos das brânquias, são visíveis a olho desarmado, em peixes

vivos e nos conservados em formol. Os cistos, às vezes mais de uma dezena em cada hospedeiro, eram distribuídos por todas as brânquias e em ambas as faces, internas e externas. Os cistos simples são esféricos ou ovais, limitados por uma membrana produzida pelo hospedeiro (Figura 17). Seu desenvolvimento é assíncrono; cistos contendo muitos esporontes, esporoblastos mono e multinucleados e esporos maturos são encontrados contemporaneamente. No pansporoblasto em transformação, encontramos esporos em variados estádios de desenvolvimento; uns prematuros, arredondados, envoltos por uma membrana translúcida, com indício de processo caudal e com cápsulas polares de tamanho igual ou diferente, porém de pequenas dimensões; outros mais avançados, maduros, o que se evidencia pela extensão do processo caudal e dimensões das valvas (Figs. 10 *a, b, c, d,* e *e*). Os esporos maduros ocupam a área central dos cistos, enquanto os estádios em desenvolvimento estão localizados ao redor, na periferia da massa cística.

Esporos: Os esporos têm aspecto biconvexo, comprimidos lateralmente ao plano da sutura, com a região posterior estendendo-se e terminando em apêndice caudal espesso, simples ou bifurcado (Fig. 10 *d* e *e*). As valvas são de igual tamanho e os apêndices caudais são extensões das valvas.

Na região anterior do esporo há uma pequena constrição com aspecto de mamilo (Fig. 10 *d, e* e *f*). Duas cápsulas polares piriformes, desiguais, contêm os filamentos polares espiralados dispostos no sentido longitudinal. Quando exteriorizado o filamento polar apresenta espessura uniforme (Fig. 10 *f*). O esporoplasma, finalmente granulado, com um ou dois núcleos, contém um vacúolo iodófilo que se evidencia distintamente, quando tratado pela solução de Lugol.

Dimensões do material estudado, baseados em 30 exemplares, estão apresentados na Tabela I.

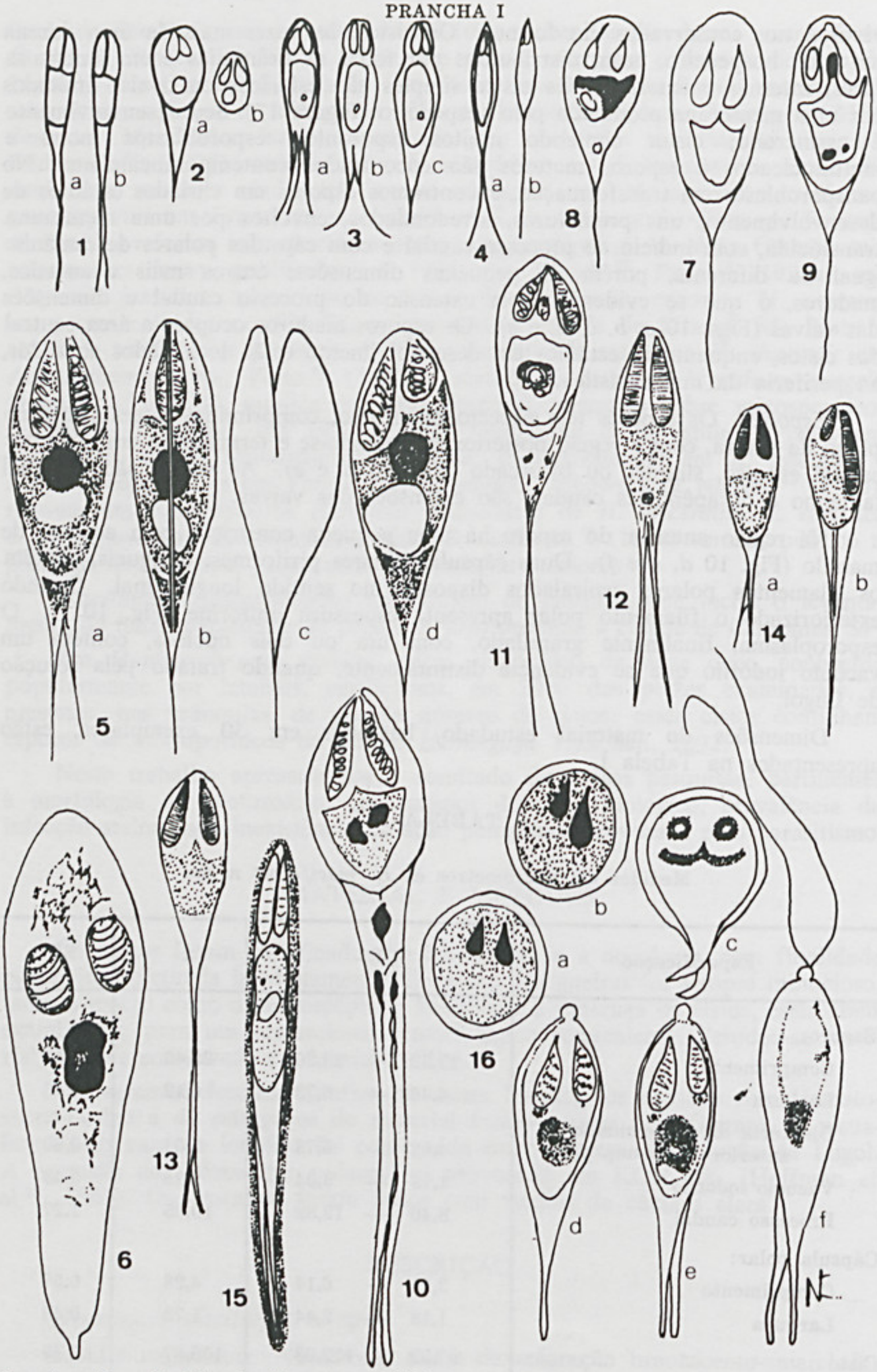
TABELA I

Medidas em micrômetros de *H. pisciforme* n. sp.

Especificação	R	x	SD
Esporo:			
Comprimento	17,32 — 23,20	20,40	1,54
Largura	4,46 — 6,73	6,12	0,46
Distância da extremidade anterior à cápsula polar	4,62 — 6,73	5,64	0,60
Vacúolo iodófilo	1,78 — 3,04	2,25	0,43
Processo caudal	8,40 — 12,82	10,65	1,27
Cápsula polar:			
Comprimento	3,11 — 6,14	4,28	0,57
Largura	1,18 — 2,44	1,70	0,43
Cisto	91,99 — 112,03	100,87	7,49

CORDEIRO, N. S.; ARTIGAS, P. T.; GIÓIA, I. & LIMA, R. S. *Henneguya pisciforme* n. sp., mixosporídeo parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:61-69, 1983/84.

PRANCHA I



Figs. 1 a 16 — Espécies de *Henneguya* Thélohan, 1892 da ictiofauna brasileira.

EXPLICAÇÃO DA PRANCHA

Figs. 1a e 1b — Esporos de *H. linearis* (Gurley, 1893), segundo Müller (1841), *in* Kudo, 1920.

Figs. 2a e 2b — Esporos de *H. lutzi* Cunha & Fonseca, 1918.

Figs. 3a-3c — Esporos de *H. occulta* Nemeczek, 1926, com três, dois e um prolongamentos caudais.

Figs. 4a e 4b — Esporos de *H. leporini* Nemeczek, 1926.

Figs. 5a-5d — Esporos de *H. wenyoni*, Pinto, 1928.

5a — Esporo com cauda bifurcada.

5b — Esporo, visto de perfil e mostrando o plano de sutura vertical.

5c — Esporo, mostrando a abertura longitudinal para dar saída ao esporoplasma.

5d — Esporo possuindo cápsulas polares de forma e dimensões diferentes.

Fig. 6 — Esporo de *H. iheringi* Pinto, 1928.

Fig. 7 — Esporo de *H. fonsecai* Guimarães, 1931.

Fig. 8 — Esporo de *H. cesarpintoi* Guimarães, 1931.

Fig. 9 — Esporo de *H. bergamini* Guimarães, 1931.

Fig. 10 — Esporo de *H. travassosi* Guimarães & Bergamini, 1933.

Fig. 11 — Esporo de *H. santae* Guimarães & Bergamini, 1934.

Fig. 12 — Esporo de *H. visceralis* Jakowska & Nigrelli, 1953.

Fig. 13 — Esporo de *H. electrica* Jakowska & Nigrelli, 1953.

Figs. 14a e 14b — Esporos de *Henneguya* sp. Jakowska & Nigrelli, 1953.

Fig. 15 — Esporo de *H. theca* Kent & Hoffman, 1984. A área pontilhada representa a bainha.

Fig. 16a-16f — Esporos de *H. pisciforme* n. sp .

16a-16c — Estágios em desenvolvimento; observação a fresco.

16d — Esporos possuindo cápsulas polares de dimensões diferentes; coloração pelo Giemsa.

16e — Esporo com cauda bifurcada e vacúolo iodófilo; observação a fresco.

16f — Esporo tratado com KOH (5%). Notar a extrusão do filamento polar; observação a fresco.

HOSPEDEIRO: *Hyphessborycon anisitsi* Eigenmann, 1907 (Pisces, Characidae).

PREVALÊNCIA: Foi verificada em 20%, num total de 180 peixes examinados.

LOCALIZAÇÃO PARASITÁRIA: Protozoário histozóico. Estádio vegetativo localizado no tecido branquial.

PATOGENICIDADE: Aparentemente nenhuma.

LOCALIDADE TIPO: Campinas, Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL EXAMINADO: Lâminas permanentes coradas pelo Giemsa de n.ºs 4001 a 4003. Peças histológicas conservadas em formol — Railliet; cortes histológicos corados pela Hematoxilina-Eosina, seriados, de n.ºs 4004 a 4010. Este material está depositado na Coleção de Protozoologia do Departamento de Parasitologia da UNICAMP.

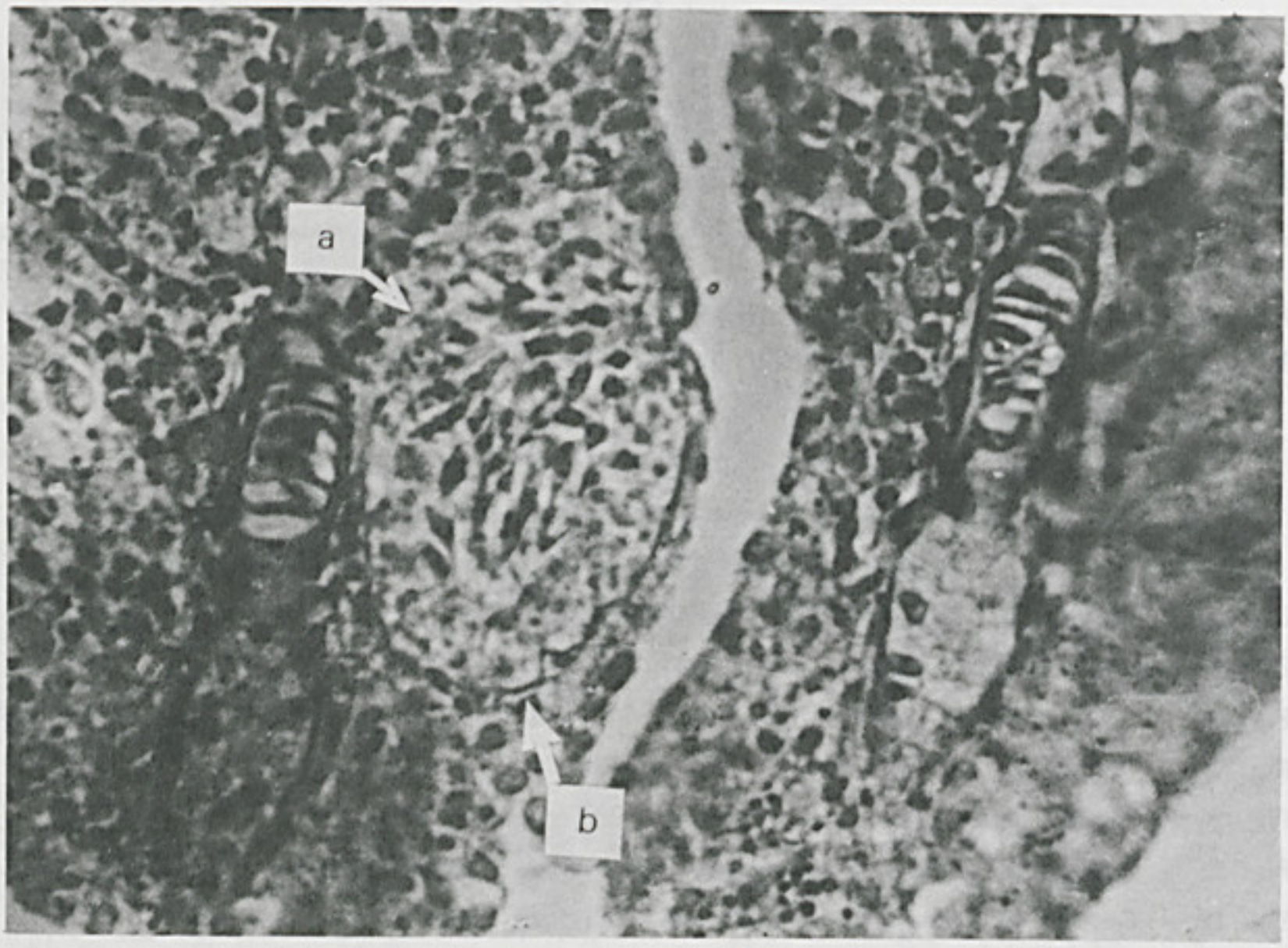


Fig. 17 — Corte de brânquia (microfotografia) de *Hyphessobrycon anisitsi*, parasitada por *Henneguya pisciforme* n. sp.; a. Cavidade cística com formas evolutivas e esporos maduros; b. Membrana cística.

DISCUSSÃO

Desde a clássica monografia de Kudo [15] (1920) sobre mixosporídeos, com a descrição do gênero *Henneguya,* muitas espécies, que diferem fundamentalmente na estrutura do esporo, vêm sendo acrescidas ao gênero e encontrados nas brânquias [16, 17, 18]. O encontro de infecção por *Henneguya* nas brânquias de *Hyphessobrycon anisitsi* é de interesse por causa da pouca informação de mixosporidiose em peixes sul-americanos. No gênero *Henneguya,* atualmente são conhecidos dezesseis espécies brasileiras (Prancha I) e, parasitando brânquias, as seguintes: *H. linearis* (Gurley, 1893); *H. occulta* Nemeczek, 1926; *H. wenyoni* Pinto, 1928; *H. iheringi* Pinto, 1928; *H. cesarpintoi* Guimarães, 1931; *H. santae* Guimarães & Bergamin, 1934 e *H. pisciforme* n.sp.

Das espécies brasileiras descritas, a que mais se aproxima da nossa é *H. wenyoni,* do lambari de rabo vermelho, *Astyanax fasciatus* Cuv. Segundo as ilustrações apresentadas por Pinto [19] (1928a), os esporos exibem cápsulas polares de dimensões semelhantes ou desiguais. De modo marcante, os esporos de *H. pisciforme* diferem dos esporos das demais espécies brasileiras no seguinte aspecto anatômico: a região anterior se estreita para a formação de um botão mamilar terminal; a presença de um apêndice caudal espesso é compartilhado apenas com *H. travassosi* Guimarães & Bergamin, 1933. Nas demais espécies brasileiras do gênero *Henneguya* o apêndice caudal é relativamente mais estreito.

No lago onde foram capturados os exemplares de *H. anisitsi,* cohabitam *Astyanax bimaculatus* (L., 1978); *Cheirodon notomelas* Eigenmann, 1915;

Aphyocheirodon hemigrammus Eigenmann, 1915; *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1968); *Odontostilbe microcephala* Eigenmann, 1907; *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824).

Apesar da intimidade reinante entre as várias espécies de peixes neste habitat restrito, somente *H. anisitsi* apresenta-se parasitando; tal circunstância demonstra uma intensa especificidade parasitária, talvez suficiente para considerar o mixosporídeo como sendo uma nova espécie.

Alguns mixosporídeos têm sido assinalados como agentes produtores de enfermidades; Davis [6] (1924) e Chakravarty [3] (1939) afirmam que tais protozoários são, realmente, patogênicos. É aceito que *Myxobolus pfeifferi* Thélohan, 1895, é causador de doença fatal, enquanto *M. cyprini* Dofflein, 1898, é responsável por processo supurativo do rim, fígado e baço de *Cyprinus carpio* L. Essas observações são confirmadas por Bauer [2] (1961), em culturas de carpa, onde *M. cyprini* e *M. dispar* Thélohan, 1895, parecem ser as espécies mais importantes como agentes patogênicos; o mesmo foi verificado em ambientes naturais (Petruchevskii & Schulman [24], 1961). *Ceratomyxa* sp., infectando *Gobioides rubicundus* mostrou-se fatal, em condições laboratoriais (Ray [28], 1933). Kudo (1934) [18] opina não ser propriamente o protozoário o causador da doença, eventualmente mortal, mas que o quadro patológico seria conseqüência de infecção secundária, por bactérias ou fungos. *H. anisitsi,* infectados por *H. pisciforme* e mantidos em aquários, não apresentaram doença parasitária, mantendo-se, aparentemente, em boa condição hígida.

A espécie em discussão é suficientemente diferente para justificar o seu reconhecimento como nova.

ABSTRACT: The morphology and some stages of the life-cycle of one myxosporidian parasite from the gill filaments of *Hyphessobrycon anisitsi,* freshwater fish, collected at Campinas, SP, Brazil, are described. The name *Henneguya pisciforme* n. sp. is given. Observations have been made about prevalence of infection and absence of pathogenicity.

KEYWORDS: (*) *Henneguya pisciforme* n. sp.; (*) Myxosporea; (*) *Hyphessobrycon anisitsi;* Characidae.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Prof. Dr. Ivan Sazima, do Departamento de Zoologia da Unicamp, a identificação das espécies de peixes referidas da localidade trabalhada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAGÃO, H. *Myxobolus lutzi* n. sp. *Rev. Soc. Bras. Sci., 3*:235, 1918.

2. BAUER, O. N. Parasitic diseases of cultural fish and methods of their prevention and treatment. *In:* DOGIEL, V. A. et al., Eds. *Parasitology of fishes.* Olivier & Boyd., London. p. 265-298, 1961.

3. CHAKRAVARTY, M. Studies on mâxosporidia from fishes of Bengal, with a note on the myxosporidian infection in aquaria fishes. *Arch. f. Protistenk., 92*:169-178, 1939.

CORDEIRO, N. S.; ARTIGAS, P. T.; GIÓIA, I. & LIMA, R. S. *Henneguya pisciforme* n. sp., mixosporídeo parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:61-69, 1983/84.

---

4. CUNHA, A. M. da & FONSECA, O. da. Sobre os Mixosporídeos dos Peixes Brasileiros. *Brasil-Médico, 31* (38) :321, 1917.

5. CUNHA, A. M. da & FONSECA, O. da. Estudo sobre os Mixosporídeos dos Peixes do Brasil. *Ann. 8.º Cong. Bras. Med., 1*:693-694, 1918.

6. DAVIS, H. S. A new myxosporiidan parasite, the cause of "wormy" halibut. Rep. U.S. Comm., Fisheries for 1923. Appendix *8*:1-5, 1924.

7. DUNKERLY, J. S. *Agarella gracilis*, a new species and genus of Myxosporidian, parasitic in *Lepidosiren paradoxa. Proc. Roy. Soc. Edinb., 19*:213, 1915.

8. GUIMARÃES, J. R. A. *Mixosporídeos da Ichtiofauna brasileira.* Tese, 50 p. Faculdade de Medicina de São Paulo, 1931.

9. GUIMARÃES, J. R. A. & BERGAMIN, F. Considerações sobre as ictioepizootias produzidas pelos Mixosporídeos de gênero *Henneguya Thélohan*, 1892. *Henneguya travassosi sp. n.* Rev. Ind. Anim., *10*:1151-1156, 1933.

10. GUIMARÃES, J. R. A. & BERGAMIN, F. *Henneguya santae* sp. n. Um novo mixosporídeo parasito de *Tetragnopterus* sp. *Rev. Ind. Anim., 12*:110-113, 1934.

11. GURLEY, R. R. On the classification of myxosporidia, a group of protozoan parasites infesting fishes. *Bull. U.S. Fish. Comm., 11*:407-420, 1893.

12. HOFFMAN, G. L.; PUTZ, R. E. & DUNBAR, C. L. Studies on *Myxozoma cartilaginis* n. sp. (Protozoa: Myxosporidea) of centrarchid fish and a synopsis of the *Myxosoma* of North American fresh-water fishes. *J. Protozool., 12* (3) :319-332, 1965.

13. JAKOWSKA, S. & NIGRELLI, R. F. The pathology of myxosporidiosis in the electrical eel, *Electrophorus electricus* (Linnaeus), caused by *Henneguya visceralis* and *H. electrica* spp. nov. *Zoologica* (NY), *38*:183-191, 1953.

14. KENT, L. M. & HOFFMAN, G. L. Two new species of Myxozoa, *Myxobolus inaequus* sp. n. and *Henneguya theca* sp. n. from the brain of a South American Knife fish, *Eigemannia virescens* (V.). *J. Protozool., 3* (1) :91-94, 1984.

15. KUDO, R. Studies on Myxosporidia. A Synopsis of genera and species of myxosporidia. *III. Biol. Monogr. 5* (3-4) :1-265, 2 text fig., 25 pls., 1920.

16. KUDO, R. Histozoic myxosporidia found in fresh-water fishes of Illinois, USA. *Arch. f. Protistenk., 65*:364-378, 6 pls., 1929.

17. KUDO, R. A toxonomic consideration of Myxosporidia. *Trans. Amer. Micr. Soc., 52* (3) :195-216, 1933.

18. KUDO, R. Studies on some protozoans parasites of fishes of Illinois. *III. Biol. Monogr., 13* (1) :5-44, 1934.

19. LABBÉ, A. Sporozoa. Das Tierreich. 180pp., 1899.

20. MIGONE, L. E. Parasitologie de certains animaux du Paraguay. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Paris, 9*:359-364, 1916.

21. MÜLLER, J. Ueber eine eigenthümlich Krankhafte parasitische Bildung mit specifisch organisierten Samenkörperchen. *Arch. Anat. Phys. u. wiss. Med., 5*:477-488, 1841.

22. NEMECZEK, A. A Beiträge zur Kenntnis der Myxosporidienfauna Brasiliens. *Arc. Protistenk., 54* (1) :137-149, 17 test fig., PI.7, 1926.

23. PENIDO, J. C. N. Quelques nouvelles Myxosporidies parasites des Poissons d'eau douce du Brésil. *C. R. Soc. Biol. Paris, 97*:850-852, 1927.

24. PETRUCHEVSKII, G. & SCHULMAN, S. S. The parasitic diseases of fish in the natural waters of the USSR. *In:* DOGIEL, V. A. et al., Eds. *Parasitology of fishes.* Oliver & Boyd. London. p. 219-319, 1961.

25. PINTO, C. *Henneguya wenyoni* n. sp. mixosporidie parasite des branchies de poisson d'eau douce du Brésil. *C. R. Soc. Biol. Paris, 98* (17) :1580, 1928a.

CORDEIRO, N. S.; ARTIGAS, P. T.; GIÓIA, I. & LIMA, R. S. *Henneguya pisciforme* n. sp., mixosporídeo parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:61-69, 1983/84.

---

26. PINTO, C. *Myxobolus noguchii, M. stokesi* e *Henneguya iheringi*, espécies novas de mixosporídeos de peixe de água doce do Brasil. *Bol. Biol.*, *12*:41-43, Figs. 1-4, 1928b.

27. PINTO, C. *Myxidium gurgeli* n. sp. myxosporídeo da vesícula biliar de peixe (*Acestrorhampus* sp.) de água doce do Brasil. *Sci. Med.*, *4* (2) :86-87, 2 Figs. texto, 1928c.

28. RAY, H. N. Preliminary observations on Myxosporidia from India. *Current Sci.*, *1*, 1933.

29. SPLENDORE, A. Trypanosomes des Poissons brésiliens. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Paris*, pp. 524, 1910.

Recebido para publicação em 17/10/1983 e aceito em 19/07/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:71-80, 1983/84

APOSTOLEPIS DIMIDIATA (JAN, 1862), NOVA COMBINAÇÃO, E A VALIDADE DE *A. ERYTHRONOTA* (PETERS, 1880) E *A. VENTRIMACULATA* LEMA, 1978. (SERPENTES: COLUBRIDAE: ELAPOMORPHINAE) [1]

Thales de LEMA *

RESUMO: O exame comparativo dos dados até agora registrados sobre as espécies, *Elapomojus dimidiatus*, *Apostolepis erythronota* e *A. ventrimaculata*, mostrou tratar-se de apenas uma espécie, *A. dimidiata*, nova combinação, de morfologia muito variável, principalmente na região cefálica. Por outro lado, exclui da sinonímia, *A. erythronotus var. lineata* Cope, 1887, que, previamente a consideramos como espécie válida. Fica, pois, invalidado o gênero *Elapomojus*.

PALAVRAS-CHAVE: *Elapomojus dimidiatus*, *Apostolepis erythronota*, *Apostolepis ventrimaculata*, *A. dimidiata* n. comb., variação morfocefálica.

INTRODUÇÃO

Elapomorphus (Elapomojus) dimidiatus Jan, 1862 foi descrita com base em um exemplar descorado e foi revisto apenas por Amaral[7], que elevou o subgênero à categoria genérica. Até o momento essa pretensa espécie conserva-se válida, apesar de diversos autores em épocas diferentes terem lançado dúvidas sobre sua validade. A espécie mais próxima, *Apostolepis erythronota* (Peters, 1880) é aceita como boa espécie. Outra, *A. ventrimaculata* Lema, 1978, também é afim a ambas. Na ocasião em que descrevemos esta última, notamos que, grande parte das espécies do gênero *Apostolepis* Cope, 1862 foi descrita com base em apenas um espécimen, geralmente já colecionado em um grande museu e totalmente sem cor.

Nesta nota taxonômica comunicamos o resultado do exame que procedemos em todos os registros publicados sobre as três espécies citadas, bem como supostos sinônimos. Estamos examinando séries de exemplares, cujos resultados serão objeto de outros artigos, incluindo-se, entre eles, a validade dos gêneros *Apostolepis*, *Elapomorphus* Wiegmann, 1843 e *Parapostolepis* Amaral, 1929.

---

1 Bolsa CNPq (Proc. 306090/83).

* Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 1188, 90000, Porto Alegre, RS, Brasil.

LEMA, T. de *Apostolepis dimidiata* (Jan, 1862), nova combinação, e a validade de *A. erythronota* (Peters, 1880) e *A. ventrimaculata* Lema, 1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:71-80, 1983/84.

RESULTADOS

Analisamos a bibliografia em ordem cronológica de apresentação das publicações e apresentamos aqui os resultados dessa análise crítica na mesma seqüência mas por nomes científicos:

A — *Elapomorphus dimidiatus:*

Jan[1] (1862) descreveu-a com base em um espécimen fixado no Museu de História Natural de Milão e com a procedência "Brasil". Determinou-o como *Elapomorphus (sensu lato),* mas semi-isolou-a no novo subgênero *Elapomojus,* que ora criava, por possuir escudete loreal, três pares de mentais e temporal grande isolando os parietais das supralabiais. Parece não ter visto o trabalho de Cope[25] (1862), em que este último cria o gênero *Apostolepis,* ou não concordava com seu colega norte-americano. Como ambos os artigos surgiram no mesmo ano, é possível que ambos se desconhecessem pois, Cope[25] não citou a espécie de Jan[1]. Jan & Sordelli[2] (1866) apresentaram desenhos do holótipo e cujo exame permite ampliar a descrição original. Strauch[3,3a] (1884, 1885) redescreveu o holótipo e afirmou que a presença de três pares de mentais pode ser uma anomalia e que a espécie aproxima-se de *A. erythronota.* Boulenger[4] (1896) isolou-a no gênero "Elapomoius", correção mal feita de *Elapomojus.* Berg[5] (1898) examinou um espécimen de *"Elapomorphus dimidiatus"*, assim identificado no "Gabinete de História Natural" da Universidade Nacional de Buenos Aires, afirmando ser da espécie *A. erythronota.* Corrigiu o nome genérico para *"Elapomohoeus"* e afirmou que *E. dimidiatus* devia ser um exemplar anômalo de *A. erythronota.* Bertoni[6] (1913), relacionando fauna do Paraguai, incluiu *"Elapomoius dimidiatus",* dizendo ser esta espécie comum naquele país. Amaral[7] (1929) afirmou que, apenas o holótipo era conhecido e que comprovara sua descrição e desenhos originais. Corrigiu[4,5] para *Elapomojus,* mantendo a espécie, apesar de achar que o holótipo era um anômalo de *A. erythronota,* tendo notado que o mesmo estava mal conservado. Manteve esse nome em suas listas [8,10]. Schouten [9] (1931) repetiu Bertoni[6]. Peters & Orejas-Miranda[11] (1970), Lema[12] (1978) e Savitzky[13] (1979) seguiram Amaral[7].

A cor loura citada[1] deve ser devida ao descoramento[7], sendo que o pigmento vermelho é o primeiro a alterar-se no fixador.

A crer nos registros[6,9], essa espécie seria comum no Paraguai. Entretanto, duas possibilidades se nos antepõem: (a) determinação errada, ou (b) determinação correta. Não podemos concluir nada porque não há dados nas listas[6,9], nem citação de exemplares para reexame.

O padrão cromático do holótipo é o mesmo de *A. erythronota,* minimizando-se pequenas diferenças e as manchas pretas ventrais. A presença de loreal no holótipo (1/1) vem caracterizando o gênero e a espécie, mas, o exame dos desenhos de Jan[2] mostra que são anômalos, pois, além de serem muito pequenos, os escudos contíguos, nasal e ocular, mostram-se truncados, como divididos, com fusão dos pedaços que seriam os loreais. Observando-se a forma do nasal e preocular em diversos exemplares de diferentes espécies de *Apostolepis,* não há esse aspecto truncado. Por outro lado, como não há outro táxon de Elapomorphinae com loreal, o táxon de Jan seria exceção. Portanto, a presença de loreais no holótipo é anômala. (Fig. 1).

O holótipo apresenta um temporal muito grande de cada lado (Fig. 1) e o supralabial que lhe fica abaixo (V) é muito pequeno. Nenhuma espécie de Elapomorphinae tem temporal semelhante. Deve, pois, tratar-se de anomalia. A presença de três pares de mentais no holótipo é, obviamente, uma anomalia, não só pelo fato em si mas também porque os dois pares anteriores são muito pequenos em relação ao posterior, indicando-nos divisão equatorial no par anterior.

Quanto ao escurecimento ocorrente nas escamas vertebrais do final do tronco do holótipo, pode ser discreto melanismo individual. As faixas pleurais "pardo-escuras"[1], deviam ser pretas, pois é sabido que, em serpentes após vários anos no fixador, o preto torna-se pardo-ferrugíneo. A coloração cefálica do holótipo é igual à de *A. erythronota*. O debrum claro nas escamas dorsais pretas do tronco e cauda é típico de *A. erythronota* e assim também as manchas ventrais pretas e que estão descoradas no holótipo.

O exame de séries de exemplares de *Elapomorphus (Phalotris) spegazzinii* Boulenger e *E. (P.) lemniscatus* Duméril, Bibron et Duméril[27] mostrou que os escudos cefálicos variam na forma e até podem faltar em um lado ou simetricamente, causando contato entre parietais e supralabiais. Por outro lado, podem haver ázigos e divisões, aumentando o número de fâneros, como os supralabiais, que variam de 5 a 7, sendo a normalidade 6.

B — *Apostolepis erythronota:*

Peters[14] (1880) descreveu-a com base em espécimen fixado do Museu de Berlim, cuja procedência é "São Paulo" e identificado como *Elapomorphus (sensu lato)*. Diferenciou-a das espécies então, conhecidas por uma série de caracteres, os quais, de resto, são comuns ao gênero *Apostolepis*, exceto a cor preta cefálica e nos lados do corpo. Aproximou-a de *A. dorbignyi* (Duméril, Bibron et Duméril, 1854) mas diferenciando-a facilmente desta porque esta é toda vermelha dorsalmente. A descrição original é pobre de dados e sem ilustração. Strauch[3] descreveu um exemplar de "Ipanema", que fica em São Paulo, Brasil e não Rio de Janeiro, como, de um modo geral é aceito. Usa[3] *Apostolepis* como subgênero de *Elapomorphus*. Afirmou[3] que a maior ou menor projeção do focinho[4,17] pode estar ligada ao sexo. Pôs em evidência uma contradição de Peters[14] quando disse que sua espécie não tem temporais e, mais adiante, que tem temporais pequenos (posteriores). Peracca[15] descreveu um exemplar do Paraguai que Boulenger[4] corrigiu para *A. ambiniger*, espécie comum e simpátrica com *A. erythronota* no Paraguai. Descreveu[4] resumidamente essa espécie com dados da descrição original e outras[3,16]. Incluiu a forma *lineata*[16] na sinonímia o que é contraditório porque ela difere totalmente de *A. erythronota*. Koslowsky[18] listou-a num lote de exemplares adquirido pelo Museo de La Plata, Argentina, do colecionador particular C. Bach, capturado em Miranda, cidade à margem esquerda do rio Paraná, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, fronteiro ao Paraguai meridional. Bertoni[6] e Schouten[9] citaram-na para o Paraguai afirmando ser comum nesse país. Magalhães[19] listou-a para o Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, como um recebimento pelo posto do Instituto Oswaldo Cruz instalado na cidade de Pelotas, a Sudeste desse Estado. Gliesch[23] afirmou que a espécie ocorre em Pelotas, Rio Grande do Sul, mas, sendo um trabalho de divulgação é possível que tenha compilado[19]. Parece-nos ter havido erro de determinação por parte de Magalhães[19]

e Gliesch[23] porque, na região de Pelotas é muito comum *Elapomorphus (Phalotris) lemniscatus trilineatus* Boulenger, 1889, pois ambos os autores não eram muito versados em sistemática de ofídios. Amaral[8] deu a distribuição geográfica desde São Paulo até Mato Grosso no Brasil, e para o Paraguai e a Argentina setentrional. Inclue[8] na sinonímia *lineata* Cope, sem ter visto esta. E assim procedeu em trabalhos subseqüentes[10,26]. Peters & Orejas-Miranda[11] apresentaram uma chave para *Apostolepis* na qual esta espécie está diferenciada pelo ventre manchado de preto, mas incluem *lineata* em sua sinonímia. Amaral[24] apresentou estampa colorida de um exemplar adulto procedente de São Paulo, Brasil, no qual visualiza-se a presença de temporais posteriores quase vestigiais, sem dúvida anômalos. Lema[12] seguiu outros[4, 7, 13]. Savitzky[13] defendeu a origem neotropical dos Micrurinae a partir de ancestral Elapomorphinae e descreveu o hemipênis de *A. erythronota.*

É digno de nota que a maioria dos autores aproximou esta espécie de *A. dorbignyi,* inclusive Prado[22]. No entanto, são tantas as diferenças entre ambas que discordamos. Boulenger [4] afirmou que ambas têm a cabeça morfologicamente iguais o que é falso: *dorbignyi* tem cabeça curta, alta, larga e focinho arredondado; *erythronota* possui a cabeça longa, afilada, deprimida, com focinho projetado. *A. erythronota* aproxima-se de *A. ambiniger* e de *A. flavotorquata.*

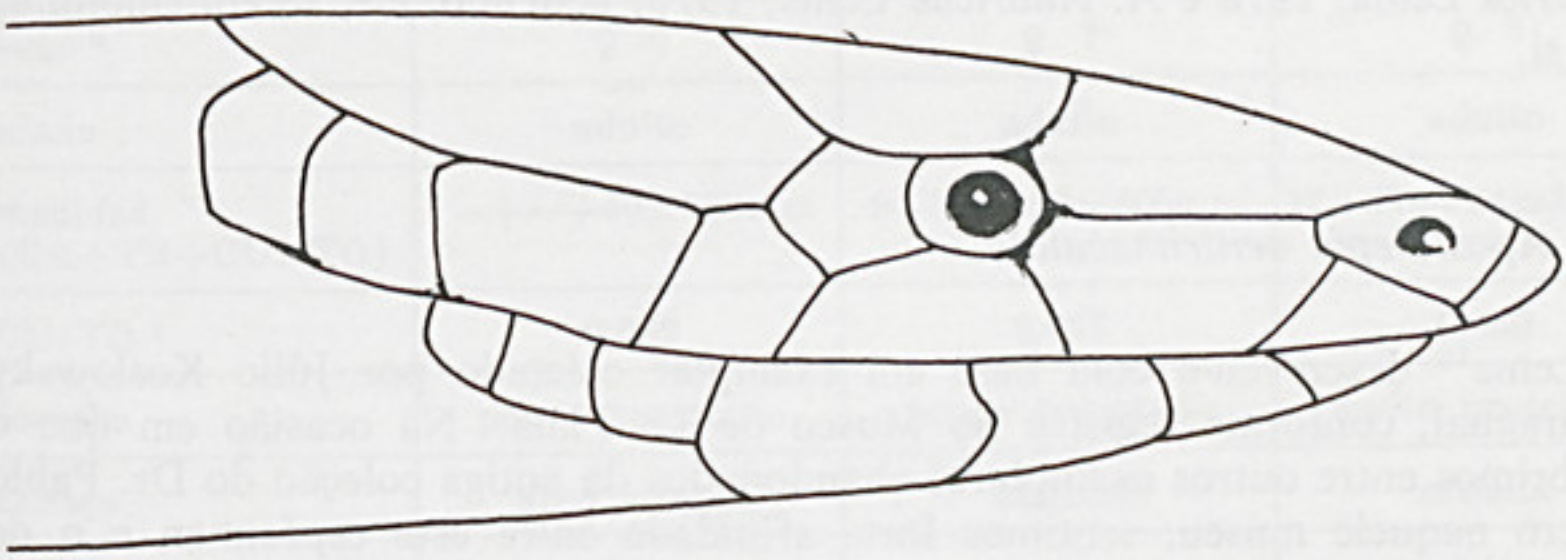
C — *Apostolepis nigriceps:*

Werner[17] descreveu esta espécie com base em exemplar procedente de São Paulo, Brasil, e comparou-a com *A. dorbignyi,* diferenciando-a pela forma do frontal, falta de preocular (ou falta de loreal?) e presença de postoculares muito grandes. A descrição é resumida. Amaral[7] igualou-a a *A. erythronota,* após ter examinado o holótipo no Museu de Mônaco e tê-lo comparado com um cótipo da última depositado no Museu de Viena, concluindo que Werner baseou-se na separação do nasal com preocular, no contato de três supralabiais com parietal (IV-V-VI) e que o isolamento entre nasal e preocular é variável; notou fusão do preocular com internasoprefrontal (anomalia), que o contato dos três labiais com parietal só ocorre à direita e que o IV supralabial só toca o parietal por seu ângulo súpero-posterior e que, à esquerda, o IV labial está totalmente isolado do parietal. Berg[5] descreveu um exemplar de *A. erythronota* com os três últimos labiais tocando parietais. O exame da figura de Werner[17] mostrou-nos: cabeça deprimida, muito alongada (a crer no desenho), com escutelação cefálica notadamente anômala, vendo-se fusão do II supralabial com preocular, 5 supralabiais apenas à esquerda mas o V é anômalo (longo demais) (Fig. 2). A cor vermelha citada[17] para os lados e face inferior da cabeça interpretamos como variação na pigmentação cefálica.

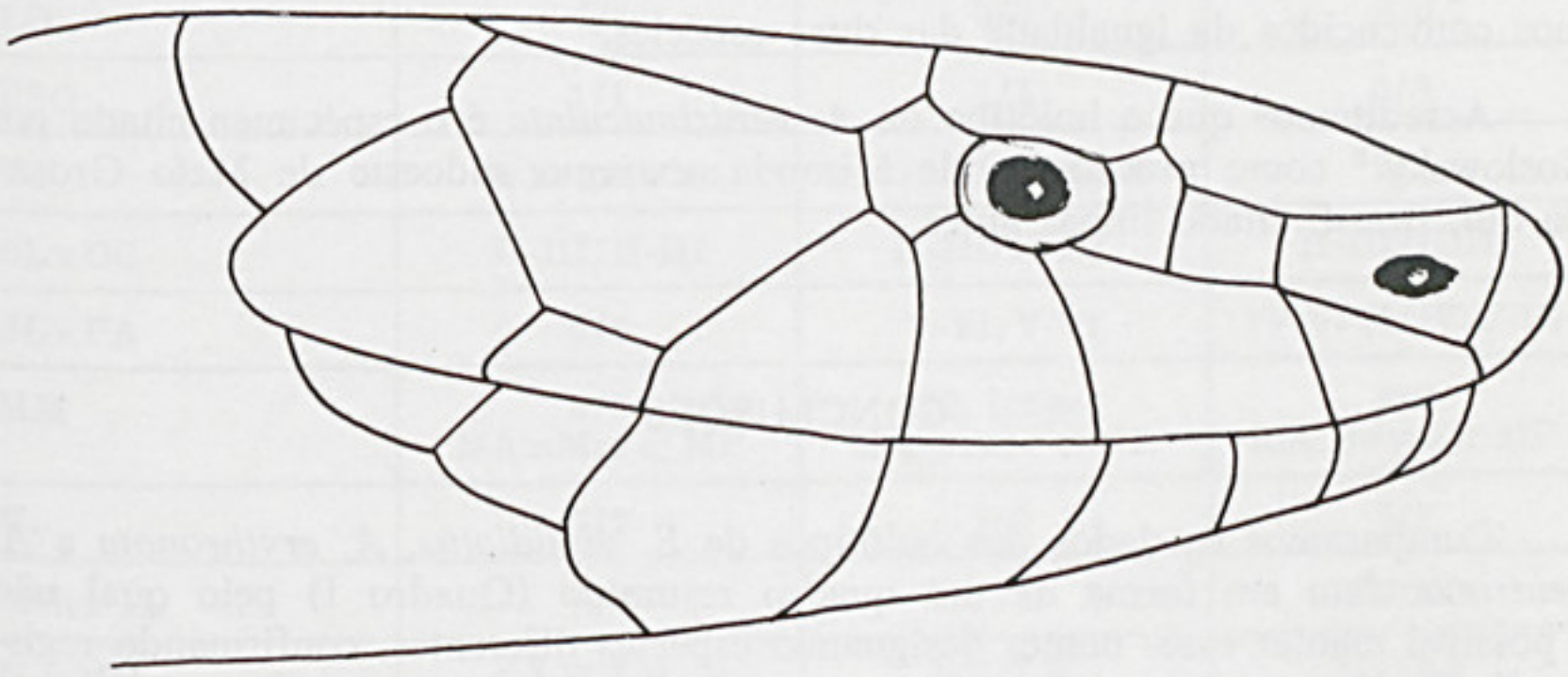
D — *Apostolepis erythronota var. lineata:*

Cope[16] apenas citou este táxon com base em dois exemplares capturados em "Mato Grosso", Brasil (síntipos), diferenciando-os por ter estrias longitudinais em vez de faixas pretas. Boulenger[4] igualou-a à *A. erythronota* sem comentar essa pretensa variedade. Desde então nunca mais se tocou no assunto!

1



2



3

Fig. 1 — *Elapomorphus (Elapomojus) dimidiatus* Jan, 1862 — Aspeto da cabeça, segundo JAN & SORDELLI (2), do holótipo no Museu de Milão.

Fig. 2 — *Apostolepis nigriceps* Werner, 1897 — Aspeto da cabeça segundo o próprio autor, do holótipo no Museu de München (17).

Fig. 3 — *Apostolepis ventrimaculatus* Lema, 1978 — Aspeto da cabeça do holótipo no Museu de La Plata, Argentina, segundo o autor (12).

LEMA, T. de *Apostolepis dimidiata* (Jan, 1862), nova combinação, e a validade de *A. erythronota* (Peters, 1880) e *A. ventrimaculata* Lema, 1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:71-80, 1983/84.

A citação de *A. erythronota* em Mato Grosso[20] foi baseada somente em Cope[16]. Há uma discordância[11] na chave quando esta caracteriza *A. erythronota* com padrão não-lineado e presença de fila dupla de manchas pretas ventrais ao mesmo tempo que inclui *lineata* na sinonímia desta.

A. erythronota lineata não foi descrita, nenhum autor examinou os síntipos, ninguém discutiu seu status, como não há na bibliografia nenhum dado auxiliar! Examinamos fotos dos mesmos, cedidas pela Academia de Ciências Naturais de Filadélfia e achamos muito estranho que Cope, autor cuidadoso, típico isolador de espécies, tenha considerado o táxon como uma variedade de *A. erythronota.* Na verdade, essa pretensa variedade pertence a outro grupo filogenético de *Apostolepis.* Ainda não sabemos até que ponto é válido o nome copeano e propomos previamente seu isolamento como espécie inquirenda, *A. lineata,* do grupo das espécies lineadas, ventre imaculado, clara no paraventre. É afim de *A. barrioi* Lema, 1978 e *A. villaricae* Lema, 1978, podendo, até, serem sinônimas entre si.

E — *Apostolepis ventrimaculata:*

Lema[12] descreveu-a com base em exemplar coletado por Júlio Koslowsky no Paraguai, conforme registro no Museo de La Plata. Na ocasião em que o descobrimos entre outros exemplares abandonados da antiga coleção do Dr. Pablo Gaggero naquele museu, sentimos forte afinidade entre este espécimen e o de *E. dimidiatus,* mas o isolamos pela presença do loreal, presença de dois pares de mentais, ausência de temporais e a contatação dos três últimos superlabiais com parietais (Fig. 3).

Após examinar séries de exemplares de *A. erythronota* posteriormente, ficamos convencidos da igualdade das duas espécies.

Acreditamos que o holótipo de *A. ventrimaculata* é o espécimen citado por Koslowsky[18] como procedente de Miranda, extremo sudoeste de Mato Grosso do Sul, Brasil, citado linhas antes.

CONCLUSÕES

Comparamos os dados dos holótipos de *E. dimidiatus, A. erythronota* e *A. ventrimaculata* em forma de um quadro resumido (Quadro I) pelo qual não é possível manter esses nomes designando espécies diferentes, confirmando registros[21] de que se não se pode mais determinar exemplares de *Apostolepis* com base apenas na presença ou ausência ou comparação ou não de escudos cefálicos. Essas serpentes são subterrâneas e por isso, são muito variáveis.

Pretendemos estabelecer parâmetros para as diferentes espécies com base em exame de séries de exemplares, mas não será uma tarefa fácil porque, de muitas espécies (nomes?) apenas se conhece o holótipo.

LEMA, T. de *Apostolepis dimidiata* (Jan, 1862), nova combinação, e a validade de *A. erythronota* (Peters, 1880) e *A. ventrimaculata* Lema, 1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:71-80, 1983/84.

QUADRO I

Comparação dos dados dos holótipos de *E. dimidiatus*, *E. erythronotus* e *A. ventrimaculatus*. Convenções: AN, anal; CA, comprimento da cabeça; CU, comprimento da cauda; DO. escamas dorsais; IL, infralabial; LO, loreal; MM, mentais; Mm, mental mediano; MP, mental posterior; MPC, mancha preta caudal; NA, nasal; OC, ocular; PA, parietais; PRO, preoculares; PSO, póstoculares; SC, subcaudais; SL, supralabiais; SPC, supracaudais; TE, terminal; TO, comprimento total; TR, comprimento do tronco; TT, temporais; VE, ventrais

Caracteres	*Elapomorphus (Elapomojus) dimidiatus* Jan	*Elapomorphus erythronotus* Peters	*Apostolepis ventrimaculatus* Lema
localidade-tipo	Brasil	São Paulo, BR	Paraguay/MS, BR
sexo *	♀ ?	♀ ?	♀ ?
idade	adulto	adulto	adulto
medidas (CA+TR+CU=TO)	−+−+40=580mm	9+368+23=400mm	12+379+34=425mm
CU/TO *	0,068	0,057	0,080
focinho	pouco projetado	pouco projetado	muito projetado
cabeça	algo afilada	afilada	afilada
PRO	1/1	1/1	1/1
NAx/PRO	NA/PRO	NA×PRO	NA×PRO
NA	grande	longo	grande
LO	1/1	0/0	0/0
PSO	1/1	1/1	0/0
TT	1/1, grandes	0+1/0+1, pequenos	1/1
SL×OC	II-III/II-III	II-III/II-III	II-III/II-III
SL×PA	0/4	V-VI/V-VI	IV-V-VI/IV-V-VI
MM	3/3 MA=Mm < MP	2/2, longos MA pouco < MP	2/2 MA pouco < MP
IL	7/7	7/7	7/7
maior IL	V/V	V/V	IV/IV
IL×MM	I-V/I-V	I-V/I-V	I-V/I-V
SPC (1/2 CU)	8	?	6
VE	246	244	2+244
AN	1/1	1/1	1/1
SC	26/26	28/28	26/26

SC/VE	0,105	0,114	0,106
COR CA	preta	preta	preta
ANEIS NUCAIS	preto unido cor CA	ídem	ídem
COR VERTEBRAL	loura, DO post. escurecidas basalmente	cor de tijolo	creme sujo
faixa pleural - larg.	4,5 DO	4,5 DO	4,5 DO
debrum claro DO	+	+	+
preta cor do ventre	claro com manchas pretas, 1/1 linha média clara	escuro, com 2 séries de manchas pretas, aumentando para trás	duas séries de manchas pretas, que se juntam posteriormente, linha média clara
MPC	1/4 final	1/4 final	1/3 final
SPC×SC	SPC > SC	SPC > SC	SPC > SC
TE	branco	branco	creme latero-ventralmente, preto em cima

(* se o espécimen com cauda maior é ♀, os outros também deve ser)

A presença de loreal é uma anomalia (atavismo?) e os temporais geralmente não ocorrem; quando isso acontece eles são pequenos, quase vestigiais. A forma do focinho é um caráter que merece um estudo aprofundado pois varia desde o arredondado ao afilado, de alto a deprimido. O focinho de *A. erythronota* é fortemente projetado, como no holótipo de *A. nigriceps,* destoando do de *E. dimidiatus.* Notamos, entretanto, que na região do Paraguai essas serpentes tendem a possuir focinho afilado, motivando a criação do gênero *Rhynchonyx* Peters, 1869 para *ambiniger.* Em séries de exemplares de *A. erythronota* notamos a predominância do focinho afilado mas, também, alguns arredondados. Não sabemos se isso está ligado ao sexo, como dito antes[3], ou à idade ou à população. Só após finalizar nossa revisão da espécie estaremos em condições de concluir sobre isso.

Resumimos as conclusões nos seguintes itens:

I — *Elapomojus* Jan é sinônimo de *Apostolepis* Cope.

II — *E. dimidiatus* Jan passa a chamar-se *Apostolepis dimidiata.*

III — *Apostolepis erythronota* é sinônima de *A. dimidiata.*

IV — O holótipo de E. *dimidiatus* é um exemplar anômalo de *A. erythronota.*

V — *Apostolepis erythronotus* var. *lineata* Cope fica isolada como espécie válida: *A. lineata,* previamente.

VI — *A. ventrimaculata* Lema é igual a *A. dimidiata.*

LEMA, T. de *Apostolepis dimidiata* (Jan, 1862), nova combinação, e a validade de *A. erythronota* (Peters, 1880) e *A. ventrimaculata* Lema, 1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:71-80, 1983/84.

VII — O holótipo de *A. dimidiata* n. comb., passa a ser representado pelo de *A. erythronota,* que é o segundo apresentado em ordem cronológica. A localidade-tipo passa, pois, a ser São Paulo, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Edmond V. Malnate, curador da coleção da The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, pelo envio das fotografias de exemplares de Elapomorphinae.

ABSTRACT: *Apostolepis dimidiata* (Jan, 1862), new combination, and the validity of *Apostolepis erythronota* (Peters, 1880) and *A. ventrimaculata* Lema, 1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae). This is a taxonomic study resultant of the comparative analysis of the data of the holotypes of *E. dimidiatus, Elapomorphus erythronotus, A. erythronotus* var. *lineata. A. nigriceps,* and *A. ventrimaculatus.* All these names refer to a single species, *A. dimidiata,* which are very variable in cephalic scutellation, pattern and head and snout form. The type-specimen (holotypus) is the *A. erythronota* because the Jan's specimen to be an anomalous. *A. lineata* is a valid species stated here previously. The redescription of these two taxa are subject of new researches that are in begining by the author.

KEYWORDS: *Elapomojus dimidiatus, Apostolepis erythronota, Apostolepis ventrimaculata, A. dimidiata* n. comb., morphocephalic variation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. do. *Animais venenîferos, venenos e antivenenos.* São Paulo, Caça & Pesca. 169p., 62 fig., 1945.

————. Contribuição ao conhecimento dos ophidios do Brasil. VIII. Lista remissiva dos ophidios do Brasil (2.ª edição). *Mem. Inst. Butantan, 10*:87-162+xix., 1936.

————. Estudos sobre ophidios neotropicos. XVII. Valor systematico de varias formas de ophidios neotropicos. *Mem. Inst. Butantan, 4*:3-68, 1929.

————. Contribuição ao conhecimento dos ophidios do Brasil. IV. Lista remissiva dos ophidios do Brasil. *op. cit.*:iv+71-125, 1929.

————. Estudos sobre ophidios neotropicos. XVIII. Lista remissiva dos ophidios da Região Neotropica. *op. cit.*:viii+129-272, 1929.

————. Notas sobre o Ofiologia neotrópica e brasílica. IX formas de biogíneos de recente registro. *Pap. av. Depto. Zool.*, S. Paulo, *5*(9):65-74, 1944.

————. Ophidios de Matto Grosso. Contribuição II para o conhecimento dos ophidios do Brasil. *Comun. Linhas telegr. estrat. MT-AM*, Publ. 84 (An. 5-Hist. nat.: Zoll.):1-29, il., 1925.

————. *Serpentes do Brasil. Iconografia colorida.* São Paulo, Instituto Nacional do Livro (Melhoramentos). 248p., 418 fig., 164 est., 1977.

————. *Op. cit.* 2.ª edição. São Paulo, Melhoramentos, 1978.

BERG, C. Contribuciones al conocimiento de la fauna erpetológica argentina y de los países limítrofes. *An. Mus. nac. Buenos Aires*, 6:1-35, 1898.

BERTONI, A. de W. Fauna paraguaya. Catalogos sistemáticos de los vertebrados del Paraguay. *in* M. S. BERTONI: *Descriptión física y económica del Paraguay.* Asunción, Brosa. 83p., 1913.

LEMA, T. de *Apostolepis dimidiata* (Jan, 1862), nova combinação, e a validade de *A. erythronota* (Peters, 1880) e *A. ventrimaculata* Lema, 1978. (Serpentes: Colubridae: Elapomorphinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:71-80, 1983/84.

BOULENGER, G. A. *Catalogue of the snakes in the British Museum (Natural-History)*. London, British Museum. 3 v., 1893/96.

COPE, E. D. Notes on *Elapomorphus* and *Coniophanes*. *Proc. Acad. nat. Sci. Phila., 1861*:524, 1862.

COPE, E. D. Synopsis of the Batrachia and Reptilia obtained by H. H. Smith in the Province of Mato Grosso, Brasil. *Proc. Amer. philos. Soc., Phila., 24*(125): 44-60, 1887.

GLIESCH, R. As cobras do Estado do Rio Grande do Sul. *Alm. agr. brasil.*, São Paulo, *14*:97-118, 23 figs., 1925.

JAN, G. Enumerazzione sistematica delle specie d'ofidi del gruppo Calamaridae. *Arch. Zool. Anat. Fisiol. Torino, 2*(1):1-76, est. v-vii., 1862.

JAN, G. & SORDELLI, F. *Iconographie générale des ophidiens*. AA+B. Tindall & Cox+Baillière+Bailly-Baillière, Milan, London, Paris & Madrid. 3 v., 50 livraisons, 39p., 300 est., 1860/81.

KOSLOWSKY, J. Ofídios de Matto-Grosso (Brasil). *Rev. Mus. La Plata, 8*:25-34, 3 fig., 1898.

LEMA, T. de. *Estudo monográfico de Elapomorphus lemniscatus Duméril, Bibron et Duméril, 1854, com o estudo de sua variação geográfica (Ophidia, Caenophidia, Colubridae, Colubrinae)*. Tese, Inst. Biociências da Pontifícia Univ. Católica do RGS, Porto Alegre, 2 v., 373p., 100 fig. (não publ.), 1977.

LEMA, T. de. Novas espécies de opistoglifodontes do gênero *Apostolepis* Cope, 1861 do Paraguai (Ophidia: Colubridae: Colubrinae). *Comum. Mus. Ci. PUC-RS*, Porto Alegre (18/19):27-49, figs. 1-14, 1978.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o estudo dos ophidios brasileiros. *A Folha Médica*, Rio de Janeiro, *3*(11):1-8, lest, 1900.

————. Contribuição para o estudo dos ophidios brasileiros. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 18*(1):151-161, est. 7-12, 1925.

PERACCA, M. G. Viaggio del dott. Alfredo Borelli nella Republica Argentina e nel Paraguay. X. Rettili ed Anfibi. *Boln. Mus. Zool. Univ. Torino, 10*(195):1-32, il., 1895.

PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the neotropical Squamata. Part. I. Snakes. *U.S. natl. Mus. Bull.* (297):viii+1-347, il., 1970.

PETERS, W. Über neue oder weniger bekannte Amphibien des Berliner Zoologischen Museums. *Monatsb. Akad. Wiss. Berlin, 1880*:217-224, 2 est., 1880.

PRADO, A. *Serpentes do Brasil*. São Paulo, Sítios & Fazendas. 134p., 22est., 1945.

SAVITZKY, A. H. *The origin of the New World proteroglyphous snakes and its bearing on the study of venom delivery systems in snakes*. Thesis (Ph-Dr), University Microfilms International, Lawrence, Kansas, viii+1+387p., 34fig., 1979.

SCHOUTEN, G. B. Contribuciones al conocimiento de la fauna herpetológica del Paraguay y de los países limítrofes. *Rev. Soc. cient. Paraguay, 3*(1):5-32, 1931.

STRAUCH, A. Bemerkungen über die Schlangengattung *Elapomorphus* aus der Familie der Calamariden. *Mélanges biol. Acad. imp. Sci. St. Pétersbourg., 12*: 141-211, 1884.

————. Bemerkungen über die Schlangengattung *Elapomorphus* aus der Familie der Calamariden. *Bull. Acad. imper. Sci. St. Pétersbourg, 29*:541-590, 1885.

WERNER, F. Ueber einige neue oder seltene Reptilien und Frösche der Zoologischen Sanmlung des Staates in München. *Sitz. Bayer. Akad. Wiss. München, 1897*: 203-220, il., 1897.

Recebido para publicação em 20/03/1984 e aceito em 28/03/1985.

Mem. Inst. Butantan
47/48:81-94, 1983/84

PRODUÇÃO DE VACINA PERTUSSIS POR DIFERENTES PROCESSOS — NíVEIS DE PROTEÇÃO E ASPECTOS ECONÔMICOS *

Maria Ivette Carboni MALUCELLI **
João Pessoa de Paula CARVALHO ***

RESUMO: Diferentes processos foram desenvolvidos para aumentar a produção de Vacina Pertussis a fim de atender à elevada demanda deste imunoterápico. A produção de Vacina Pertussis foi realizada pelos processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador. Foram analisadas a potência, o rendimento e a eficiência da vacina produzida por estes diferentes processos. Em todos os processos, a potência da vacina foi igual ou superior a 8 UI/ml, resultado que está de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde. O processo de Garrafa de Roux produziu vacina com maior média de potência (12,33 ± 3,11) quando comparado com os outros processos, mas com maior desvio-padrão. O Agitador produziu vacina com menor média de potência (10,99 ± 1,52) porém, com menor desvio-padrão, demonstrando, conseqüentemente, maior uniformidade metodológica. O rendimento, assim como a eficiência da vacina, foram maiores com o processo do Agitador.

PALAVRAS-CHAVE: Vacina Pertussis; coqueluche-vacina; Potência; rendimento e eficiência.

INTRODUÇÃO

A coqueluche, popularmente conhecida por "tosse comprida", é uma moléstia de distribuição cosmopolita que acomete, preferencialmente, crianças de 0 a 5 anos de idade.

Esta moléstia caracteriza-se por uma infecção respiratória localizada e com manifestações específicas de tosse paroxística, linfocitose, com sintomas e características epidemiológicas únicas.

À evolução prolongada da doença, bem como à gravidade com que a mesma se reveste, impõem-se medidas eficazes de controle.

---

* Extraído da Dissertação de Mestrado, defendida na Faculdade de Saúde Pública da USP, 1983.

** Pesquisador Científico Ref. PqC-1, Chefe da Seção de Vacinas Bacterianas do Instituto Butantan, CEP 05504, Caixa Postal 65, São Paulo, Brasil.

*** Professor Adjunto do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP, Av. Dr. Arnaldo, 715, CEP 01255, São Paulo, Brasil.

Embora medidas inespecíficas de controle, como isolamento e tratamento sejam adotadas, são as específicas, representadas pela imunização ativa dos suscetíveis, as mais recomendadas.

A vacinação sistemática contra a coqueluche é feita rotineiramente com três doses de Vacina Tríplice (Difteria-Tétano-Coqueluche) em crianças a partir de 2 meses até 4 anos de idade.

A Vacina Pertussis é uma suspensão de *B. pertussis,* fase I, morta por agentes físicos ou químicos, que associada aos toxóides diftérico e tetânico dá origem à Vacina Tríplice.

O requisito mínimo da Vacina Pertussis, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION[24], 1982), corresponde a 4 Unidades Imunizantes por dose (usualmente contida em 0,5 ml), aferida pela prova de proteção em camundongos infectados pela via intracerebral.

A prova de proteção em camundongos é o método obrigatório de comprovação da atividade protetora da vacina, não eliminando a necessidade de comprovação baseada em testes de campo.

Assim, as investigações efetuadas pelo Conselho de Pesquisas Médicas da Inglaterra (MEDICAL RESEARCH COUNCIL[12], 1956) demonstraram relação positiva entre os testes de potência em camundongos e nível de proteção em crianças vacinadas.

O método pioneiro de preparo da Vacina Pertussis é o cultivo do agente etiológico em meio sólido de Bordet-Gengou em Garrafas de Roux, executado por MADSEN[10], em 1933.

O método em meio sólido, embora apresente algumas vantagens, como eficácia e segurança, também apresenta algumas desvantagens, tais como: tempo prolongado de cultivo, baixo rendimento a nível industrial e exigência de longo tempo para sua destoxificação sob refrigeração, o que acarreta, muitas vezes, perda de potência (CATILLEJOS CARMONA & GONZÁLEZ PACHECO[1], 1981).

Na procura de métodos alternativos para contornar as desvantagens da utilização do sistema em meio sólido, HORNIBROOK[6] (1939), VERWEY & SAGE[21] (1945) e COHEN & WHEELER[2] (1946) verificaram que o meio líquido era mais adequado que o anterior. Seguiram-se outros trabalhos, visando melhorar as características do meio líquido (GOLDNER et alii[4], 1966; STAINER & SCHOLTE[16], 1971), bem como uma seleção mais criteriosa das cepas a serem semeadas (STAINER & SCHOLTE[16], 1971; VAN HEMERT[20], 1971).

A tecnologia de produção de vacinas, nos últimos anos, sofreu mudanças fundamentais com a introdução do uso de fermentadores. Este avanço tecnológico possibilitou efetiva simplificação no processamento de produção de vacinas. O cultivo em fermentadores, embora apresente um rendimento superior, tem seu valor protetor inferior, comparativamente ao método em meio sólido; porém, compatível com os padrões de imunogenicidade requeridos para a imunização de suscetíveis (GALICIA et alii[3], 1981; GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA[5], 1981).

Os fermentadores oferecem como vantagens o bom rendimento a nível industrial, maior homogeneidade de colheita, oferecendo maior confiabilidade. Em contrapartida, temos o custo elevado do equipamento e sua manutenção, assim como, necessidade de infra-estrutura adequada.

MALUCELLI, M. I. C. & CARVALHO, J. P. P. Produção de Vacina Pertussis por diferentes processos. Níveis de proteção e aspectos econômicos. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:81-94, 1983/84.

No momento, no Brasil, apenas o Instituto Butantan de São Paulo, produz a Vacina Pertussis, cuja produção de 1982 foi da ordem de 5 milhões de doses.

A demanda nacional é da ordem de 15 milhões de doses, segundo a informação projetada pelo Anuário Estatístico do Brasil, 1980, relativamente à população infantil de 0 a 4 anos de idade e considerando-se a vacinação de 75 a 85% desta população, submetida a um esquema completo de três doses e um reforço. Desta forma, pode-se inferir da necessidade iminente de fomentar-se a produção interna da Vacina Pertussis.

Preocupado em atender a esta elevada demanda, o Instituto Butantan tem procurado alternativas de metodologia de preparo de vacina, visando atender aos propósitos dos Serviços de Saúde Pública. Entre as alternativas, poder-se-ia adotar a produção da Vacina Pertussis pelo processo de cultivo submerso em frascos submetidos a agitação constante (Agitador).

Este processo tem sido utilizado em laboratórios, apenas para o preparo do inóculo, o qual é transferido para o fermentador para a produção final da vacina e, também, como um veículo para testes de meios de cultura (PUSZTAI et alii[14], 1961; LANE[9], 1970; STAINER & SCHOLTE[16], 1971; GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA[5], 1981; MEDINA GARCIA et alii[13], 1981; RECAMIER et alii[15], 1981).

A procura de um processo de produção mais simplificado e econômico levou-nos a estudar a viabilidade da produção da Vacina Pertussis pelo processo do Agitador, em comparação com aqueles tradicionalmente utilizados.

Assim, para este trabalho, estabeleceu-se o seguinte objetivo:

— avaliar comparativamente a produção da Vacina Pertussis pelos processos de Garrafa de Roux (método estacionário); Fermentador e Agitador (métodos de cultivo submerso), quanto a:

a) potência;

b) rendimento; e

c) eficiência (custo/benefício).

MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento prático deste trabalho foi realizado junto à Seção de Vacinas Bacterianas do Serviço de Bacteriologia da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, no período de 1981 a 1983.

CEPAS DE *Bordetella pertussis*

Para a produção de Vacina Pertussis, foram utilizadas as cepas números 137 e 143, provenientes do National Institute of Health (N.I.H.), Bethesda, Maryland, USA, liofilizadas, sorotipos 1.2.3.5.6. e a cepa número 18.323, da mesma procedência, a qual foi utilizada para a dose desafiante intracerebral em camundongos, segundo o método de KENDRICK et alii[7] (1947).

MEIOS DE CULTURA

Os seguintes meios de cultura foram utilizados para a produção da vacina e testes:

— Meio de Bordet-Gengou, ao qual é acrescentado sangue citratado de carneiro a 25% (KINDT & KÖRNER [8], 1969) utilizado para a preparação do inóculo e teste de viabilidade.

— Meio sólido de Holt (KINDT & KÖRNER [8], 1969) utilizado para o cultivo estacionário em Garrafas de Roux.

— Meio líquido de Cohen-Wheeler (COHEN & WHEELER [2], 1946) para o cultivo submerso em Fermentadores e Agitadores.

— Meio líquido de Sabouraud (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE [17], 1968) para o teste de esterilidade (detecção do crescimento de fungos).

— Meio líquido de tioglicolato (WORLD HEALTH ORGANIZATION [24], 1982) para o teste de esterilidade (detecção do crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias).

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da raça Swiss Webster, pesando 14 a 18 g, provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan, para os testes de potência e toxidez.

OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE *B. pertussis* PARA A PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS

Os processos de produção seguiram as determinações da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION [23], 1977) com algumas modificações de acordo com o Manual de Produção da Vacina Pertussis do Instituto Butantan.

CONTROLE DE QUALIDADE DAS SUSPENSÕES

Para controle de qualidade das suspensões obtidas pelos processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador, foram realizados os testes de pureza, identidade, esterilidade, opacidade, toxidez e potência, segundo determinações da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION [24], 1982).

O poder imunizante da vacina foi determinado pelo método contido no "Minimum Requirements for Pertussis Vaccine" (U.S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH [19], 1968), e os resultados calculados pelo procedimento de Worcester-Wilson (WORCESTER & WILSON [22], 1943; U.S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH [18], 1956).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calcularam-se as médias aritméticas, os desvios padrão e os coeficientes de variabilidade, segundo MARASCUILLO [11] (1971).

ANÁLISE ECONÔMICA

Quanto aos aspectos econômicos relativos à produção da vacina Pertussis pelos três processos em questão, tão-somente estarão sendo considerados, pela oportunidade e importância analítica deste trabalho, os pertinentes aos níveis de custo da matéria-prima básica, ou seja, meios de cultura necessários.

A análise econômica global das alternativas industriais analisadas, transcende ao âmbito do presente trabalho.

Portanto, a análise econômica baseou-se nos cálculos do rendimento e eficiência dos processos de produção da Vacina Pertussis, considerando-se apenas o custo do meio de cultura empregado.

Para a eficiência foram obtidos os valores em Cruzeiro (Cr$) dos meios de cultura.

Os valores, em Cruzeiro, por litro dos meios de cultura, foram calculados com base nos preços das drogas, de mão-de-obra e dos materiais de consumo empregados, relativamente ao início do 1.º semestre de 1983*.

Assim temos:

— Meio sólido de Holt: Cr$ 2.577,49 (dois mil, quinhentos e setenta e sete cruzeiros e quarenta e nove centavos).

— Meio de Cohen-Wheeler: Cr$ 1.163,16 (hum mil, cento e sessenta e três cruzeiros e dezesseis centavos).

RESULTADOS

Para o processamento dos resultados foram computados os volumes totais de suspensão de *B. pertussis* aprovados nos testes de pureza, identidade, esterilidade, viabilidade e toxidez, correspondente a 89, 39 e 34 lotes de suspensão respectivamente para os processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador.

Cada lote de cultura pura foi concentrado e submetido ao teste de opacidade a fim de se calcular o número de doses.

A determinação do número de doses após concentração da suspensão bacteriana de cada lote nos diferentes processos, foi obtido a partir do número de unidades opacimétricas (UO) e do volume (ml) da suspensão. Sabendo-se que 10 UO corresponde à unidade padrão para a obtenção de uma dose de vacina, fez-se a relação entre o total de unidades opacimétricas de cada lote e a unidade padrão para uma dose, cujo resultado é multiplicado pelo volume da suspensão bacteriana do mesmo lote.

Os lotes foram armazenados entre 2 a 8°C, aguardando a confirmação dos resultados dos testes usuais. Aqueles aprovados foram misturados, dando origem às partidas em número de 15, por processo, para serem submetidos posteriormente ao teste de potência.

---

* Dados obtidos na Seção de Meios de Cultura do Serviço de Controle e Técnicas Auxiliares da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan.

MALUCELLI, M. I. C. & CARVALHO, J. P. P. Produção de Vacina Pertussis por diferentes processos. Níveis de proteção e aspectos econômicos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:81-94, 1983/84.

DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA VACINA PERTUSSIS NOS DIFERENTES PROCESSOS DE PRODUÇÃO

De cada uma das 15 partidas aprovadas, obtidas em cada processo de produção, foi coletada uma alíquota para a realização do teste de potência, cujos valores encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1

Valores de potência (UI/ml) da Vacina Pertussis, segundo partida e processo, S.P.,1983

Partida \ Processo	Garrafa de Roux UI/ml	Fermentador UI/ml	Agitador UI/ml
1	12.0	11.2	8.0
2	11.2	12.8	11.2
3	13.4	14.4	9.6
4	12.0	16.0	11.2
5	9.7	12.8	12.0
6	8.0	11.9	10.8
7	19.7	13.4	9.6
8	11.4	9.9	9.9
9	10.8	13.1	13.1
10	8.0	12.8	12.9
11	10.8	9.8	13.4
12	13.4	10.8	11.2
13	18.3	8.0	8.8
14	13.4	8.8	12.0
15	12.8	12.0	11.2

Com os dados de potência da Tabela 1, foram calculados a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variabilidade por processo (Tabela 2).

TABELA 2

Valores da média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variabilidade das potências dos três processos empregados, S.P., 1983

Processo	x	s	C.V.
Garrafa de Roux	12,33	3,11	25,2
Fermentador	11,85	2,06	17,4
Agitador	10,99	1,52	13,8

x = média aritmética
s = desvio padrão
C.V. = coeficiente de variabilidade

MALUCELLI, M. I. C. & CARVALHO, J. P. P. Produção de Vacina Pertussis por diferentes processos. Níveis de proteção e aspectos econômicos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:81-94, 1983/84.

AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS

Para atender a este objetivo, foram considerados os volumes totais de meio de cultura pura e o respectivo número de doses de vacina.

O rendimento foi calculado pelo quociente entre o número de dose obtido e o volume de cultura pura, o qual foi designado pela letra Δ (delta), tendo sido calculado, individualmente, pelos processos empregados (Tabela 3).

TABELA 3

Vacina Pertussis, segundo processo de preparo e condição, S.P., 1983

Condição / Processo	Vol de cult. pura (ml)	N.º de doses	Rendimento Δ
Garrafa de Roux	3.082.950	3.250.723	1,05
Fermentador	959.600	1.739.629	1,81
Agitador	320.100	743.845	2,32
Total	4.362.650	5.734.197	—

Complementarmente, calculou-se a relação entre o rendimento dos processos considerados 2 a 2 (Tabela 4).

TABELA 4

Relação entre rendimentos da Vacina Pertussis pelos processos relacionados 2 a 2, S.P., 1983

Relação dos Processos	Relação dos Rendimentos
Agitador x Garrafa de Roux	2,21
Fermentador x Garrafa de Roux	1,72
Agitador x Fermentador	1,28

ESTUDO DA EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS

Neste estudo de eficiência da Vacina Pertussis, estabeleceu-se a relação entre o custo e o benefício.

Conforme já nos referimos, por custo, considerou-se os gastos em Cruzeiros (Cr$) apenas do meio de cultura e por benefício, o número de doses obtido pelos diversos processos.

Considerou-se adequado avaliar o custo por dose de vacina e para tanto houve a necessidade de se calcular, inicialmente, o volume de meio de cultura por unidade de dose obtida pela relação entre o volume de meio (ml) utilizado e o número de doses obtido. Assim:

$$\text{Vol. meio de cult. de uma dose} = \frac{\text{Vol. total do meio (ml)}}{\text{N.° de doses obtido}}$$

Conhecido o custo de cada meio de cultura, como referido no capítulo de Material e Métodos, calculou-se o custo de meio de cultura por unidade de vacina, segundo os processos empregados (Tabela 5).

TABELA 5

Custo de meio de cultura para uma dose dé Vacina Pertussis, segundo processo de preparo e condição, S.P., 1983

Condição / Processo	Vol. de meio/ dose (ml)	Custo do ml meio de cult. (Cr$)	Custo de meio cult. para uma dose (Cr$)
Garrafa de Roux	0,95	2,58	2,45
Fermentador	0,55	1,16	0,63
Agitador	0,43	1,16	0,49

Finalmente, verificou-se a relação entre as eficiências dos processos considerados 2 a 2 com o intento de se conhecer o número de vezes que um método é mais eficiente que outro (Tabela 6).

TABELA 6

Relação entre eficiência da Vacina Pertussis pelos processos relacionados 2 a 2, S.P., 1983

Relação dos Processos	Relação Entre Eficiência
Agitador x Garrafa de Roux	5,0
Fermentador x Garrafa de Roux	3,9
Agitador x Fermentador	1,3

DISCUSSÃO

A produção de Vacina Pertussis segundo três diferentes processos de produção (Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador) foi analisada segundo os critérios de proteção, rendimento e eficiência.

Como pode ser observado pelos resultados constantes da Tabela 1, todas as partidas, independentemente do processo utilizado, dosaram igual ou acima do padrão proposto pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, 8 UI/ml (WORLD HEALTH ORGANIZATION [24], 1982).

O processo de produção em que foi utilizada a Garrafa de Roux, apresentou maior média expressa em unidades de proteção (12,33 ± 3,11) que o Fermentador (11,85 ± 2,06) e o Agitador (10,99 ± 1,52) — Tabela 2. Por outro lado, o coeficiente de variabilidade entre os três processos foi menor para o Agitador (13,8%), seguido pelo Fermentador (17,4%) e Garrafa de Roux (25,2%) — Tabela 2. Estes dados estão de acordo com as referências de GALICIA et alii [3] (1981), os quais verificaram que a média de potência era maior em cultivos estacionários que em fermentadores sendo, porém, a dispersão dos resultados maior no primeiro processo. Salientam que pelo fato do processo do fermentador apresentar menor variação em unidades de potência, permite programar e controlar adequadamente o processo de produção.

À semelhança da observação do referido autor, os resultados obtidos na presente pesquisa revelaram menor variabilidade para o método do Agitador.

Por outro lado, estes dados não permitem concluir se um processo é melhor do que outro no que diz respeito à potência da vacina, uma vez que não existem dados que permitam avaliar se uma vacina que apresenta maior unidade de proteção, protege mais do que aquela com menor unidade de proteção. Assim, o significado epidemiológico da maior ou menor proteção da vacina ainda não é conhecido. Segundo ZAKHAROVA et alii [25] (1981), o grau de eficácia epidemiológica da vacinação varia muito, independente do número de unidades de proteção da vacina. Portanto, segundo estes autores, a importância prática do teste de proteção em camundongos é altamente convencional.

O rendimento dos três processos de produção da Vacina Pertussis foi analisado, estabelecendo-se relação entre o número de doses obtido e o volume de cultura pura. O melhor rendimento foi obtido pelo processo do Agitador ($\Delta = 2,32$), seguido pelo Fermentador ($\Delta = 1,81$) e Garrafa de Roux ($\Delta = 1,05$) — Tabela 3.

Calculando-se a relação entre o rendimento dos processos considerados 2 a 2, podemos observar que o Agitador produz 2,21 (2,32/1,05) vezes mais doses de vacina que o de Garrafa de Roux e 1,28 (2,32/1,81) vezes mais do que o Fermentador, enquanto que este produz 1,72 (1,81/1,05) vezes mais que o da Garrafa de Roux (Tabela 4).

Ao mesmo tempo, foi verificada a eficiência dos processos de produção, onde se estabeleceu a relação entre o custo e o número de doses obtido pelos diversos processos.

Os resultados mostraram que, enquanto são necessários 0,43 ml de meio de cultura para produzir uma dose de vacina pelo processo do Agitador, o Fermentador necessita 0,55 ml e a Garrafa de Roux 0,95 ml (Tabela 5).

Com base nesta relação, pode-se verificar que o custo de meio de cultura para obtenção de uma dose de vacina pelo processo do Agitador é de Cr$ 0,49 (quarenta e nove centavos), pelo Fermentador é de Cr$ 0,63 (sessenta e três centavos) e pela Garrafa de Roux Cr$ 2,45 (dois cruzeiros e quarenta e cinco centavos) — Tabela 5.

Estabelecendo-se a relação entre as eficiências dos processos considerados 2 a 2, verificou-se que o Agitador é 5,0 (2,45/0,49) vezes mais eficiente que a Garrafa de Roux e 1,3 (0,63/0,49) vezes mais eficiente que o Fermentador, enquanto que este é 3,9 (2,45/0,63) vezes mais eficiente que a Garrafa de Roux (Tabela 6).

Estes dados favorecem o processo do Agitador, em comparação com os outros, no que diz respeito ao rendimento e eficiência, uma vez que para se obter uma dose de vacina é necessário menor volume de meio de cultura e menor custo.

Ao analisarmos os rendimentos entre os diversos processos de produção, não encontramos dados que pudessem justificar as diferenças apresentadas.

O menor rendimento da Garrafa de Roux talvez se deva ao crescimento bacteriano apenas na superfície do meio de cultura, bem como pela heterogeneidade entre as colheitas. Estes aspectos refletem-se, provavelmente, em prejuízos da produtividade em larga escala e, conseqüentemente, no maior custo de produção.

A literatura não faz referência sobre os rendimentos entre os dois processos que utilizam cultivos submersos (Agitador e Fermentador).

Estes dois processos caracterizam-se por utilizar o mesmo meio de cultura e mesma concentração de inóculo, diferindo porém no que se refere à formação de espuma e aeração da cultura.

Assim, no Fermentador conseqüente à turbulência observa-se a formação de grande quantidade de espuma a despeito de se incorporar antiespumante (Antifoan, Dow Corning) na concentração de 0,9 ml/25 litros e que, segundo GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA [5] (1981), arrastaria o crescimento bacteriano para a superfície do meio, provocando a formação de grumos que seriam os responsáveis pelo baixo desenvolvimento bacteriano.

GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA [5] (1981) recomendam, ainda, a introdução de modificações nos equipamentos que impeçam a turbulência e dispensem a adição de antiespumante. Com estas alterações, os autores conseguiram elevar de 2 a 3 vezes o rendimento expresso em unidades de opacidade/ml.

A impossibilidade de se controlar a aeração do meio de cultura do Fermentador utilizado para este trabalho, talvez seja um outro fator responsável pela quebra do rendimento do processo.

Confrontados os três processos de produção da vacina, verificou-se que, embora o Agitador tivesse conferido menor média de potência comparativamente aos outros dois processos, a variabilidade dos resultados entre as diversas partidas foi menor e o rendimento e eficiência foram superiores.

Além destes aspectos, o Agitador oferece algumas vantagens: ausência de espuma durante o processo da agitação; dispensa a aeração forçada; a manipulação e manutenção são fáceis, pois exige uma infra-estrutura bastante

simples, com pequeno risco de contaminação que concorrem para o elevado rendimento do método. Como desvantagens podemos citar principalmente a heterogeneidade dos cultivos em função do número de frascos Erlenmeyer para o cultivo.

O Quadro 1 mostra, resumidamente, as vantagens e desvantagens dos três processos analisados.

QUADRO 1

Processo \ Características	Vantagens	Desvantagens
Garrafa de Roux	1. Vacina com maior potência 2. Não há necessidade de infra-estrutura sofisticada	1. Manipulação prolongada 2. Riscos de contaminação 3. Grande heterogeneidade de cultivos 4. Baixo rendimento 5. Maior volume de mão-de-obra 6. Custo elevado do meio de cultura e garrafas
Fermentador	2. Controle rigoroso de variação de pH, temperatura e crescimento 3. Menor volume de mão-de-obra	1. Perda total do cultivo em caso de contaminação 2. Necessidade de instalações apropriadas (infra-estrutura adequada) 3. Serviço de manutenção constante do equipamento e instalações (não permite interrupção no fornecimento de vapor, ar comprimido ou água) 4. Adição de antiespumante 5. Custo elevado do equipamento e manutenção
Agitador	1. Fácil manutenção 2. Fácil manipulação 3. Não utilização de antiespumante 4. Menor volume de mão-de-obra 5. Pequeno risco de contaminação 6. Não há necessidade de infra-estrutura sofisticada 7. Elevado rendimento e menores custos	1. Frascos grandes e pequeno volume de meio 2. Heterogeneidade de cultivos

Com base em todos os aspectos constantes dos resultados e do Quadro 1, é de se considerar a indicação deste último método na elaboração de Vacina Pertussis. Obviamente, os resultados ora encontrados são um incentivo a que

se prossiga com os estudos concernentes à produção da referida vacina em quantidade cada vez maior a custo cada vez menor, a fim de atender à demanda do país.

CONCLUSÕES

Após a realização da análise comparativa quanto à produção da Vacina Pertussis pelos processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador, em relação à potência, rendimento e eficiência, parece lícito concluir que:

1. QUANTO À POTÊNCIA

— Todos os processos analisados dosaram igual ou acima do padrão proposto pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, 8 UI/ml.

— O processo de Garrafa de Roux apresentou maior média em unidades de potência (12,33) em comparação ao Fermentador (11,85) e Agitador (10,99).

— O desvio padrão e o coeficiente de variabilidade da potência foram menores para o Agitador, demonstrando sua maior uniformidade metodológica.

2. QUANTO AO RENDIMENTO

— O maior rendimento foi obtido pelo processo do Agitador.

3. QUANTO À EFICIÊNCIA

— A eficiência demonstrou ser maior quando se utiliza o processo do Agitador.

ABSTRACT: Different methodological procedures have been developed to increase the production of Pertussis Vaccine in order to supply the increasing demand of this type of immunotherapic. The production of Pertussis Vaccine was assayed by the Roux Flask, the Fermentor and the Shaker process. The potency, the rate of production as well as the efficiency of the vaccine produced by these different procedures were analysed. Using these different methods the vaccine produced had a potency of 8 IU/ml or higher, a result which is in accordance to the recommendations of the World Health Organization. The Roux Flask method produced vaccine with the highest mean of potency (12.33±3.11) as compared to the other ones but with the highest standard deviation. The Shaker method produced vaccine with the lowest mean of potency (10.99± 1.52) but with a small standard deviation and consequently, with a more homogeneous pattern of production. The rate of production as well as the efficiency of the vaccine were higher with the Shaker method.

KEYWORDS: Pertussis Vaccine; Whooping Cough vaccine; potency; efficiency and rate of production.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASTILLEJOS CARMONA, C. R. & GONZÁLEZ PACHECO, M. Evaluación de cepas de *Bordetella pertussis* utilizadas en la producción de vacuna antipertussis en cultivo estacionario. *Salud púb. Méx.*, *23*:549-53, 1981.

MALUCELLI, M. I. C. & CARVALHO, J. P. P. Produção de Vacina Pertussis por diferentes processos. Níveis de proteção e aspectos econômicos. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:81-94, 1983/84.

---

2. COHEN, S. M. & WHEELER, M. W. Pertussis vaccine prepared with phase-I cultures grown in fluid medium. *Amer. J. Publ. Hlth.*, *36*:371-6, 1946.

3. GALICIA, O.; VILLALVA, H. & PÉREZ, A. Estudio comparativo de la potencia del componente pertussis en la vacuna DPT producido en cultivo estacionario y de fermentación. *Salud púb. Méx.*, *23*:607-11, 1981.

4. GOLDNER M.; JAKUS, C. M.; RHODES, H. K. & WILSON, R. J. The amino acid utilization by phase-I *Bordetella pertussis* in a chemically defined medium. *J. gen. Microb.*, *44*:439-44, 1966.

5. GÓMEZ REYES, I. & MEDINA GARCIA, A. Estudios iniciales para el desarrollo de procesos en la producción de vacunas bacterianas por cultivo agitado. *Salud púb. Méx.*, *23*:555-62, 1981.

6. HORNIBROOK, J. W. Cultivation of phase-I *H. pertussis* in a semisynthetic liquid medium. *Publ. Hlth. Rep.*, (Wash.), *54*:1847-51, 1939.

7. KENDRICK, P. L.; ELDERING, G.; DIXON, M. K. & MISHER, J. Mouse protection test in study of Pertussis vaccine. Comparative series using intracerebral route for challenge. *Am. J. Publ. Hlth.*, *36*:803-10, 1947.

8. KINDT. H. & KORNER, L. Improving the pertussis mouse protection test by growing the challeng culture on Holt's solid medium. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL ASSAY METHODS, London, 1967. *Symp. Ser. immunob. Stand.*, Basel, Karger, 1969. v.10, p. 29-32.

9. LANE, A. G. Use of glutamic acid to supplement fluid medium for cultivation of *Bordetella pertussis*. *Appl. Microbiol.*, *19*:512-20, 1970.

10. MADSEN, T. Vaccination against whooping-cough. *J. Am. med. Assoc.*, *101*:187-8, 1933.

11. MARASCUILLO, L. A. In: ———— *Statistical methods for behavioral science research*. New York, McGraw Hill, 1971. p. 173-200.

12. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Vaccination against whopping-cough. Relation between protection in children and results of laboratory tests. *Brit. med. J.*, *2*:454-62, 1956.

13. MEDINA GARCIA, A.; MARTÍN ESCOBAR, T. A. & REYES, T. E. Estudio comparativo de los medios de cultivo HBP-2 y FGP-1 en la producción de *Bordetella pertussis* por fermentación. *Salud púb. Méx.*, *23*:575-84, 1981.

14. PUSZTAL, Z.; JOÓ, I. & JUHÁSZ, V. P. Immunogenic properties of liquid shaken *Bordetella pertussis* culture. *Z. Immun. forschg. und Ther.*, *122*:278-90, 1961.

15. RECAMIER, L.; MEDINA, A. & RODRIGUEZ, H. Desarrollo de un processo de fermentación en la producción de vacuna pertussis. *Salud púb. Méx.*, *23*:563-73, 1981.

16. STAINER, D. W. & SCHOLTE, M. J. A simple chemically defined medium for the production of phase-I *Bordetella pertussis*. *J. gen. Microb.*, *63*:211-20, 1971.

17. U. S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. Biological Products Tiltle 42, Part 73, revised May 1968. *Public. Health Service Publication*, n.º 437, 1968 (Bethesda, Md).

18. U. S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Application of the method proposed by Wilson and Worcester for determining the ED_{50} to the evaluation of the potency of pertussis vaccine. Bethesda, Maryland, 1st. Revision, October 11, 1956.

19. U. S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Minimum Requirements for Pertussis Vaccine. Revised June 1968. Bethesda, Maryland, 1968.

20. VAN HEMERT, P. Vaccine prodution as a unit process. [Thesis doctoral] Rijks. Instituut voor de Volksgezondheid. Vaccine Department, Bilthoven, The Netherlands, 1971.

21. VERWEY, W. F. & SAGE, D. N. An improved culture medium for the growth of *B. pertussis*. *J. Bact.*, *49*:520-5, 1945.

MALUCELLI, M. I. C. & CARVALHO, J. P. P. Produção de Vacina Pertussis por diferentes processos. Níveis de proteção e aspectos econômicos. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:81-94, 1983/84.

22. WORCESTER, J. & WILSON, E. B. A table determining LD_{50} for the fifty percent end-point. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 29*:207-12, 1943.

23. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual for the production and control of vaccines. Pertussis vaccine BLG/UNDP/77.3. Rev. 1, 1977.

24. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual of details of tests required on final vaccines used in the WHO expanded programme of immunization. BLG/UNDP/82.1, 1982.

25. ZAKHAROVA, M. S.; MALIVANOVA, O. M.; SOKOLOVSKAYA, A. D.; SHAVROVA, E. N. & KAPUSTIK, L. A. The results of study of pertussis component of DPT vaccine produced in USSR and some other countries. *J. Hyg. Epidem.*, Praha, *25*:439-48, 1981.

Recebido para publicação em 22/03/1984 e aceito em 12/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:95-105, 1983/84

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN NEUROMUSCULAR JUNCTIONS OF MOUSE DIAPHRAGM CAUSED BY THE VENOM OF THE CORAL SNAKE *MICRURUS CORALLINUS*

Maria Alice da Cruz HOFLING *
Léa RODRIGUES-SIMIONI **
Oswaldo Vital BRAZIL **

ABSTRACT: The effects of *M. corallinus* venom on the ultrastructure of the neuromuscular junction were investigated in mouse phrenic nerve-diaphragm preparation. Crude venom (10 μg/ml) was added to the bath, and the muscle stimulated indirectly at 0.05 Hz for 90-180 min. The preparations were then fixed for electron microscopy. After 90 min the venom caused changes in the nerve terminals characterized by reduction in number and variation in size of synaptic vesicles, appearance of omega-shaped axolemmal indentations, swelling and disruption of mitochondria, increased electron density of the axoplasm, and a decrease in size of the terminal. By 180 min, many terminals had disappeared, and the synaptic gutter appeared shallow, but otherwise normal. No changes were seen in the postsynaptic folds or the muscle fibres. A remarkable finding was the presence of numerous finger-like membrane--bound bodies, between the nerve terminal and the Schwann cell, or covering the denervated postsynaptic sarcolemma. These bodies could have originated from Schwann cell processes. The results are in keeping with electrophysiological studies (Vital Brazil and Fontana, 1983) which indicate that the venom has a predominantly prejunctional action and blocks transmitter release.

KEYWORDS: Nerve terminal uitrastructure changes, Coral Snake venom, presynaptic action.

INTRODUCTION

American venomous snakes popularly known as coral snakes are members of the family *Elapidae* and all Brazilian species belong to the genus *Micrurus*. Coral snake venom, similarly to venoms of elapid snakes of Asia, Africa and

* Department of Histology and Embriology, Institute of Biology. State University of Campinas.

** Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), 13.100 Campinas, SP — Brazil.

HOFLING, M. A. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & BRAZIL, O. V. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:95-105, 1983/84.

Australia, causes paralysis of skeletal muscle of peripheral origin in humans and laboratory animals. Vital Brasil & Fontana, 1983/84.

Like the venom *Bungarus multicinctus* and those of some Australian snakes that of *Micrurus corallinus* exerts prejunctional action. The presynaptic neurotoxins from these venoms (β-bungarotoxin, taipoxin, notexin) produce ultrastructural alterations of the nerve terminals, mainly related to the number and localization of synaptic vesicles, and cause vacuolization and swelling of the mitochondria (Chen & Lee, 1970; Cull-Candy et al 1976, Tsai et al, 1976). There are indications that these morphological changes could provide clues to the presynaptic mechanism of snake toxins. It would therefore be interesting to see whether the venom of *M. corallinus* induces similar alterations, and to establish a correlation between the morphological changes and the electrophysiological findings of Vital Brazil and Fontana.

MATERIAL AND METHODS

Adult albino mice of both sexes (21-25 g) were killed and the diaphragms excised. The innervated hemidiaphragms were suspended in an organ bath containing Tyrode solution (with the following composition [mM]: NaC1 136.8, KC1 2.7; $CaC1_2$ 1.8; $NaHCO_3$ 11.9; $MgC1_2$ 0.25; NaH_2PO_4 0.3; glucose 11.0), incubated at 37°C and aerated with 5% CO_2 and 95% O_2. The phrenic nerves were stimulated for periods of 90, 120 and 180 min with maximal shocks of 0.05 Hz and 0.2 ms, with a Grass S48 stimulator. The contractions were isometrically recorded on an E & M Physiograph through a Linear-Core F50 transducer.

Control hemi-diaphragms were either fixed immediately for electron microscopy (see below) or treated as described above. In other hemi-diaphragms, 10 µg/ml of venom obtained from *M. corallinus* (from Eastern São Paulo State, Brazil) was added to the Tyrode, the diaphragms being stimulated as described. The LD50 (i.v.) of the venom was 400 (337 to 475) µg/kg in mice.

For electron microscopy, the hemi-diaphragms were cut into small pieces (1 mm^3) and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cocadylate buffer (pH 7.2) for 3 hr at 4°C. Specimens were post-fixed with 1% OsO_4 in the same buffer for 2 hr at 4°C, dehydrated in a graded series of ethanol followed by propylene oxide, and embedded in Epon-812. Thick sections (1-2 µm) were cut with glass knives and stained with Toluidine blue. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 30 min and 3-6 min respectively and examined with a Zeiss EM-9 S2 electron microscope.

RESULTS

Control preparations. The ultrastructure of the neuromuscular junction in control preparations (fig. 1) closely resembled previous observations in the mouse and other mammals. (Bowden & Duchen, 1976, Duchen 1971).

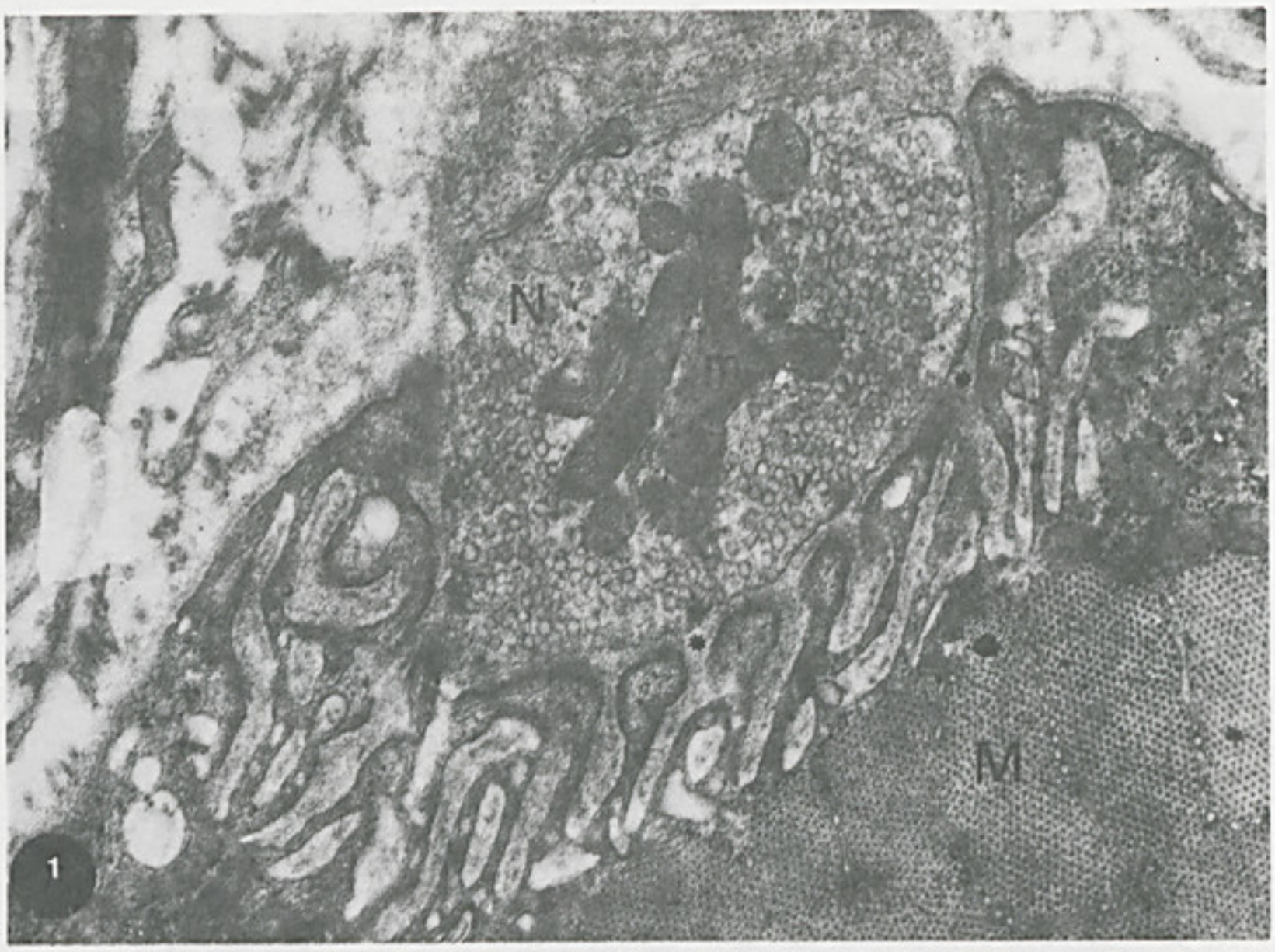


Fig. 1 — Normal motor end plate from a diaphragm stimulated with maximal pulses 0.2 msec 1 Hz in Tyrode solution for 180 min. The nerve terminal (N) contains mitochondria (m) and synaptic vesicles (v) and is separated from the post-synaptic folds of the muscle fiber (M) by basal lamina (*). A Schwann cell process (S) covers the nerve terminal. X 25000.

Venom-treated preparation. The ultrastructural changes produced by the venom were studied in six phrenic nerve-diaphragm preparations. Complete neuromuscular blockade occurred 30, 45 and 90 min after the addition of the venom (10 μg/ml) to the bath, in one, four and one experiments, respectively.

At *90 min* although neuromuscular transmission was completely blocked, most of the nerve terminals looked normal in the 30 motor end-plates examined. Only some of them had swollen or disrupted mitochondria with dense matrix, the axolemma indented and forming omega-shaped small invaginations (fig. 1). A few electron-lucent vacuoles and vesicles larger than synaptic vesicles could be found scattered in the axoplasm. In some terminals membrane-bound rounded structures, sometimes containing vesicles, were interposed between the terminal and the postsynaptic sarcolemma (fig. 2). The nature of this finding was not clear. It could represent cross-sectioned Schwann cell processes or sequestered bits of axoplasm with synaptic vesicles. Also, in many junctions round or oval membrane-bound profiles were seen between the nerve terminal and the Schwann cell processes (fig. 2). The number and size of synaptic vesicles appeared normal. The postsynaptic region showed normal-looking folds, and contained many ribosomes, mitochondria, microtubules, microfilaments and sole-plate nuclei.

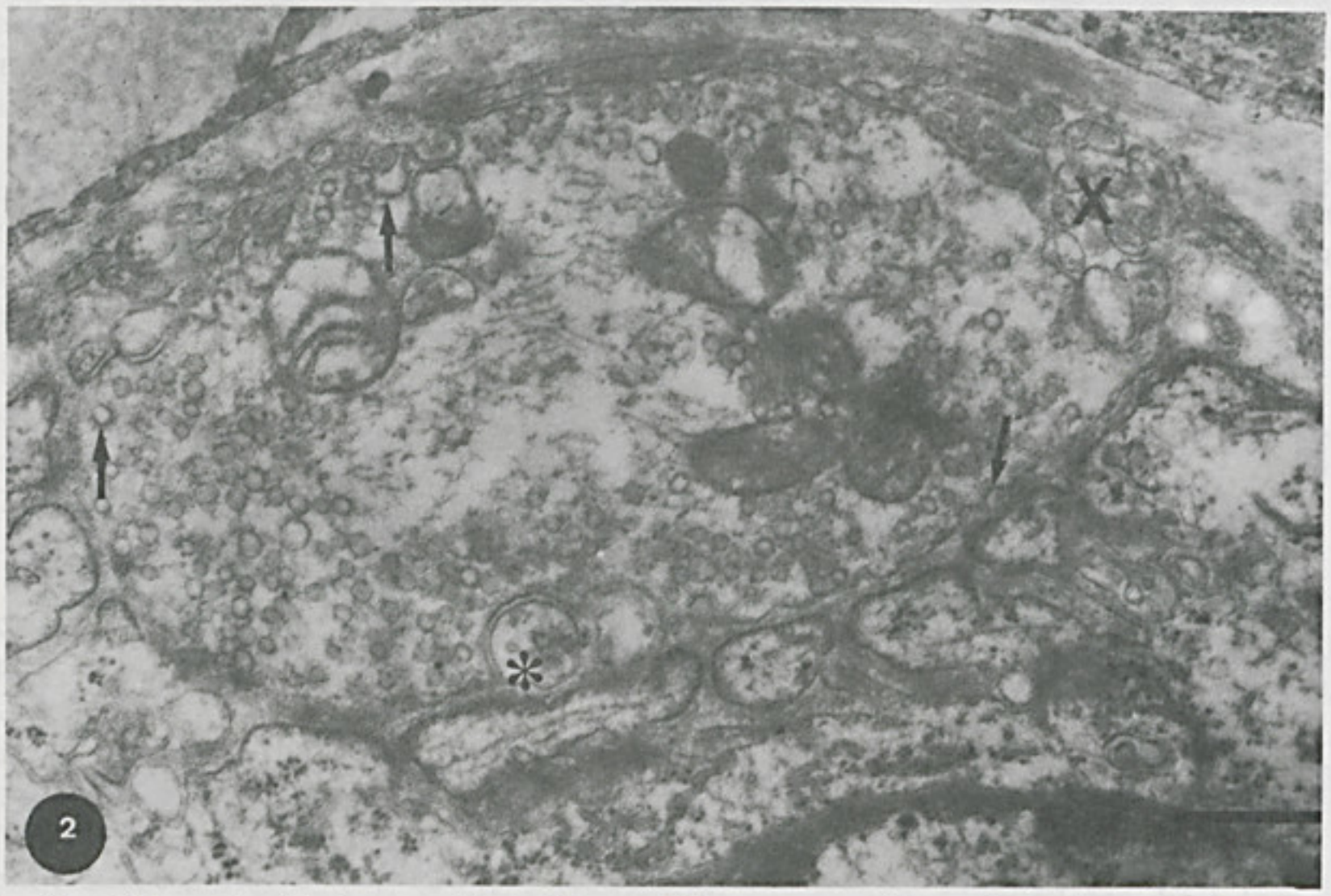


Fig. 2 — Nerve terminal exposed to *M. corallinus* venom (10 ug/ml) for 90 min shows synaptic vesicles in apparently normal number and distribution but with slight variation in size. Some mitochondria are swollen, neurotubules and neurofilaments appear normal. A membrane-bound body containing vesicles similar to synaptic vesicles is wedged between axolemma and sarcolemma (*). Omega-shaped indentations of the axolemma are seen (arrows). Membrane-bound bodies (X) lie over the nerve terminal. Junctional folds and a sole-plate nucleus appear normal. (Scale bar: 0.5 μm).

At *120 min* electron microscopic examination of 64 end-plates showed that almost all nerve endings were markedly depleted of synaptic vesicles, and the axoplasm appeared electron-lucent (fig. 3). The axolemma was uninterrupted but wavy (fig. 2) and in most terminals omega-shaped indentations were numerous and present both in the areas of axolemma facing the muscle and the Schwann cell (fig. 3). Some of the indentations had a thin coating of dense material similar to that of coated-vesicles. Coated-vesicles larger than synaptic vesicles could be found dispersed in the axoplasm. In some terminals, the mitochondria were swollen and vacuolated, but in others they were normal in appearance. Neurofilaments and neurotubules looked normal. Although no quantitative analyses were performed, some terminals appeared decreased in size. The synaptic gutter was not totally occupied by the terminal, but contained abundant rounded or finger-shaped membrane-bound bodies. These were already seen at 90 min, but became far more numerous at 120 and 180 min. These profiles usually contained little amorphous material, some showed vesicles and electron-dense corpuscles thought to be ribosomes (fig. 3 and 4).

HOFLING, M. A. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & BRAZIL, O. V. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:95-105, 1983/84.

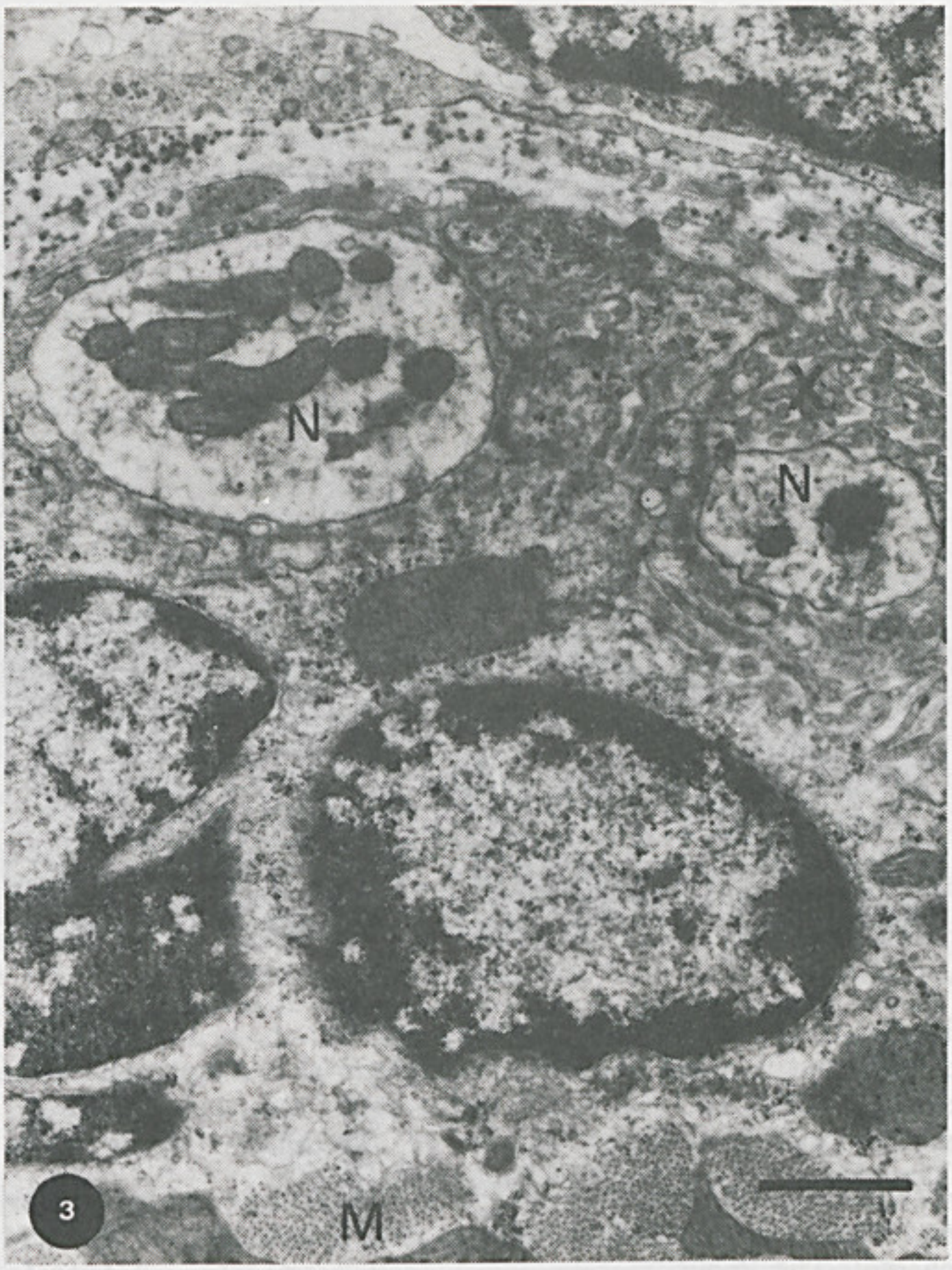


Fig. 3 — At 120 min electron-lucent nerve endings (N) are depleted of synaptic vesicles. Membrane-bound bodies (X) are interposed between the ending and the Schwann cell and to a lesser degree between the ending and the postsynaptic membrane. One of the endings appears shrunken. Muscle fibre (M). (Scale bar: 1 μm).

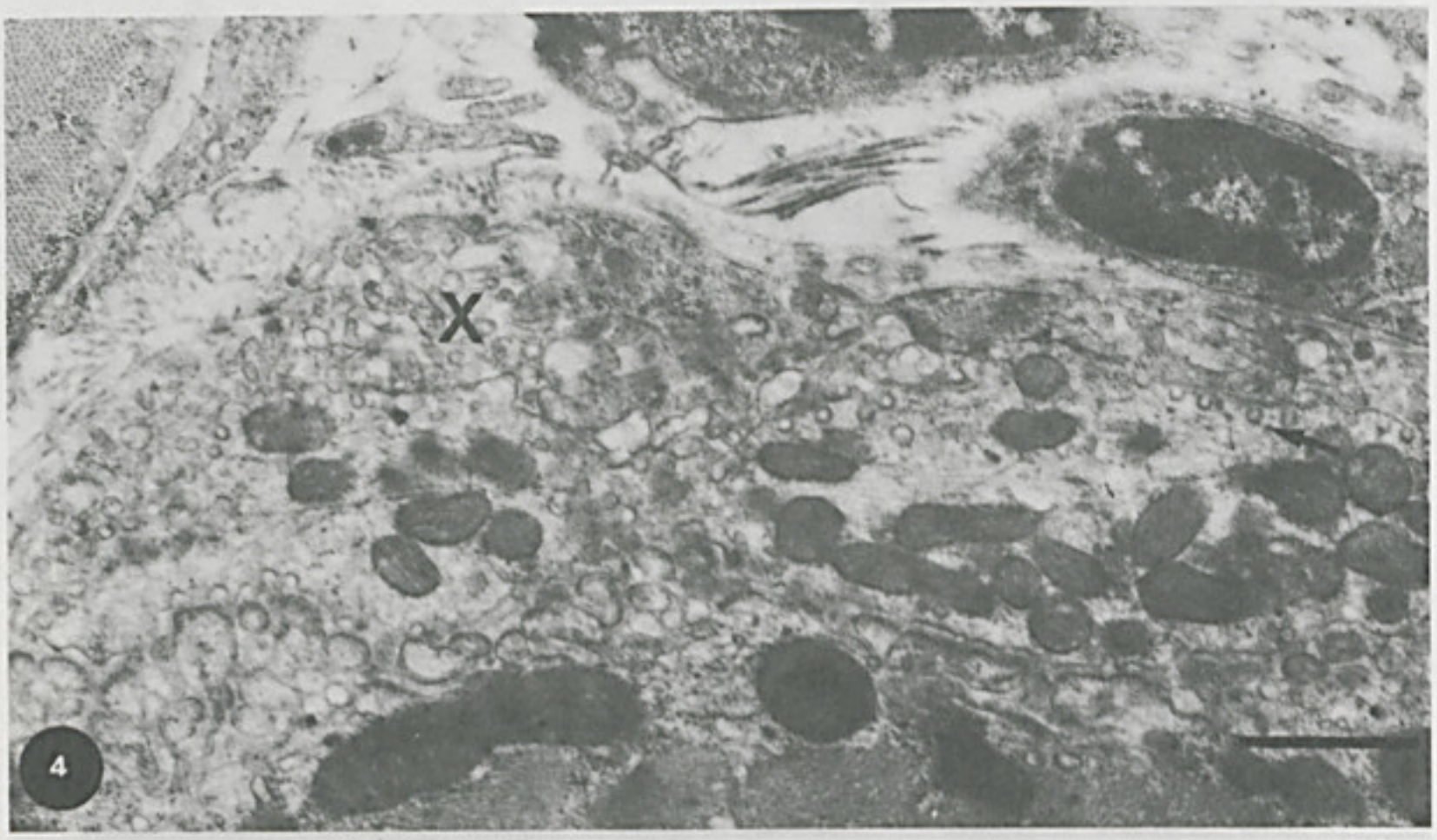


Fig. 4 — A nerve terminal at 120 min shows numerous omega-shaped indentations facing both the postsynaptic membrane and the Schwann cell (arrow). The terminal is depleted of synaptic vesicles, but mitochondria appear normal. Numerous rounded or finger-like membrane-bound bodies (X) cover the terminal. The synaptic gutter appears shallow. (Scale bar: 1 μm).

The postsynaptic region of the muscle fibres showed normal-looking postsynaptic folds, but in some fibres the sarcoplasm at the end-plates appeared loose and electron-lucent, and the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus had swollen cisternae. Other regions of the muscle fibres away from the end-plates did not show significant abnormalities.

At *180 min*, most terminals showed drastic reduction in size and some had disappeared. The main morphological features of these terminals were the absence of normal-sized synaptic vesicles, high electron density of the axoplasm, the presence of degenerated swollen or disrupted mitochondria (fig. 5), and numerous omega-like axolemmal indentations.

HOFLING, M. A. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & BRAZIL, O. V. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:95-105, 1983/84.

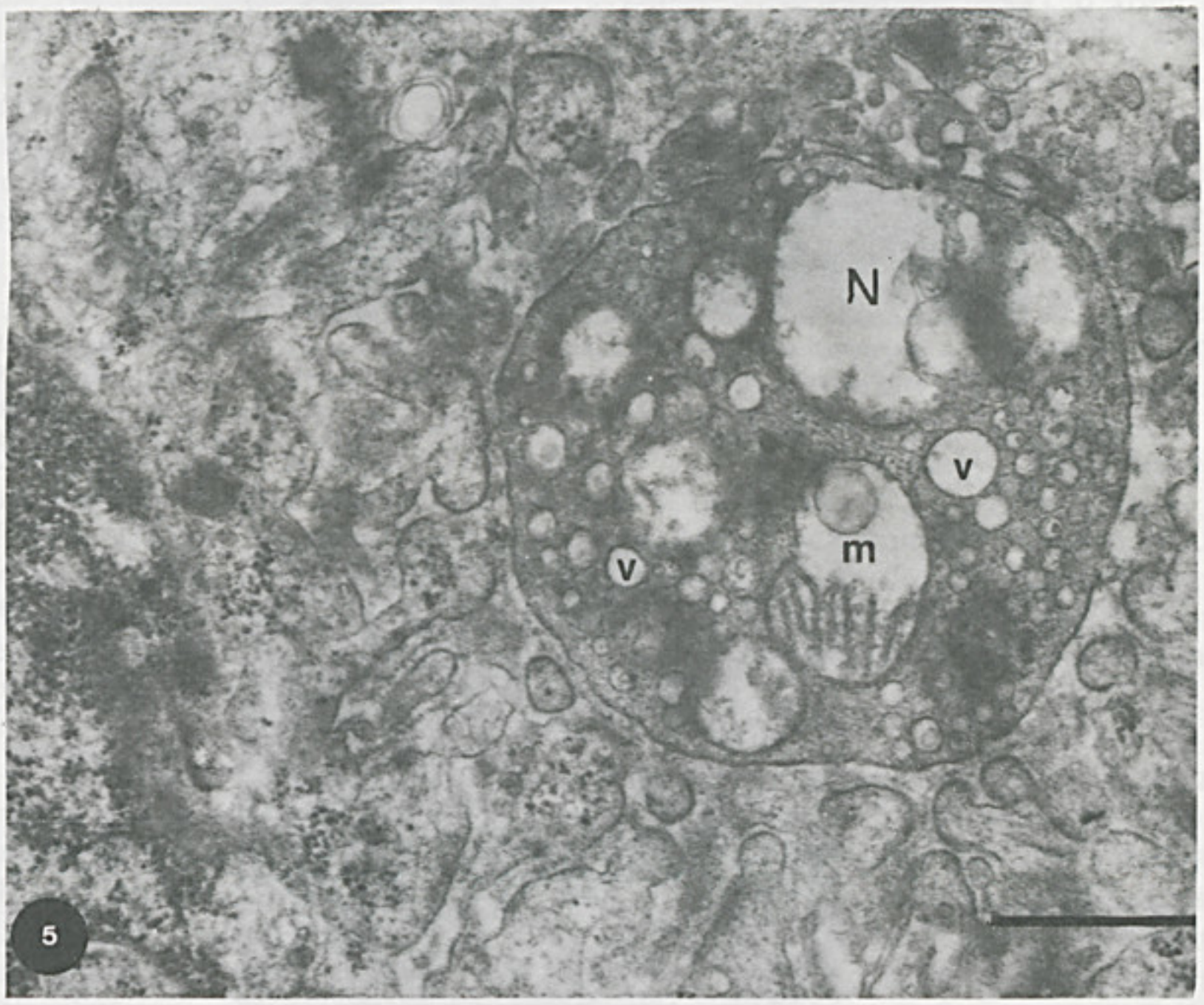


Fig. 5 — At 180 min a degenerated nerve terminal (N) contains electrondense axoplasm with swollen mitochondria (m), and vesicles (v) of variable diameter, usually larger than the synaptic vesicles. (Scale bar: 1 μm).

The synaptic gutter was shallow in many junctions and the Schwann cell nucleus was often seen close to the terminals. In those junctions where the terminal was partially degenerated or absent, the synaptic gutter contained many membrane-bound bodies as described earlier. Entirely similar bodies were sometimes observed in pre-terminal myelinated axons, both inside and outside the myelin sheath. Such findings occured at 120 as well as at 180 min (fig. 6, 7).

Fig. 6 — 120 min. A normal-looking pre-terminal axon is surrounded by myelin. Both inside and outside the myelin sheath there are abundant membrane-bound bodies (X), similar to those seen at the end-plate below. The latter contains a shrunken remnant of axonal terminal (A). The muscle fibre seems normal. (Scale bar: 0.5 μm).

Fig. 7 — 120 min. This picture probably represents a preterminal axon (A) at the last heminode, and its axonal terminal (N) at an end-plate. The continuity is supported by the basal lamina of the Schwann cell covering the axon (arrows), which reaches down to the Schwann cell processes over the terminal. Many membrane-bound bodies (X) are contained between the basal lamina and the myelin sheath and are also present over the postsynaptic folds at right. These bodies appear to be derived from the Schwann cell. (Scale bar: 1 μm).

DISCUSSION

The mode of action of *M. corallinus* venom in blocking neuromuscular transmission has been investigated by Vital Brazil and Fontana (1983/84), who suggested that the irreversible presynaptic action is more important in neuromuscular blockade than the postsynaptic one. The venom caused an increase of spontaneous ACh release even after neuromuscular blockade. However, the evoked ACh release was greatly reduced. The present study confirms that *M. corallinus* venom has a prejunctional neurotoxicity.

Presynaptic neurotoxins are found in some elapid and crotalid venoms such as β-bungarotoxin from the Formosa krait *Bungarus multicinctus* notexin from the Australian tiger snake *Notechis scutatus,* toxins III A and III B from the Indian krait, *Bungarus caeruleus,* taipoxin from the Australian taipan *Oxyuranus scutellatus,* and crotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus.* Some of these toxins e.g. taipoxin, notexin and crotoxin also exhibit myotoxic activity, while β-bungarotoxin seems to be exclusively neurotoxic. In this respect *M. corallinus* venom seems to act like β-bungarotoxin, since it does not alter muscle excitability. (Vital Brazil & Fontana, 1983/84).

In the present study the ultrastructural changes induced by *M. corallinus* venom in the nerve terminal included the appearance of omega-chaped axolemmal indentations, reduction in number of the synaptic vesicles and variation of their size, swelling and disruption of mitochondria, high electrondensity of the axoplasm and significant reduction in size of the terminals. These features are similar to those induced by β-bungarotoxin (Chen & Lee, 1970, Tsai et al, 1976), notexin, taipoxin (Cull-Candy et al, 1976), and crotoxin (Gopalabrishnakone & Hawgood 1979). All these toxins have been found to have phospholipase A_2 activity. *M. corallinus* venom also contains phospholipases (Hertel, personal communication) which could account for the presynaptic block and the morphological changes caused by the venom.

The present findings also suggest that presynaptic blockade after *M. coralli-nus* is not due to synaptic vesicle depletion because by 90 min the neuromuscular blockade was complete but the vesicle population was not exhausted. This is in agreement with the observation of Tsai *et al.,* (1976) and Chang and Lee (1973) on β-bungarotoxin. However, by 120 min the synaptic vesicles had disappeared from the terminals. Depletion was found to be accelerated by nerve stimulation, as observed with taipoxin and notexin. (Cull-Candy et al, 1976).

The nature of the abundant membrane-bound bodies seen close to degenarating terminals is unclear. Similar observations were made by Queiroz (1981) in crotoxin-treated mouse muscle in vivo. It is possible that the bodies could be fragments of the degenerating nerve terminal. They might also represent cross sections through finger-like Schwann cell processes, arising in response to direct venom action or an attempt at phagocytosis of debris.

This project was supported by grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP — Proc. Biol. 78/202).

HOFLING, M. A. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & BRAZIL, O. V. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:95-105, 1983/84.

RESUMO: Os efeitos do veneno de *M. corallinus* sobre a ultra-estrutura da junção neuromuscular, foram investigados em preparações isoladas nervo-frênico-diafragma de camundongo. O veneno bruto (10 μg/ml) foi adicionado ao banho, e o músculo estimulado indiretamente a 0.05 Hz por 90-180 min. As preparações foram então fixadas para exame ao microscópio eletrônico. O veneno causou alterações nas terminações nervosas caracterizadas pela redução do número e variação no tamanho das vesículas sinápticas, aparecimento de indentações axolemais em forma de ômega, inchamento e rompimento de mitocôndrias, densidade eletrônica do axoplasma aumentada, e diminuição no tamanho do terminal. Em 180 min muitos terminais desapareceram e a goteira sináptica mostrou-se pouco profunda, mas normal. Nenhuma alteração foi observada nas dobras pós-sinápticas ou nas fibras musculares. Uma observação marcante foi a presença de numerosos corpos membranosos digitiformes, entre o terminal nervoso e a célula de Schwann, ou cobrindo o sarcolema desnervado pós-sináptico. Esses corpos podem ter-se originado dos processo da célula de Schwann. Estes resultados corroboram os estudos eletrofisiológicos de Vital Brazil e Fontana (1983) que indicam que o veneno tem uma ação predominantemente prejuncional e bloqueadora da liberação do neurotransmissor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWDEN, R. E. M. & DUCHEN, L. W. The anatomy and pathology of neuromuscular junctions. *In*: The neuromuscular junction. Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 42, p. 23. Zaimis, E. (ed.), Springer: Berlin, 1976.

CHANG, C. C.; CHEN, T. F. & LEE, C. Y. Studies of the presynaptic effect of β-bungarotoxin on neuromuscular transmission. J. Pharmac. exp. Ther., *184*: 339-345, 1973.

CHEN, I. L. & LEE, C. Y. Ultrastructural changes in the motor nerve terminals caused by β-bungarotoxin. Virchows Arch. Abt. *B* Zellpath., *6*:318-325, 1970.

CULL-CANDY, S. G.; FOHLMAN, J.; GUSTAVSSON, LÜLLMANN-RAUCH, R. & THESLEFF, S. The effects of taipoxin and notexin on the function and fine structure of the murine neuromuscular junction. Neuroscience, *1*:175-180, 1976.

DUCHEN, L. W. An electron microscopic comparison of motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. J. neurol. Sci., *14*:37-45, 1971.

GOPALAKRISHNAKONE, P. & HAWGOOD, B. J. Morphological changes in murine nerve, neuromuscular junction and skeletal muscle induced by the crotoxin complex. J. Physiol., *291*:5-6, 1979.

QUEIROZ, L. S. Effects of neurotoxins on muscle and nerve in the mouse: Morphological and physiological studies. Ph.D thesis. University of London, England, 1981.

TSAI, M. C.; CHANG, C. C. & LEE, C. Y. The relation between the blockade of transmitter release and the ultrastructural changes of the motor nerve terminals caused by β-bungarotoxin. Memorial Volume to President Chiang Kai-Shek, 289-363, 1976.

HOFLING, M. A. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & BRAZIL, O. V. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:95-105, 1983/84.

VITAL BRAZIL, O. & FONTANA, M. D. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:13-26, 1983/84.

Recebido para publicação em 02/04/1984 e aceito em 29/03/1985.

Mem. Inst. Butantan
47/48:107-111, 1983/84

NEMATÓIDES DE PASSALIDAE (COLEOPTERA). DESCRIÇÃO DE *KLOSSNEMA REPENTINA* N. GÊN., N. SP. (NEMATODA: HYSTRIGNATHIDAE)

Nelson da Silva CORDEIRO *
Paulo de Toledo ARTIGAS *

RESUMO: Propõe-se a criação de uma nova espécie de oxiuróide, encontrado em passalídeos do Estado de São Paulo (Brasil), para o qual é proposta a denominação de *Klossnema repentina*. As características morfológicas desta nova espécie impõem a sua colocação em um novo gênero (*Klossnema*), para ser situado em uma nova subfamília (Klossnematinae).

PALAVRAS-CHAVE: Passalidae; Nematoda; Hystrignathidae; Klossnematinae n. subfam.; *Klossnema* n. gên.; *K. repentina* n. sp.

INTRODUÇÃO

Os coleópteros da família Passalidae são hospedeiros constantes de numerosas espécies de nematóides (Cordeiro[1], 1981). Segundo Travassos & Kloss[7] (1958), tais parasitas de passalídeos que integram essa fauna se restringiriam, necessariamente, a gêneros e espécies das famílias Lepidonematidae (Travassos[5], 1920) e Hystrignathidae Travassos & Kloss[7], 1958.

Em 1978, Clark[2] assinala a presença de nematóides intestinais, em passalídeos australianos, que classificou na família Thelastomatidae (Travassos[6], 1929).

No presente artigo, referimos um novo nematóide, encontrado com bastante freqüência na segunda porção do intestino posterior, na conceituação de Pereira & Kloss[4] (1966), em espécie de Passalidae brasileiros. Fizemos a descrição de uma subfamília nova, de novo gênero e da espécie tipo, aos quais damos respectivamente os nomes de Klossnematinae n. subfam. *Klossnema* n. gên. e *K. repentina* n. sp., em homenagem à Dra. Rita G. Kloss, que trabalhou intensivamente no grupo de nematóide de artrópodos.

* Departamento de Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas.
Endereço para correspondência: Departamento de Parasitologia, I.B., Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, Campinas, SP, Brasil.

CORDEIRO, N. S. & ARTIGAS, P. T. Nematóides de Passalidae (Coleoptera). Descrição de *Klossnema repentina* n. gên., n. sp. (Nematoda: Hystrignathidae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:107-111, 1983/84.

MATERIAL E MÉTODOS

Os coleópteros utilizados para as pesquisas da fauna helmíntica foram capturados no bosque da Zoologia, na Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", e na reserva de mata da Fazenda Santa Genebra, em Barão Geraldo, Campinas — São Paulo, Brasil. Os coleópteros eram sacrificados, para a colheita de parasitos, apenas poucos dias após sua captura. A obtenção de nematóides se realiza com a retirada do tubo digestivo, após a morte do inseto em atmosfera saturada de clorofórmio.

O material parasitológico foi microscopado ainda vivo em soluto fisiológico (4°/oo), entre lâmina e lamínula. Posteriormente foi transferido para o líquido conservador Railliet-Henry, levado à câmara clara onde foram obtidos os desenhos apresentados no texto.

RESULTADOS

Ordem Rhigonematiformes Kloss[3], 1960.

Nematóides parasitos do aparelho digestivo de artrópodos; apresentam o bulbo posterior do esôfago bem desenvolvido e dotado de válvulas masticatórias quitinizadas.

Superfamília Hystrignathoidea Kloss[3], 1960.

Rhigonematiformes. Machos com aparelho espicular ausente, tendo sido substituído, ou não, por formações cuticulares na extremidade dorsal; fêmeas com o corpo do esôfago subcilíndrico ou claviforme.

Família Hystrignathidae Travassos & Kloss[7], 1958.

Hystrignathoidea. Fêmeas: Cutícula revestida, ou não, na região esofagiana, de espinhos. Asas laterais presentes. Genitália mono ou didelfa. Vulva situada no terço médio do corpo. Ovos pouco numerosos, elípticos. Complexo esofagiano apresentando corpo, istmo e bulbo posterir bem destacado; bulbo posterior arredondado, com válvulas bem desenvolvidas.

Machos: Cutícula não espinhosa. Não apresentando aparelho espicular, que é substituído por formação quitinizada situada dorsalmente na extremidade distal, de modo a oferecer maior apoio no ato da cópula, na justaposição das aberturas sexuais masculina e feminina.

Subfamília Klossnematinae n. subfam.

Hystrignathidae. Fêmeas: Corpo do esôfago longo, discretamente claviforme. Istmo mais estreito na parte terminal do corpo do esôfago e não se diferenciando de modo nítido com o bulbo posterior, que apresenta válvulas trituradoras. Cutícula inerme. Tubo intestinal retilíneo. Genitália didelfa a anfidelfa; vulva situada no quarto posterior do corpo; ovos pouco numerosos; cauda curta, terminando em gancho.

Machos: Menores que as fêmeas e recurvados no quarto posterior. Complexo esofagiano: Corpo do esôfago com estrangulamento médio, portanto apresentando pré-corpo e metacorpo; istmo mal diferenciado; bulbo posterior com válvulas

trituradoras. Intestino retilíneo. Na extremidade caudal, ânus terminal; na extremidade distal o espessamento dorsal característico dos Hystrignathidae. Presentes duas papilas, uma pré-anal e outra também anterior ao ânus, porém adanal; presentes três ou quatro papilas muito discretas subterminais.

Gênero-tipo: *Klossnema* n. gên.

Gênero: *Klossnema* n. gên.

Gênero único, portanto com os caracteres da subfamília. Espécie-tipo: *Klossnema repentina* n. sp.

Klossnema repentina n. sp.

Espécie-tipo e única do gênero. Com as características já oferecidas para a definição da subfamília. Deve ser assinalada, ainda, a conformação da extremidade proximal do macho; nota-se uma dilatação cuticular bem destacada e encimada por quatro formações papilares; a esta dilatação proximal, segue-se o estoma longo e bem diferenciado do esôfago anterior (corpo).

Média de medidas (em mm) de diversos exemplares *Klossnema repentina* n. gên. n. sp. (17 machos e 25 fêmeas):

Especificação	Fêmea	Macho
Comprimento	1,0	0,08
Largura máxima	0,03	0,021
Corpo do esôfago	0,11 x 0,06	0,050
Istmo	0,024 x 0,016	0,048
Bulbo posterior	0,027 x 0,016	0,019
Vulva	0,65 da extremidade distal	—
Cauda	0,021	—
Espessamento espicular	—	0,012

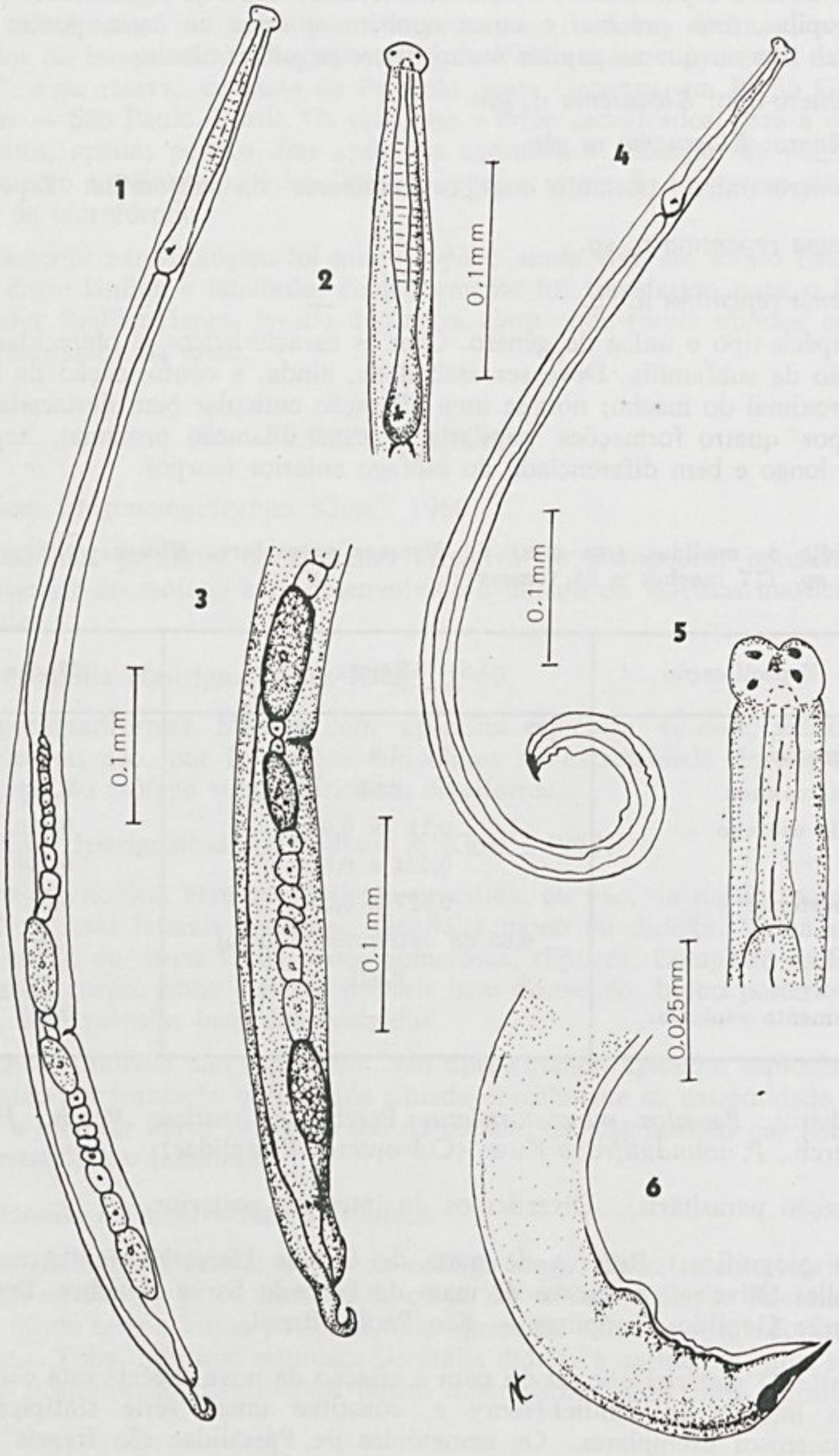
Hospedeiro: *Passalus punctatostriatus* Perch., *P. rusticus* Perch., *P. morio* Perch., *P. inundulifrons* Kuw. (Coleoptera: Passalidae).

Localização parasitária: Divertículos do intestino posterior.

Origem geográfica: Reserva de mata da Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" e reserva de mata da Fazenda Santa Genebra, Distrito de Barão Geraldo, Campinas — São Paulo, Brasil.

Material: O material que serviu para a criação da nova espécie está conservado em líquido de Railliet-Henry e, constitue uma "série sintípica", com numerosos exemplares. Os nematóides de Passalidae são frágeis e a sua inclusão em preparados definitivos (bálsamo do Canadá, p. ex.) não nos parece recomendável. É o motivo porque não selecionamos holótipos macho e fêmea e parátipos.

CORDEIRO, N. S. & ARTIGAS, P. T. Nematóides de Passalidae (Coleoptera). Descrição de *Klossnema repentina* n. gên., n. sp. (Nematoda: Hystrignathidae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:107-111, 1983/84.



PRANCHA — *Klossnema repentina* n. sp.: 1 — Fêmea. 2 — Extremidade anterior da fêmea. 3 — Extremidade posterior da fêmea, face lateral. 4 — Macho. 5 — Extremidade anterior do macho. 6 — Extremidade posterior do macho, face lateral.

CORDEIRO, N. S. & ARTIGAS, P. T. Nematóides de Passalidae (Coleoptera). Descrição de *Klossnema repentina* n. gên., n. sp. (Nematoda: Hystrignathidae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:107-111, 1983/84.

CONCLUSÃO

Obedecendo critérios seguidos por Travassos & Kloss[7] (1958), para a sistemática de Hystrignathidae, cabe, no caso presente, erigir-se a família Klossnematidae. Criou-se a nova subfamília Klossnematinae para a situação do novo gênero *Klossnema*. É, sem dúvida, oportuna a criação desta subfamília, desde que as características anatômicas de *Klossnema* são muito particulares. No caso em tela, trata-se de um nematóide cujas fêmeas fogem completamente e de maneira profunda às características anatômicas dos demais histrignatídeos. A colocação de *K. repentina* n. sp. entre esses nematóides se impõe pela razão de que, em exemplares masculinos, verificou-se que o complexo genital tem as características que serviram de base para a criação da família Hystrignathidae, isto é, ausência de espículo que é substituído por espessamento subcuticular na porção terminal da cauda.

Assinala-se que este nematóide é relativamente freqüente, com vários hospedeiros e, também, deve ser mencionado ter sido encontrado em biótipos diversos, o que não é, em geral, observado com os outros nematóides de passalídeos.

ABSTRACT: A new species *Klossnema repentina* is described from brazilian passalid beetles (Passalidae). It is proposed the creation of a new subfamily, Klossnematinae and of a new genus, *Klossnema*, to situate this new species in the taxonomic system.

KEYWORDS: Passalidae; Nematoda; Hystrignathidae; Klossnematinae n. subfam.; *Klossnema* n. gen.; *K. repentina* n. sp.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Friedrich Bührnheim, da Universidade do Amazonas, pela identificação dos coleópteros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORDEIRO, N. da S. Nematóides intestinais de Passalidae; revisão de sua sistemática e catalogação das espécies conhecidas. São Paulo, Universidade de São Paulo (Tese de Doutorado), 279 p. + 30 Pranchas, 1981.
2. CLARK, W. C. Nematoda (Oxyuroidea: Thelastomatidae) from australian passalid beetles (Coleoptera: Passalidae) with descriptions of new species. *Aust. J. Zool.*, *26*:603-615, 1978.
3. KLOSS, G. R. Organização filogenética dos nematóides parasitos intestinais de artrópodos. (Nota prévia). *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, *4*(4):51-55, 1960.
4. PEREIRA, F. S. & KLOSS, G. R. Observações sobre o intestino posterior de alguns Passalidae (Col.) americanos. *Pap. Avul. Zool. S. Paulo*, *19*(3):43-52, 1966.
5. TRAVASSOS, L. Esboço de uma chave geral dos nematódeos parasitos. *Rev. Vet. Zool. Rio de Janeiro*, *10*(2):59-70, 1920.
6. TRAVASSOS, L. Contribuição preliminar à systemática dos nematódeos dos Arthropodos. *Sup. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, (5):19-25, 1929.
7. TRAVASSOS, L. & KLOSS, G. R. Sobre a fauna de nematódeos dos coleopteros Passalidae da estação biológica de Boraceia. *Arg. Zool. Est. S. Paulo*, *11*: 23-57, 1958.

Recebido para publicação em 24/04/1983 e aceito em 19/07/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:113-120, 1983/84

ESTOMATITE ULCERATIVA INFECCIOSA EM *BOA CONSTRICTOR CONSTRICTOR* MANTIDAS EM CATIVEIRO

Hideyo IIZUKA
Henrique Moisés CANTER
Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA
Hisako Gondo HIGASHI
Raymundo ROLIM ROSA

RESUMO: No presente informe, descreve-se o isolamento de *Proteus mirabilis* e *Streptococcus viridans* de estomatite ulcerativa em coleção de *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro no vivário do Museu do Instituto Butantan, e algumas observações relativas a evolução da doença provocada por essa associação bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE: Estomatite em *Boa constrictor constrictor* causada por *Proteus mirabilis* e *Streptococcus viridans*; Mouth rot; flora bucal de serpentes; serpentes em cativeiro; biotério de serpentes; répteis.

INTRODUÇÃO

Tem sido verificado, por diversos autores que a estomatite ulcerativa infecciosa é uma moléstia relativamente comum entre as serpentes, tanto nas venenígeras, como nas não-venenígeras [3, 5, 6, 11, 14, 17, 22]. Ela ocorre principalmente em animais depauperados, em conseqüência, predominantemente causadas por condições adversas, apresentadas pela vida em cativeiro, a qual muito difere daquelas encontradas em vida livre, visto que as serpentes são animais extremamente sensíveis a vários fatores externos [8, 18].

Em trabalho anterior [6], foi descrito o surto de uma epizootia que acometeu cerca de 70% das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus,* mantidas no biotério de serpentes do Instituto Butantan, provocada por um bacilo difteróide. A infecção caracterizava-se pelo aparecimento de uma massa caseosa, de coloração branco-amarelada, de odor muito pronunciado, que lesava invariavelmente as glândulas venenígeras e que resultava na continência da produção de veneno e na morte de cerca de 25% dos ofídios acometidos.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 65, 05504, São Paulo-SP, Brasil.

IIZUKA, H.; CANTER, H. M.; OLIVEIRA, E. P. T.; HIGASHI, H. G. & ROLIM ROSA, R. Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:113-120, 1983/84.

Recentemente, novo surto de estomatite ulcerativa de caráter infecto-contagioso, até então não descrita, irrompeu entre exemplares da coleção de *Boa constrictor constrictor* mantidos em cativeiro no serpentário do Museu do mesmo Instituto.

A *Boa constrictor constrictor* (L) é uma espécie de serpente que pertence à família dos boideos, onde estão classificados os maiores répteis atuais do mundo, podendo atingir aproximadamente 5 metros de comprimento quando bem desenvolvido [1, 9]. O gênero *Boa* compreende serpentes típicas do Novo Mundo. No Brasil, a sua distribuição geográfica se faz por todo o nosso território, exceto o extremo Sul. É ovovivípara, notívaga, constritora e vive em campos e moitas não muito úmidas, alimenta-se de grande variedade de animais, dando preferência a roedores e aves [1,9].

Devido a falta de dados referentes a "mouth rot" [3, 6, 11, 17, 22] na literatura consultada, relativo a *Boa constrictor constrictor,* procuramos, no presente trabalho, relatar o isolamento do agente etiológico, além de algumas observações relativas à sintomatologia apresentada pelos répteis acometidos pela infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras — as presentes observações foram realizadas em exemplares adultos de *Boa constrictor constrictor,* sem distinção de sexo, procedentes de diversas regiões do território brasileiro, pertencentes a coleção de serpentes do Museu do Instituto Butantan.

As amostras do material foram colhidas de um lote de 7 animais doentes, portadores de estomatite ulcerativa, com auxílio de uma espátula esterilizada, diretamente da cavidade bucal e recolhidas em tubos de ensaio, de acordo com a técnica descrita em trabalho anterior [6]. Em seguida, eram homogeneizados e emulsionados em 5 ml de solução fisiológica estéril, a 0,85% de NaCl, PA, para exame bacterioscópico e da cultura.

Cultura do material — a semeadura era imediatamente feita em volume de 0,1 ml da suspensão do material em meios de cultura básicos [2, 6, 10], caldo glicosado, na concentração final de 1% de glicose, meio de Tarozzi [20], caldo infuso de cérebro e coração de boi — BHI, Difco, e meio de Zeissler modificado [6], os quais, eram incubados em estufa, a temperatura de 37°C, durante um período de 48 horas, e observadas a cada 24 horas. A seguir, as colônias desenvolvidas em meios sólidos eram analisadas e selecionadas quanto aos aspectos morfológico, macroscópico e microscópico. Os esfregaços eram corados pelos métodos de Gram e Wirtz. As colônias isoladas eram pescadas e conservadas em tubos com meio de Lignières, protegidos com camada de óleo mineral.

Para o isolamento e classificação do tipo de estreptococo, a cultura em placas de agar sangue era incubada a 37°C, durante um período de 24 horas e em seguida, em geladeira, por mais 24 horas [2, 10].

A triagem prévia de bactérias aeróbias Gram negativas era realizada em meio de SV (Surraco & Violeta) [2, 10], provido de tubo de Durham invertido [4, 21]. Os exames bacteriológicos eram realizados de acordo com as técnicas padrões para classificação de enterobactérias descrita por Rugai e Araújo [19] e modificações propostas por Toledo e col. [21]. A identificação bioquímica foi confirmada de acordo com as técnicas recomendadas por Edwards & Ewing [4].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade dos répteis depende muito da pecilotermia e, ao contrário dos animais homeotermos, não possuem a propriedade de manter constante a temperatura corporal. Portanto, apresentam alto grau de sensibilidade às variações climáticas, tais como: temperatura, grau de umidade relativa, iluminação, aeração etc., além de outros fatores [18]. O índice de sobrevida destes animais, quando mantidos em cativeiro, depende muito da otimização das variáveis físico-químicas citadas, para que se mantenham em boas condições de saúde. Qualquer desequilíbrio destes fatores essenciais que garantem o seu bem-estar, poderá desencadear situações estressantes que levará à instalação de doenças, ou mesmo a surto de epizootias [3, 6, 17].

No presente estudo, o resultado das provas bacteriológicas e bioquímicas permitiram verificar que no lote de serpentes doentes, a estomatite ulcerativa era provocada por uma infecção bacteriana mista, resultante da associação entre *Proteus mirabilis* e *Streptococcus viridans*.

A moléstia inicia-se com hiperemia da mucosa oral, acompanhada de aumento de sensibilidade dolorosa, motivo pelo qual o ofídio recusa a alimentação. Em condições normais, a *Boa* pode aceitar mais de uma presa — camundongos, ratos ou cobaias — por refeição, que é feita normalmente duas vezes por mês, de acordo com o porte e apetite do animal [8]. Mas, o réptil doente muda completamente seu comportamento, fica mais irritadiço e agressivo. Com a evolução da doença, cessa o movimento ágil da língua, uma das características de serpente saudável. Em seguida, aparece edema na mucosa bucal acompanhada de aumento de secreção, inicialmente fluida, mas, com a progressão da moléstia, torna-se mais viscosa e de aspecto gelatinoso. Esta abundante sialorréia, mais o edema da região oro-faringeana, muitas vezes, acaba obstruindo parcialmente as vias aéreas superiores, e totalmente as narinas, comprometendo a respiração. Nesta fase, o réptil começa a demonstrar dispnéia e a elevar a cabeça, procurando, assim, melhorar as condições de respiração, mantendo-a em posição vertical, apoiando-se na parede do serpentário, imóvel, durante longo espaço de tempo. Esta postura, caracterizada pela elevação do terço anterior do corpo, até formar quase um ângulo de 90° em relação ao solo, foi observada também por Burtscher [3], que embora tenha descrito minuciosamente a evolução da estomatite ulcerativa, inclusive com a distinção de duas formas evolutivas da doença — a aguda e a crônica, não explicou, contudo, a causa deste comportamento abnormal.

Muitas vezes, o edema pode deformar a cabeça da jibóia e, nos casos graves, provocar dispnéia permanente; na fase final das evoluções agudas, antes de o animal sucumbir, manifestam-se crises intermitentes de apnéia, com espasmos e contrações serpejantes generalizadas. Toda esta evolução, até a morte, pode transcorrer num período relativamente curto, de 7 a 10 dias, quando da evolução aguda da moléstia.

Por outro lado, quando a evolução é do tipo crônico, a serpente poderá sobreviver durante dois a três meses e, dependendo do estado nutricional, pode evoluir para a cura completa, ou resultar em morte súbita decorrente da caquexia profunda (Tabela 1).

Na infecção crônica, o animal fica muito fraco, em virtude da incapacidade de se alimentar. Não consegue mais permanecer na posição vertical acima referida. E, a partir da segunda semana, o fluxo das secreções pode diminuir, ou

desaparecer por completo, como soe acontecer, na maioria das vezes, dando lugar ao aparecimento de material de aspecto caseoso, esbranquiçado, que torna abundante, principalmente na mucosa próxima aos dentes, tanto no maxilar superior, como no inferior (Fig. 1), o qual é destacável, sem provocar hemorragia.

Analisando a Tabela 1, pode-se constatar que o índice de mortalidade pela estomatite é superior a 50% do lote, visto que, de 7 animais estudados, quatro tiveram êxito fatal, no período de aproximadamente três meses de observação. E ainda, o número de mortes foi mais elevado quando a doença evoluía sob a forma aguda (3 mortos), em relação a crônica (1 morto). Por outro lado, os répteis que conseguiram vencer estes prazos de sobrevida, recuperaram-se completamente da infecção.

Uma particularidade bastante interessante, observada neste estudo, foi o fato de estomatite ulcerativa infecciosa, além de ser causada por infecção mista, resultante da associação bacteriana entre *Proteus mirabilis* e *Streptococcus* alfa-reativos, ter afinidade específica para com o hospedeiro, pois, apesar de exemplares de *Boa constrictor constrictor* estarem sendo criadas juntamente com serpentes de outras espécies, venenosas e não-venenosas, não houve transmissão da moléstia.

Alguns autores [3, 23] acham que as serpentes, em liberdade, e em condições naturais, não estão sujeitas às inúmeras doenças que sofrem, quando em cativeiro.

Williams e col. [23] observaram que as serpentes recém-capturadas não apresentam flora bacteriana muito numerosa, mas em cativeiro, o número de microrganismos presentes na boca se multiplica acentuadamente. Estes autores [23], estudando a microbiota presente na cavidade oral de serpentes australianas mantidas em cativeiro, conseguiram isolar os microrganismos do gênero *Proteus* em mais de 70% dos animais que sofriam de estomatite cancróide.

Wagner [22], ao estudar casos de estomatite ulcerativa em serpentes norte-americanas, bem como de outras origens, afirma que "mouth rot" é uma doença muito comum entre os répteis. Ele acha que o desequilíbrio de fatores microclimáticos é que contribuem para o surto desta moléstia, isto é, quando as gaiolas não recebem aquecimento suficiente, nem grau de umidade relativa correta. Quanto à evolução da enfermidade, classificou-a também em dois tipos: a aguda, com êxito fatal em alguns dias, a qual ele denominou de estomatite sob forma mucosa, e a crônica, por ele denominada de forma caseosa da estomatite.

Goldstein e col. [7] pesquisaram a flora bacteriana aeróbia e anaeróbia de amostras de venenos de 19 exemplares de *Crotalus* norte-americanas, mantidas em cativeiro, no laboratório, num intervalo de tempo que variava de duas semanas a seis meses. As espécies bacterianas aeróbias mais comumente isoladas eram aquelas pertencentes aos gêneros *Proteus* e *Pseudomonas*.

Butscher [3] estudou 44 casos de "mouth rot" em 13 espécies de serpentes, sendo a maioria européias, tanto venenosas como não-venenosas, e isolou o agente etiológico comum — *Bacillus fluorescens liquefaciens* (Flügge), inclusive de um exemplar de *Boa constrictor constrictor*, de cerca de dois metros de tamanho, procedente do Brasil. E concluiu que este agente é altamente patogênico aos animais pecilotérmicos.

Dessa maneira, podemos verificar que a estomatite infecciosa é uma afecção peculiar aos ofídios, e que pode ser provocada por diversas espécies bacterianas, associadas ou não.

Parrish e col. [16] estudaram a flora bacteriana da boca e da glândula venenífera de 25 serpentes norte-americanas, aparentemente normais. Os germes mais freqüentemente encontrados foram *Proteus vulgaris,* além de outras espécies bacterianas, com predominância de coliformes e difteróides. Isolaram também *Streptococcus,* porém não chegou a classificá-lo. Estes autores afirmam que não há diferença significativa entre a flora bacteriana de serpentes recém-capturadas e a de cativeiro durante algumas semanas.

Em nosso meio, Moreno e col. [13] pesquisaram enterobacteriaceas de 618 exemplares de anfíbios e répteis aparentemente sãos, em sua maioria de material colhido de ofídios do biotério de serpentes do Instituto Butantan. Os resultados obtidos indicam a predominância de espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Proteus,* sendo: 3% de *Proteus mirabilis,* 13% de *Proteus rettgeri,* 14% de *Proteus morgani* e 16% de *Proteus vulgaris,* respectivamente, além de outras espécies bacterianas. Em vista de estes microrganismos não estarem causando manifestações clínicas aparentemente abnormais, concluíram que os animais de sangue frio devem representar um papel muito importante como reservatório primitivo e natural de enterobacteriaceas, na natureza.

Além destes, outros pesquisadores também conseguiram isolar enterobacteriaceas do gênero *Proteus,* da flora bucal de serpentes aparentemente hígidas [7, 12, 15, 16].

E, para finalizar, podemos concluir que quanto às bactérias albergadas na cavidade bucal de répteis, podemos dividi-las em dois grupos: no primeiro, estão aquelas que causam moléstias, portanto de maior interesse sob o ponto de vista clínico e noutro, em meros hospedes normais do réptil, pois, apesar de serem potencialmente patogênicos, não encontram, em condições normais, favorabilidade para a instalação de um processo infeccioso.

TABELA 1

Estomatite ulcerativa infecciosa em lote de 7 exemplares de *Boa constrictor constrictor* mantidas em vivário do Museu do Instituto Butantan

Serpente N.º	Comprimento (Cm)	Tempo de Cativeiro	Evolução da Doença Observação (Dias)
1	305	4a	+ (90)
2	145	2m	+ (18)
3	140	1m	(*)
4	250	6m	(*)
5	160	27d	+ (22)
6	185	15d	+ (10)
7	183	1m	(*)

a = anos m = meses; d = dias; + = morte

(*) Após 90 dias, os animais que sobreviveram, permaneceram sem sintomas.

IIZUKA, H.; CANTER, H. M.; OLIVEIRA, E. P. T.; HIGASHI, H. G. & ROLIM ROSA, R. Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:113-120, 1983/84.

Fig. 1 — Estomatite ulcerativa em *Boa constrictor constrictor*

CONCLUSÕES

1. Exemplares de *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro são passíveis de contrair infecção bucal, causando caquexia e morte;

2. sete exemplares doentes de *Boa constrictor constrictor* apresentaram aos exames bacteriológicos e bioquímicos, flora bacteriana representada por *Proteus mirabilis* e *Streptococcus viridans;*

3. o índice de mortalidade pela estomatite foi superior a 50%, e o número de mortes foi mais elevado quando a moléstia evoluia sob a forma aguda.

INFECTIOUS ULCERATIVE STOMATITIS IN *BOA CONSTRICTOR CONSTRICTOR* MAINTAINED IN CAPTIVITY

ABSTRACT: Isolation of *Proteus mirabilis* and *Streptococcus viridans* from ulcerative stomatitis in *Boa constrictor constrictor* maintained in captivity in the Butantan serpentarium and some observations related to the disease's developement caused by this bacterial association.

KEYWORDS: Stomatitis in *Boa constrictor constrictor* caused by *Proteus mirabilis* and *Streptococcus viridans;* Mouth rot; Oral flora of the snakes; Snakes in captivity; Reptiles.

IIZUKA, H.; CANTER, H. M.; OLIVEIRA, E. P. T.; HIGASHI, H. G. & ROLIM ROSA, R. Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:113-120, 1983/84.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. *Serpentes do Brasil; iconografia colorida.* 2.ª ed., São Paulo, Melhoramentos/Ed. USP, 1978. 248p.

2. BIER, O. G. *Bacteriologia e Imunologia; suas aplicações à Medicina e / Higiene.* 18.ª ed. São Paulo, Melhoramentos, 1977. 1056p.

3. BURTSCHER, J. Mouth rot in snakes. *Bull. Antivenin Institute of America, 5*(3) :59-65, 1932.

4. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. Identification of Enterobacteriaceae. 3.ª ed., Minneapolis, Burgess Publishing, 1972. 360p.

5. FEUER, R. C. Aliments of captive reptiles and amphibians. *Bull. Phila. Herpetol Soc., 15*:43-52, 1957.

6. FURLANETTO, R. S.; BELLUOMINI, H. E.; IIZUKA, H. & ROLIM ROSA, R. Epizootia provocada por um bacilo difteróide em serpentes mantidas em biotério. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), *10*(4) :139-43, 1979.

7. GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M.; GONZALES, H.; RUSSEL, F. E. & FINEGOLD, S. M. Bacteriology of rattlsenake venom and implications for therapy. *J. Infect. Dis., 140*(5) :818-21, 1979.

8. HOGE, A. R. & FEDERSONI, P. A. Manutenção e criação de serpentes em cativeiro. *Rev. Biotério, 1*:63-73, 1981.

9. HOGE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:373-496, 1978/1979.

10. JOKLIK, W. K.; WILLETT, H. P. & AMOS, D. B. *Zinsser microbiologia.* 17.ª ed., Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana, 1983. 1411p.

11. KAUFFELD, C. F. Newer treatment of mouth-rot in snakes. *Herpetologica, 9*:132, 1953.

12. LEDBETTER, E. O. & KUTSCHER, A. E. The aerobic and anaerobic flora of rattlesnake fangs and venom. *Arch. Environm. Hlth, 19*:770-8, 1969.

13. MORENO, G.; LOPES, C. A. M.; BELLUOMINI, H. E.; PESSOA, G. V. A.; BIASI, P. & ANDRADE, J. C. R. Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 15*(3) :122-6, 1973.

14. MURPHY, J. B. A brief outline of suggested treatment for diseases of captive reptiles. Kansas, Society for the Study of Amphibians and Reptiles/ Kansas Herpetological Society, 1975. 13p. (Herpetological Circular, ed. Stephen R. Edwards, 4).

15. PAGE, L. A. Experimental ulcerative stomatitis in King snakes. *Cornell Vet., 51*:258-66, 1960.

16. PARRISH, H. M.; MACLAURIN, A. W. & TUTTLE, R. E. North American pit vipers. Bacterial flora of the mouth and venom glands. *Virginia med. Mth., 83*:383-5, 1956.

17. REICHENBACK-KLINKE, H. & ELKAN, E. *The principal diseases of lower vertebrates.* Academic Press, London/New York, 1965, 600p.

18. ROLIM ROSA, R.; BELLUOMINI, H. E.; SILLES VILLARROEL, M. & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus,* submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:245-51, 1980/81.

19. RUGAI, E. & ARAUJO, A. Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais Gram-negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz, 28*:79-83, 1968.

20. TAROZZI, G. Observasioni sulla natura dei fenomeni che determinaro la esigenza anaerobia nella culture dei germe anaerobia. *Atti Accad. Fisiocr. Siena, 17*:1901-7, 1907.

IIZUKA, H.; CANTER, H. M.; OLIVEIRA, E. P. T.; HIGASHI, H. G. & ROLIM ROSA, R. Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:113-120, 1983/84.

---

21. TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F. & TRABULSI, L. R. EPM — Modificação do meio de Rugai e Araujo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H2S, urease e triptorano desaminase. *Rev. Microbiol.*, (S. Paulo), *13*(4):309-15, 1982.

22. WAGNER, C. E. Mouth rot, a common disease of snakes. *Bull. nat. Hist. Sco.*, Maryland, *5*:20-3, 1934.

23. WILLIAMS, F. E.; FREEMAN, M. & KENNEDY, E. The bacterial flora of the mouths of Australian venomous snakes in captivity. *Med. J. Aust.*, *11*:190-3, 1934.

Recebido para publicação em 25/04/1984 e aceito em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:121-126, 1983/84

RELATO CLíNICO DE ENVENENAMENTO HUMANO POR *PHILODRYAS OLFERSII*

Marcos Vinicius da SILVA *
Marcus Augusto BUONONATO **

RESUMO: Apresenta-se um caso de acidente humano por *Philodryas olfersii*, serpente até agora considerada não causadora de acidentes. Relata-se o estudo semiológico, tratamento e a evolução observada. Compara-se os sinais clínicos registrados com os determinados pelo acidente botrópico.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome: ofidismo, *Philodryas*. Serpente: Colubridae.

INTRODUÇÃO

Os acidentes humanos cujo agente etiológico são serpentes são freqüentes em nosso meio. O Hospital Vital Brazil, do Instituto Butantan, onde atende-se a maioria desses acidentes ocorridos na Grande São Paulo e algumas cidades vizinhas, recebe em média 500 destes casos por ano, dos quais 40% (200 casos) são acidentes por serpentes consideradas não peçonhentas. Entre estas encontramos a serpente opistóglifa, *Philodryas olfersii* (Liechtenstein, 1823), vulgarmente conhecida como Boiubu, Boiubi, Arabóia (2) e Cobra Verde. Pertence à família Colubridae e à subfamília Boiginae. Tem o corpo de cor verde, sendo o ventre mais claro, ligeiramente amarelado. A parte superior da cabeça apresenta um tom castanho-metálico, de onde parte uma linha ocre no dorso, longitudinalmente. Na altura do olho há uma faixa mais escura. É tanto terrestre como dendrícola, habitando vegetação baixa. Mais ativa pela manhã, alimenta-se de pequenos vertebrados, como lagartos, rãs e pássaros (onicarnívora). É ovípara (4 a 10 ovos), reproduzindo-se preferencialmente de setembro a novembro (6). Muito comum no Sul, Centro-Oeste, Nordeste do Brasil e vale amazônico (1). É encontrada desde a Amazônia até a Patagônia. Mede aproximadamente um metro de comprimento. Muito ágil, foge do contato com o homem; agressiva quando acuada ou manuseada, morde com facilidade (fig. 1).

* Médico do Hospital Vital Brazil, Instituto Butantan, São Paulo.
** Biólogo Bolsista da FUNDAP, da Secção de Museu do Instituto Butantan.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerou-se o registro detalhado do acidente causado pela serpente *Philodryas olfersii* na cidade de São Paulo. Mediante investigações realizadas determinou-se os seguintes achados:

1.º) Circunstância em que ocorreu o acidente.

2.º) Tempo transcorrido entre o acidente e o atendimento médico.

3.º) Região anatômica em que ocorreu o acidente.

4.º) Sinais e sintomas apresentados.

5.º) Evolução e resolução do quadro clínico.

No Hospital Vital Brazil, onde a estrutura do Serviço, os recursos humanos, médicos e paramédicos são montados e voltados para os acidentes humanos por animais peçonhentos, atendemos um caso de acidente por *Philodryas olfersii*, que passaremos a relatar:

Relato do caso: paciente masculino, 24 anos de idade, branco, residente na cidade de São Paulo, biologista, conhecendo bem herpetologia, no dia 26 de dezembro de 1983, às 08,45h foi mordido no antebraço esquerdo, por um exemplar adulto de *Philodryas olfersii* enquanto tratava o animal. No momento do acidente sentiu dor pouco intensa e contínua, no local da mordedura, e observou o aparecimento de edema local.

Procurou atendimento médico no Hospital Vital Brazil, do Instituto Butantan, na mesma data do acidente às 09,40h; queixava-se de dor de pequena intensidade no antebraço esquerdo; apresentava-se em bom estado geral, corado, hidratado, normotenso (PA = 120x70 mm. de Hg.), com pulso e freqüência cardíaca de 88 batimentos por minuto e normotérmico (36°C). Na metade proximal, face antero-medial do braço esquerdo, observou-se quatro ferimentos lineares de ± 3 cm, paralelos, equidistantes ± 0,8 cm, recobertos por crostículas hemáticas; edema +1/+4 de todo o antebraço, de consistência aumentada, não depressível, discretamente doloroso à palpação, com aumento da temperatura local; área de equimose circundando o local da mordedura, mais acentuado na região proximal do antebraço (fig. 2). Gânglio axilar esquerdo aumentado de tamanho (± 3 cm), doloroso à palpação, de consistência amolecida, não aderido a planos profundos e sem sinais flogísticos. O paciente permaneceu em observação, e às 13,10h foi reavaliado; os dados vitais estavam mantidos e houve piora do edema (+2/+4), que acometia, além do antebraço esquerdo, o braço e a mão, com as mesmas características anteriormente descritas; acentuou-se a área de equimose e a dor permaneceu muito discreta. Foi realizado tempo de coagulação (3), com resultado normal (coagulável com 6 minutos). O paciente foi medicado com antihistamínico, antiinflamatório não hormonal, analgésico e repouso. Após 28 horas do acidente o edema progrediu, apresentando o dobro do diâmetro normal do braço, antebraço esquerdo, e também da mão, com as mesmas características já referidas (fig. 3). A área de equimose acentuou-se e estendeu-se até a região axilar esquerda, acometendo toda a face medial do braço e antebraço, acima do local da mordedura. No local do acidente e abaixo dele não se evidenciava equimose, apenas edema (fig. 4). O gânglio axilar aumentou de diâmetro (5 cm), tornou-se bastante doloroso e sem sinais flogísticos; houve queixa de piora da dor em todo o membro superior esquerdo e sensação de fraqueza nos membros inferiores. A partir do 4.º dia pós-acidente, começou a ocorrer involução gradativa

do edema, da equimose e do enfartamento ganglionar. No 14.º dia pós-acidente houve involução total da sintomatologia com exceção da fraqueza nos membros inferiores, que persiste.

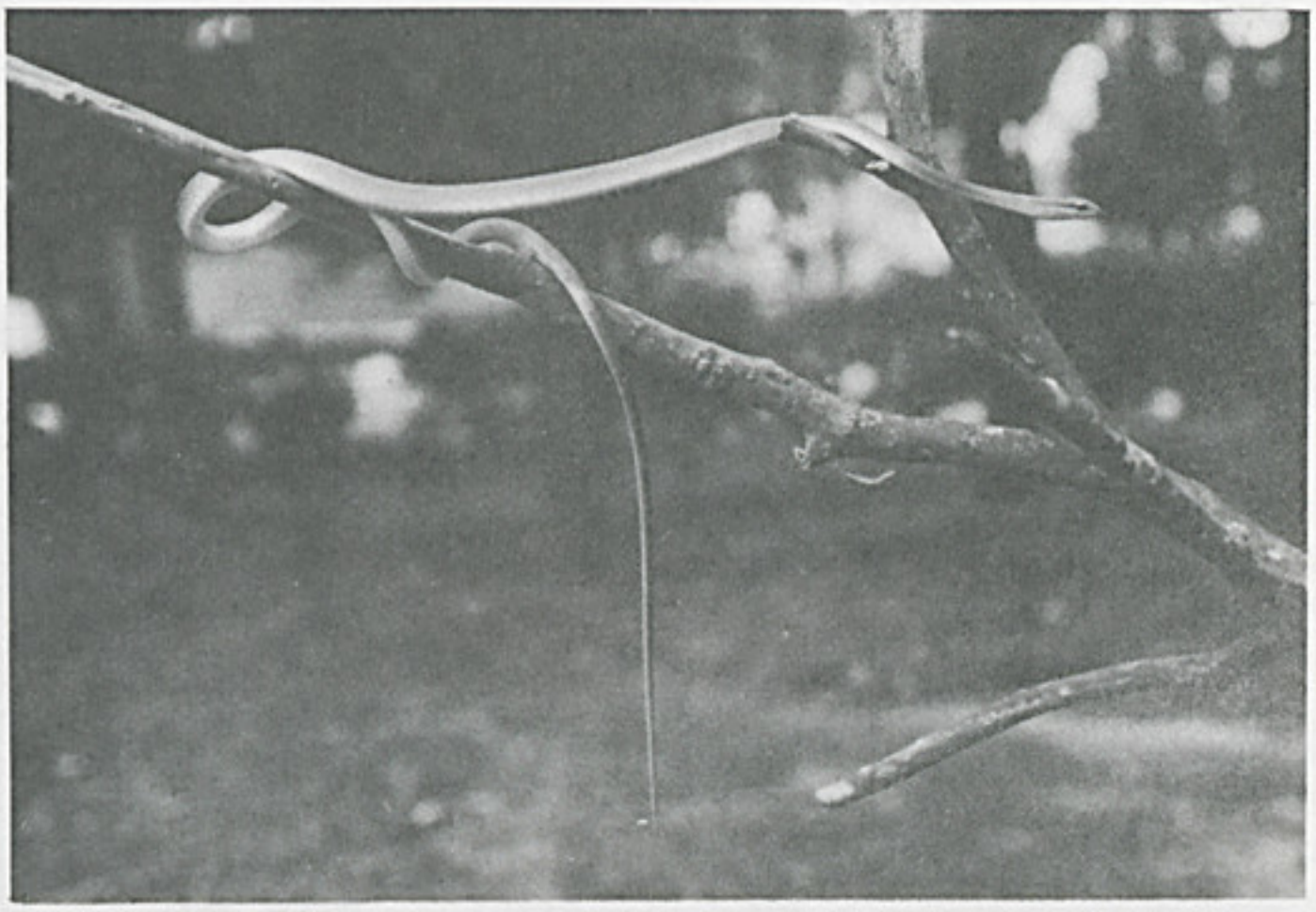


FIGURA N.º 1

Figura 2

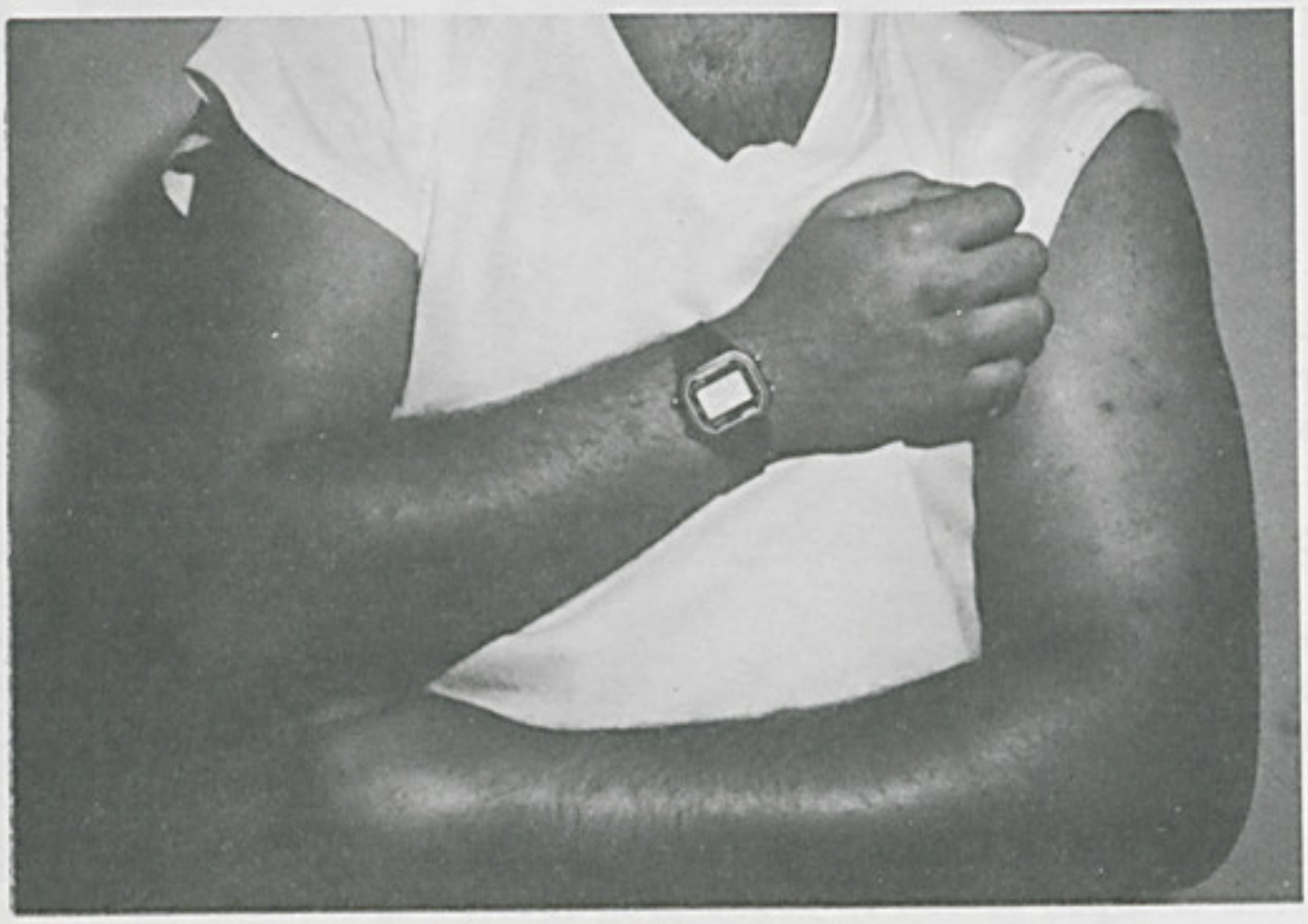


Figura 3

Figura 4

DISCUSSÃO

Até o presente acidente pouca ou nenhuma atenção era dada no nosso meio aos acidentes ofídicos causados por serpentes opistóglifas, que em muitos casos são benígnos, com pouca sintomatologia. Esta atitude decorre da dificuldade que estas serpentes encontram para inocular sua peçonha, pois os dentes responsáveis pela inoculação encontram-se na região posterior da maxila.

Em geral, os acidentes com este tipo de serpente são causados só pelos dentes anteriores, que não têm capacidade de inoculação do veneno; mas quando este é inoculado, o quadro clínico pode assumir proporções alarmantes pela manifestação proteolítica do veneno, bem evidenciável neste caso (4 e 7).

Não foi constatada alteração no tempo de coagulação, fato concordante com os achados "in vitro" por Martins (4), que mostrou a ausência de atividade coagulante do veneno de *Philodryas* sobre sangue de cavalo citratado a 1%.

O aparecimento de lesões equimóticas somente acima do local da mordedura, acometendo todo o terço proximal do antebraço, braço e região axilar esquerda, coincide com o sentido do retorno venoso e da drenagem linfática, o que nos levou a pensar na possível absorção linfática e/ou venosa do veneno para exercer sua ação fisiopatológica. Se esta estivesse na dependência da difusão do veneno entre os tecidos a partir do local da inoculação, encontraríamos lesões equimóticas no local da mordedura e abaixo dela, o que não foi observado. Outro fato importante é o acometimento ganglionar axilar esquerdo, não observado em outros acidentes por serpentes peçonhentas e não peçonhentas, evidenciando o provável acometimento do sistema linfático.

As lesões equimóticas são muito semelhantes às encontradas em acidentes botrópicos, e são atribuídas à ação de hemorraginas.

O que não ficou claro foi a queixa persistente de fraqueza nos membros inferiores, embora Martins (4), tenha mostrado experimentalmente a atividade neurotóxica do veneno de *Philodryas* para a rã *(Leptodactylus occelatus)*.

Por muito tempo esta serpente foi colocada entre as não causadoras de acidentes para o homem, fato com o qual não concordamos, e que vai de encontro ao relato de Nickerson e Henderson (5). Se não tivéssemos certeza da identificação do animal agressor, o quadro clínico dificultaria o diagnóstico pela semelhança encontrada (sinais proteolíticos e equimose) com o acidente botrópico, tão freqüente em nosso meio.

ABSTRACT: A case of human accident following bite of the snake *Philodryas olfersii*, known as a now-poisonous snake, is presented. Clinical study, treatment and evoluation are reported. Registered clinical signs of this accident are compared to those provoked by poisonous snakes of *Bothrops* genus.

KEYWORDS: Syndrome: ophidism, *Philodryas*. Serpente: Colubridae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. Ophidios do Brasil. *Mem. Inst. Butantan*, *10*:87-162, 1935-1936.

IHERING, R. VON. Dicionário dos animais do Brasil, 2.ed., São Paulo, Ed. Universidade de Brasília, 1968.

SILVA, M. V. & BUONONATO, M. A. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:121-126, 1983/84.

LEE, R. I. & WHITE, P. D. A clinical study of the coagulation time of blood. *Amer. J. Med. Sci.*, *145*:495-503, 1913.

MARTINS, N. Das opisthoglyphas brasileiras e o seu veneno. Rio de Janeiro, America, 1916, 111p. (Tese).

NICKERSON, M. A. & HENDERSON, R. W. A case of envenomation by the South American Colubrid, *Philodryas olfersii*. *Herpetológica*, *32*:197-198, 1976.

VANZOLINI, P. E.; RAMOS-COSTA, A. M. M. & VITT, L. J. Répteis das caatingas. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1980.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: COBERTT, C. E. Farmacodinâmica. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p. 1.044-1.074.

Recebido para publicação em 27/04/1984 e aceito em 19/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:127-131, 1983/84

LOXOSCELISMO: RELATO DE UM ACIDENTE HUMANO ATRIBUÍDO A *LOXOSCELES AMAZÔNICA* GERTSCH, 1967 (ARANEAE, SCYTODIDAE, LOXOSCELINAE) (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)*

Sylvia LUCAS *
João Luiz CARDOSO **
Angelina Cirelli MORAES ***

RESUMO: é relatado um acidente humano atribuído a aranha: *Loxosceles amazonica* Gertsch 1967, ocorrido na cidade de Crato, Ceará, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Loxoscelismo. Acidente atribuído *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967. ARANEAE. SCYTODIDAE. LOXOSCELINAE.

INTRODUÇÃO

Em 1967 Gertsch (3) fazendo a revisão das espécies sul-americanas pertencentes ao gênero *Loxosceles* Heinecken e Lowe, 1835, constatou a existência de trinta espécies sul-americanas, citando quatro como causadoras de acidentes: *laeta, gaucho, reclusa* e *rufescens,* não ignorando, porém, a possibilidade de as demais também apresentarem um veneno ativo para o homem.

A primeira referência a acidentes humanos provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* na literatura brasileira é devida a Rosenfeld et al, em 1959 (5).

No Hospital Vital Brazil (HVB) são diagnosticados anualmente cerca de 50 casos, sendo que, na maioria das vezes, o diagnóstico é feito baseado nos aspectos clínicos do envenenamento, pois raramente o paciente traz o animal causador do acidente para identificação. Schenone et al. (6) estudando 133 casos de Loxoscelismo, conseguiram coletar o agente causal em 13 (9,68%) acidentes. Piesco et al. (4), estudando o material do HVB, assinalaram a ocorrência de 241 casos de Loxoscelismo num período de cinco anos (1976-1980), onde o agente causal foi identificado em 13 (5,39%) casos.

No presente trabalho é relatado um caso de lesão cutânea, necrotisante, clinicamente compatível com o diagnóstico de Loxoscelismo. Posteriormente, o

* Divisão de Biologia — Instituto Butantan.
** Hospital Vital Brasil — Instituto Butantan.
*** Estagiária — Divisão de Biologia — Instituto Butantan.

Endereço para correspondência: Cx. Postal, 65, CEP 05504, São Paulo, Brasil.

paciente foi orientado para proceder à captura de aranhas no local do acidente, tendo sido coletadas aranhas do gênero *Loxosceles,* espécie *amazonica,* estabelecendo-se a correlação clínico-etiológica.

MATERIAL E MÉTODO

Foram estudadas quatro fêmeas adultas e três fêmeas e um macho jovens procedentes de Crato, Ceará, Brasil, coletadas por Maria Aldeí Farias, em sua residência, em julho de 1982.

Os receptáculos seminais de duas fêmeas adultas foram montados em lâminas e microfotografados.

RELATO DO ACIDENTE

Em julho de 1982 foi relatado ao Instituto Butantan, pela própria paciente, um acidente em Crato, Ceará, causado por uma aranha pequena de pernas marrons, que havia sido morta no ato da picada. Anexo à descrição foi enviada uma foto da lesão no 15.º dia após o acidente.

Solicitamos que fosse feita uma captura das aranhas encontradas na residência e em três remessas sucessivas recebemos um total de 17 aranhas, 8 das quais pertencentes ao gênero *Loxosceles* e identificadas por nós como pertencentes à espécie *L. amazonica* Gertsch, 1967.

As aranhas deste gênero apresentam hábitos noturnos, vivendo freqüentemente dentro das casas e construindo uma teia branca atrás de móveis, em frestas etc. Picam apenas quando não conseguem fugir e ao serem espremidas contra o corpo da vítima dentro de uma roupa, por exemplo, como no presente caso.

ASPECTOS CLÍNICOS

O acidente em questão é compatível com o diagnóstico de Loxoscelismo provável pelo aspecto clínico da lesão, como mostra a foto (Figs. 1 e 2).

Na nossa experiência no HVB raramente o agente causal tem sido trazido nos acidentes catalogados como Loxoscelismo. O conhecimento prévio das ações fisiopatológicas fundamentais dos venenos animais tem grande importância no diagnóstico clínico dos acidentes por animais peçonhentos, notadamente naqueles provocados por aranhas do gênero *Loxosceles,* cujo veneno tem ação proteolítica e hemolítica, segundo Rosenfeld (5).

O fato de paciente ter capturado no local do acidente aranhas identificadas como *L. amazonica,* permite supor ter sido esta a espécie causadora do acidente.

DISCUSSÃO

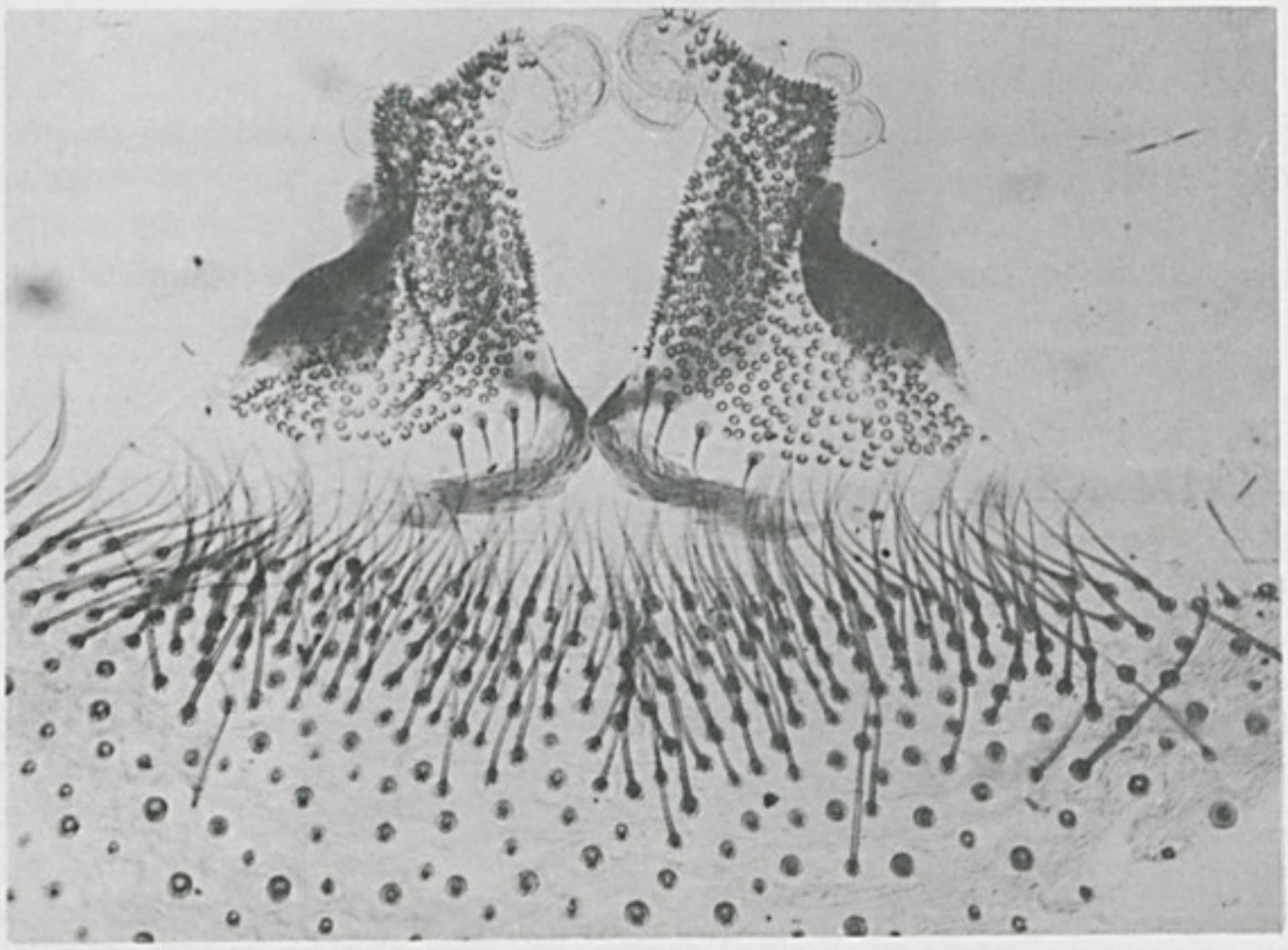
O colorido uniforme, a presença de um desenho claro no cefalotórax, o tamanho do corpo e o comprimento relativo das pernas aproximam a espécie ao grupo *gaucho,* como já haviam observado Gertsh (3) e Brignolli (1). Não tivemos à nossa disposição, para estudo, machos adultos, porém o aspecto dos receptáculos seminais (Figs. 3 e 4) demonstra tratar-se de uma espécie facilmente distinguível das demais. *L. amazonica,* segundo Gertsch, ocorre nos Estados de Mato Grosso, Amazonas e Pernambuco, ficando agora também registrada a sua presença no Ceará.

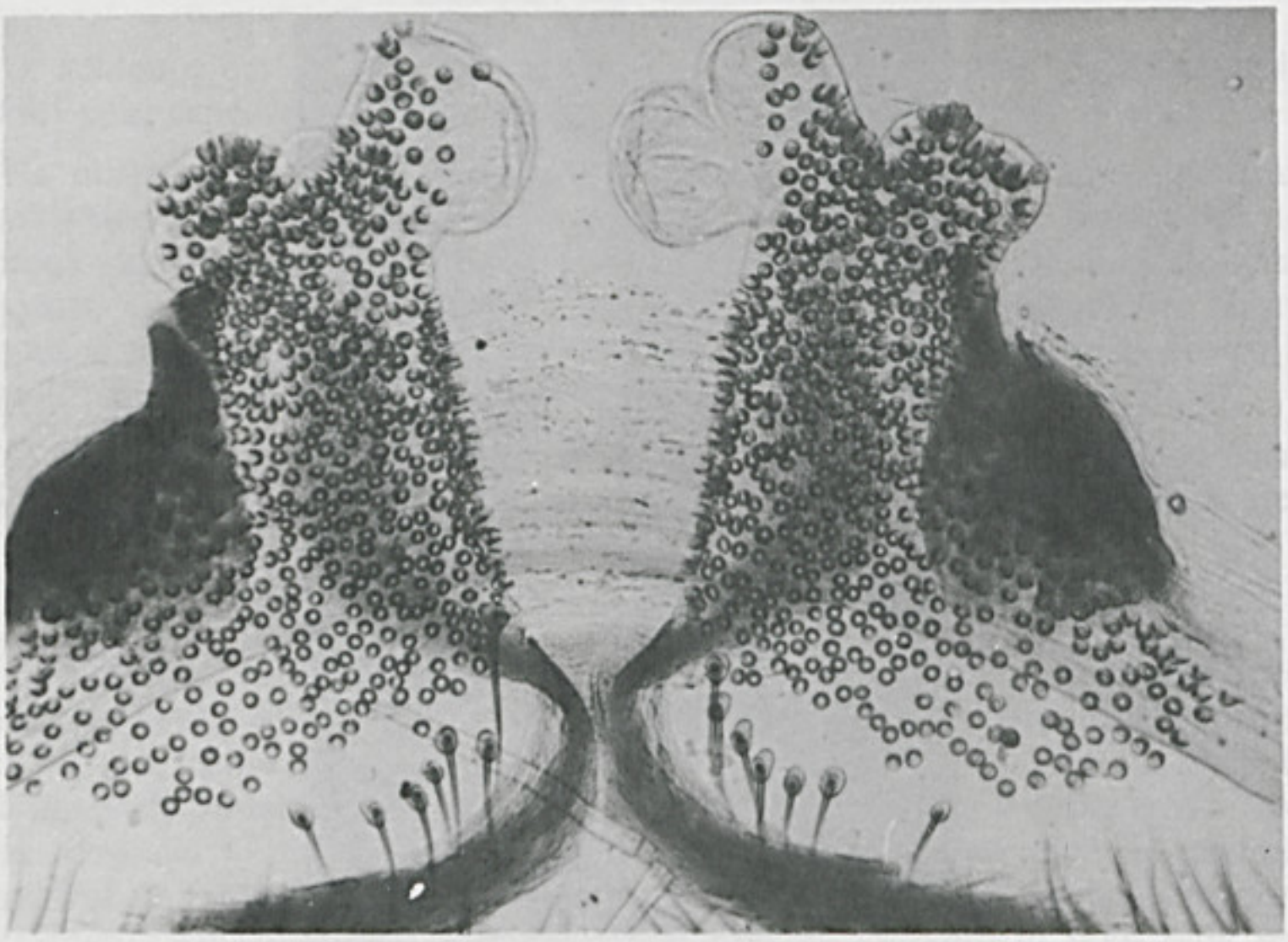
LUCAS, S.; CARDOSO, J. L. & MORAES, A. C. Loxoscelismo: relato de um acidente humano atribuído a *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Scytodidae, Loxoscelinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:127-131, 1983/84.

Fig. 1 — Lesão após 15 dias do acidente.

Fig. 2 — Cicatriz da lesão.

LUCAS, S.; CARDOSO, J. L. & MORAES, A. C. Loxoscelismo: relato de um acidente humano atribuído a *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Scytodidae, Loxoscelinae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:127-131, 1983/84.





Figs. 3 e 4 — Receptáculos seminais.

LUCAS, S.; CARDOSO, J. L. & MORAES, A. C. Loxoscelismo: relato de um acidente humano atribuído a *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Scytodidae, Loxoscelinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:127-131, 1983/84.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Sra. Maria Aldeí Farias a coleta e o envio dos exemplares estudados, bem como as fotos das lesões. Aos Drs. Jesus C. Machado e Geraldo Santiago Hidalgo as fotografias dos receptáculos seminais.

ABSTRACT: A human accident is related, probably caused by a spider: *Loxosceles amazonica* Gertsch, in 1967 at the city of Crato, Ceará, Brazil.

KEYWORDS: Loxoscelism. Probable accident. *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967. ARANEAE. SCYTODIDAE. LOXOSCELINAE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRIGNOLI, P. M. Beitrage zur Kenntnis der SCYTODIDAE (ARANEAE). *Rev. Suisse Zool., 83*(1):125-191, 1976.

FURLANETTO, R. S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscelico.* São Paulo, 1961. Tese Fac. Farmácia e Odontologia USP.

GERTSCH, W. J. The spider genus Loxosceles in South America (ARANEAE, SCYTODIDAE). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 136*(3):117-174, 1967.

PIESCO, R. V.; COSTA CARDOSO, J.; RIBEIRO, A. L.; VON EICKSTEDT, V. R. Loxoscelismo — 241 casos — estudos epidemiológico e clínico. In: *Congresso Brasileiro de Toxicologia, 3,* Belo Horizonte, 1983. Anais. p. 107.

ROSENFELD, G. Moléstias por venenos animais. In: *Pinheiros Terapêutico,* 17(84): 3-15, 1965.

SCHENONE, H. et al. Epidemiologia y curso clinico del loxoscelismo; estudio de 133 casos causados por mordedura de la raña de los rincones *(Loxosceles laeta). Bol. Chile Parasit., 30*:6-17, 1975.

Trabalho apresentado no IX Congresso Brasileiro de Zoologia, XII :11, 1984, realizado em Belém — Pará.

Mem. Inst. Butantan
47/48:133-137, 1983/84

ESCORPIONISMO POR *TITYUS STIGMURUS* NO NORDESTE DO BRASIL (SCORPIONES; BUTHIDAE)*

Vera Regina D. von EICKSTEDT **

RESUMO: O escorpião *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) é identificado pela primeira vez como responsável por acidentes humanos graves no nordeste do Brasil. Informações sobre reconhecimento prático, hábitos e distribuição geográfica são fornecidas. *T. stigmurus* é comparada com espécies morfologicamente afins e demais *Tityus* da região nordeste.

PALAVRAS-CHAVE: *Tityus stigmurus* (Scorpiones, Buthidae): sistemática; escorpionismo; animais peçonhentos.

INTRODUÇÃO

No Brasil, duas espécies de escorpião do gênero *Tityus* (Buthidae) têm sido responsabilizadas por acidentes humanos graves, inclusive casos fatais: *Tityus bahiensis* (Perty), para a qual foi preparado o primeiro soro antiveneno escorpiônico do Brasil e *Tityus serrulatus,* o escorpião mais perigoso da América do Sul em virtude da toxicidade do seu veneno e da tendência que tem de ocasionar surtos de ocorrência. *T. bahiensis* ocorre nas regiões sul e sudeste, ao sul de Mato Grosso e norte da Argenitna; *T. serrulatus* é encontrada na região sudeste, no Paraná, sul de Goiás e na Bahia (margem direita do rio São Francisco). Acidentes escorpiônicos graves no nordeste, fora da área de distribuição geográfica dessas duas espécies têm sido esporadicamente relatados por clínicos e pelos próprios acidentados; o agente causador, entretanto, nunca havia sido identificado.

Em Recife, no período 1980-1983 foram tratados na Unidade de Pediatria Helena Moura, no Hospital da Restauração (Moreno) e no Hospital Agamenon Magalhães, oito acidentes escorpiônicos em crianças de idade variável entre seis meses e sete anos. Em cinco deles as manifestações clínicas foram graves, levando a óbito um dos pacientes, dez horas após a picada. Os escorpiões responsáveis por quatro dos acidentes (três graves e um sem gravidade) foram capturados e, juntamente com outros espécimes coletados na região, remetidos à autora pelas

---

* Resumo apresentado no X Congresso Brasileiro de Zoologia, Sociedade Brasileira de Zoologia, Belo Horizonte, 30 de janeiro a 5 de fevereiro de 1983.

** Pesquisadora Científica, Seção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan, 05504, São Paulo, Brasil.

Dras. Selma V. de Figuerôa e Dayse S. Barbosa. Foram identificados como *Tityus stigmurus* Thorell; levam a crer que também os acidentes cujo agente causador não foi recuperado devam ser atribuíveis a esta espécie, inclusive o caso fatal. Os dados clínicos desses acidentes foram relatados por Figuerôa e Barbosa (1983); segundo essas autoras o soro antiescorpiônico produzido pelo Instituto Butantan foi usado com êxito em três dos acidentes graves, o caso fatal não tendo sido medicado com soroterapia específica em virtude da não disponibilidade no local de atendimento.

Do Centro Antiveneno de Salvador (Bahia) foram recebidos (1982-1983) através da Dra. Tânia Brazil Nunes (Universidade Federal da Bahia) quatro escorpiões, também identificados como *Tityus stigmurus*. Eles provocaram acidentes que exigiram medicação dos pacientes em ambulatórios de Salvador, não existindo, entretanto, nenhum dado clínico disponível a respeito.

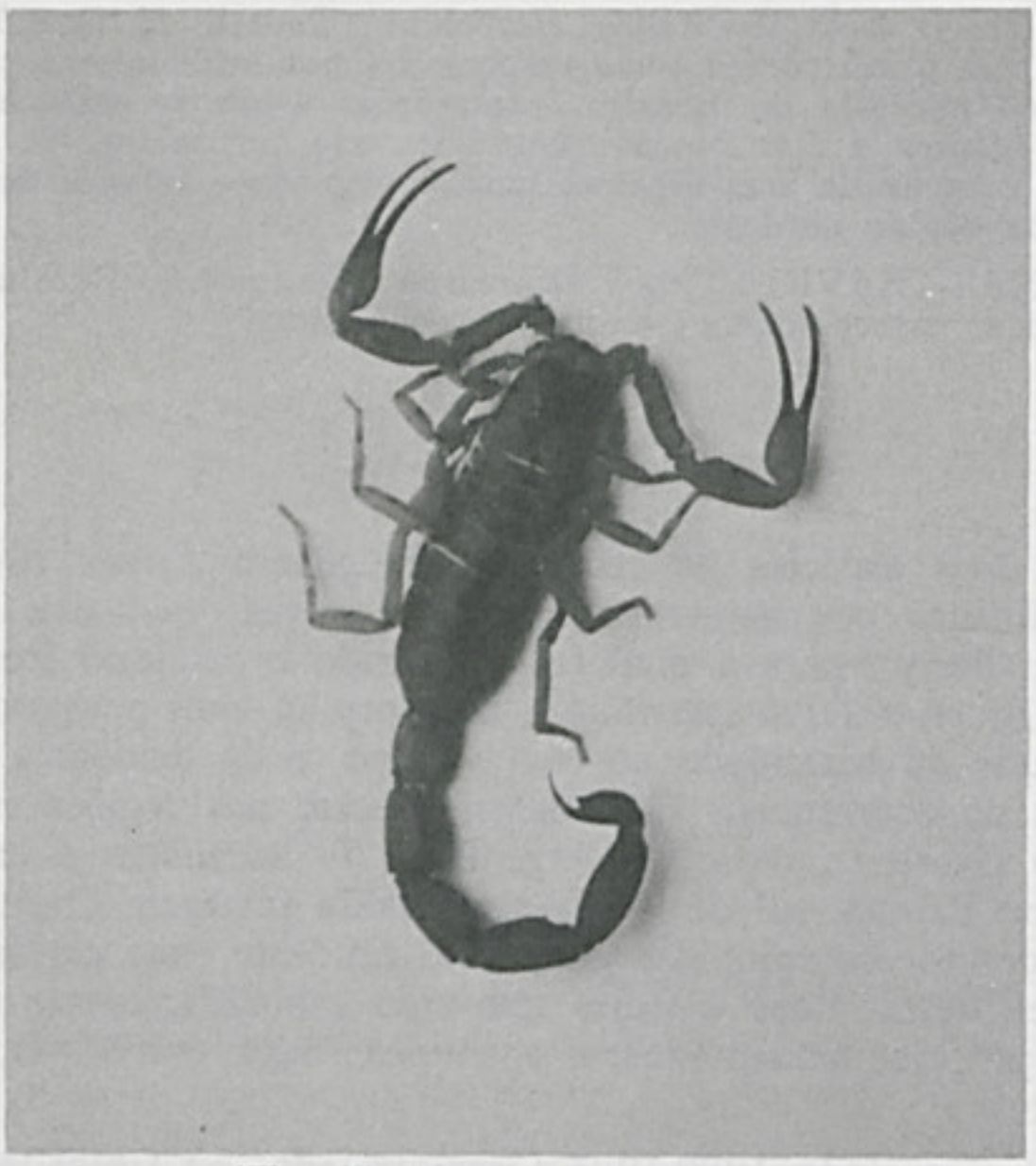


Fig. 1 — *Tityus stigmurus* (Thorell), vista dorsal.

Cardoso (1982) relacionou *stigmurus* entre as espécies de *Tityus* de importância médica no Brasil, baseando-se no fato de ela ser muito comum em Pernambuco e Paraíba, conforme mencionado por Mello-Leitão (1945:401) e Bücherl (1978:373). Nenhuma referência a acidente humano, entretanto, havia sido feita até o momento. A casuística agora documentada, embora pequena, comprova a periculosidade dessa espécie. A necessidade de estudos sobre acidentes por animais peçonhentos nas diferentes regiões brasileiras foi enfatizada por Cardoso (1982:18) tendo em vista que atualmente os "dados disponíveis na literatura (. . .) são provenientes das regiões meridionais do País e não podem *a priori* ser aplicados para o Brasil como um todo". Como contribuição, no

presente trabalho são fornecidas informações sobre o reconhecimento prático, hábitos e área de distribuição geográfica de *Tityus stigmurus* e uma diagnose comparativa com as demais espécies de *Tityus* que ocorrem no nordeste.

Tityus stigmurus (Thorell)

Tityus stigmurus (Thorell, 1877), baseada em um exemplar de Pernambuco, é a espécie representativa do grupo H, criado por Mello-Leitão (1945), que reúne *T. stigmurus, T. serrulatus* Lutz e Mello, 1922, *T. serrulatus vellardi* Mello-Leitão, 1939 e *T. acutidens* Mello-Leitão, 1933 por compartilharem padrão de colorido semelhante (coloração geral amarelada, tronco e face ventral dos artículos terminais da cauda manchados de escuro, palpos e pernas levemente manchados) e apresentarem de um a cinco dentes nas cristas medianas dorsais dos segmentos II a IV da cauda. Embora o agrupamento de espécies proposto por Mello-Leitão não tenha base filogenética ele é útil para a identificação dos *Tityus*, que abrange cerca de cento e trinta espécies e subespécies neotropicais, a maioria mal conhecida. O estado caótico em que se encontra a sistemática desse gênero tem induzido os autores a revisões parciais. Lourenço (1981) reviu o "complexo" *stigmurus,* incluindo *T.s.vellardi* na sinonímia de *T. serrulatus* e descrevendo uma espécie nova, *T. lamottei,* para a Bahia.

A descrição original e as redescrições de *T. stigmurus* permitem a sua identificação. Tendo em vista o propósito deste trabalho, são mencionados apenas os caracteres úteis no reconhecimento prático dessa espécie, selecionados a partir do estudo comparativo dos exemplares disponíveis.

Diagnose — Colorido geral amarelo-palha, prossoma com mancha negra em forma de triângulo invertido (base anterior e vértice no cômoro ocular); tergitos I-VI com uma pequena mancha escura de cada lado e denegridos na zona central, formando uma faixa contrastante longitudinal mediana no mesossoma, mais larga nos tergitos posteriores; mancha do tergito VII restrita à parte anterior; face ventral do quinto segmento da cauda com mancha escura na metade posterior, que se prolonga para diante, alcançando, em certos exemplares, o quarto e mesmo o terceiro artículo caudal (Lourenço, 1981); palpos e pernas sem manchas conspícuas (Fig. 1). Cristas medianas dorsais do quarto segmento da cauda com um ou dois grânulos espiniformes apicais. Nos exemplares estudados, 21-23 dentes pectíneos e 15-16 filas oblíquas de grânulos no gume do dedo móvel do palpo (20-24 dentes e 16-17 filas, segundo Lourenço, 1981). Lâmina intermediária basal da fêmea não dilatada; dedo móvel do palpo do macho sem lobo basilar. Envergadura máxima observada: 70 mm.

Diagnose diferencial — T. stigmurus distingue-se das outras formas do "complexo" e das demais espécies do gênero que ocorrem no nordeste (*pusillus* Pocock, *mattogrossensis* Borelli, *neglectus* Mello-Leitão e *brazilae* Lourenço & Eickstedt) pelo padrão característico do colorido dorsal do tronco (Fig. 1), presente inclusive nas primeiras fases do desenvolvimento pós-embrionário.

Material estudado

BRASIL, *Piauí:* São Raimundo Nonato (Fundação Ruralista), ii.1979, 1 ex. (IB-SC 1124). *Ceará:* Fortaleza (S. Cardoso), viii.1964, 1 ex. (IB-SC 876); Sobral (L. Deane), ii.1954, 1 ex. (IB-SC 654). *Rio Grande do Norte:* Natal (H. C. Gurgel), ii.1983, 2 exs. (s/n.º H. C. Gurgel). *Pernambuco:* Recife (Exp.

Dep. Ecologia, UFPE), ix.1975, 3 exs. (IB-SC 1325, 1326, 1327); (UFPE), v.1982, 2 exs. (IB-SC 1298 e n.º 3 SF & DB), iii.1983, 1 ex., acidente grave (IB-SC 1441), ix.1979, 1 ex. (n.º 6 SF&DB); (UPHM), xi.1981, 1 ex., acidente grave (n.º 2 SF&DB); (HAM), vii.1982, 1 ex., acidente grave (n.º 8 SF&DB); Olinda (UPHM), viii.1982, 1 ex., acidente sem gravidade (n.º 9 SF&DB); Macaparana (UFPE), vii.1982, 1 ex. (n.º 1 SF&DB), vi.1982, 1 ex. (n.º 7 SF&DB). *Sergipe:* Aracaju (sem coletor), xi.1962, 3 exs. (IB-SC 855); (UFSE), viii.1980, 1 ex. (IB-SC 1212). *Bahia:* Raso da Catarina (T. Brazil Nunes), vii.1982, 1 ex. (IB-SC 1330), vii.1983, 2 exs. (IB-SC 1452, 1449), xii.1983, 1 ex. (IB-SC 1477); Salvador (T. Brazil Nunes), viii.1982, 2 exs. (SA-25, SA-27 TBN), 1 ex. (IB-SC 1329), vii.1983, 1 ex. (IB-SC 1443); (CAV), vii.1982, 1 ex. (SA-23 TBN), iv.1983, 3 exs. (SA-95, SA-93, SA-92 TBN); Simões Filho, Camaçari (T. Brazil Nunes), vii.1983, 1 ex. (IB-SC 1481); Barreiras (T. Brazil Nunes), vii.1983, 1 ex. (IB-SC 1482).

Siglas: IB-SC — coleção de escorpiões do Instituto Butantan; UFPE — Universidade Federal de Pernambuco; SF&DB — coleção S. Figuerôa e D. Barbosa; UPHM — Unidade de Pediatria Helena Moura; HAM — Hospital Agamenon Magalhães; UFSE — Universidade Federal de Sergipe; TBN — coleção T. Brazil Nunes; CAV — Centro Antiveneno (Salvador).

Dados de coleta

Em ambiente natural, *T. stigmurus* encontra-se refugiado sob cascas de árvores, em troncos apodrecidos (Reserva Biológica Tapacurá, Pernambuco, segundo Lourenço, 1982) e beiras de barranco (Raso da Catarina, Bahia, informação de T. Brazil Nunes). Nas zonas urbanas domicilia-se com facilidade, tendo sido capturado dentro de casa (em leito, na cozinha (ralo da pia), sob móveis em geral), em telhado e entulho de quintal e jardim. Em Recife foram encontrados exemplares nos bairros Jardim São Paulo, Tamarineira, Beberibe, Centro (Av. Estância), Casa Forte e Córrego Euclides; em Salvador, no bairro de Brotas e em Amaralina.

Distribuição geográfica

T. stigmurus ocorre no nordeste do Brasil. Anteriormente havia sido registrada para Pernambuco (localidade-tipo), Bahia, Paraíba, Sergipe, Ceará e Rio Grande do Norte. Agora é mencionada também para o Piauí. Além das localidades citadas neste trabalho são confiáveis os seguintes registros feitos a essa espécie: *Bahia:* Soledade (Penther, 1913: 239) e Bonfim (Vellard, 1932: 555; Pessôa, 1935: 429); *Pernambuco:* Exu (Lourenço, 1981: 351) e S. Lourenço da Mata, Reserva Biológica Tapacurá (Lourenço, 1982); *Paraíba:* Penha (Werner, 1927: 355) e João Pessoa (Lourenço, 1981: 351). As referências para Goiás e região sudeste (Mello-Campos, 1924: 267; Mello-Leitão, 1932: 30; Vellard, 1932: 553) não são corretas, conforme suposto por Pessôa (1935); devem-se provavelmente a identificação errônea.

A área de distribuição geográfica de *T. stigmurus* sobrepõe-se à de *T. serrulatus* ao norte da Bahia, onde as duas espécies, comprovadamente perigosas; foram coletadas (Salvador, Simões Filho e Raso da Catarina).

EICKSTEDT, V.R.D. von Escorpionismo por *Tityus stigmurus* no nordeste do Brasil (Scorpiones; Buthidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:133-137, 1983/84.

ABSTRACT: *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877), a scorpion from the northeastern region of Brazil, is reported as dangerous to human beings. The habits, geographic distribution and recognition of this species are mentioned as well as a comparative diagnosis with related and sympatric species.

KEYWORDS: *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) systematics; scorpionism; venomous animals.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece às Dras. S. Figuerôa e D. Barbosa (Unidade de Pediatria Helena Moura, Recife) e à Dra. T. Brazil Nunes (Universidade Federal da Bahia) o recebimento dos escorpiões causadores de acidentes, que possibilitaram este trabalho e ao Sr. Júlio Abe a fotografia que o ilustra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÜCHERL, W. Venoms of Tityinae, *In:* Bettini, S., ed., *Arthropod Venoms*, Berlim, Springer Verlag, 1978. p. 371-379.

CARDOSO, J. L. C. & BRANDO, R. B. *Acidentes por Animais Peçonhentos. Clínica e Tratamento*, São Paulo, Livraria Editora Santos, 1982. 24p.

FIGUERÔA, S. V. & BARBOSA, D. V. S. Acidentes por picada de escorpião na infância. Uma experiência clínica, XXIII Congresso Brasileiro de Pediatria, Salvador, setembro 1983, *Resumos*, p. 167, 1983.

LOURENÇO, W. R. Sur la systematique des scorpions appartenant au complexe *Tityus stigmurus* (Theorell, 1877) (Buthidae). *Rev. brasil. Biol., 41*(2):351-362, 1981.

LOURENÇO, W. R. Contribuição ao conhecimento sistemático e biológico de *Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones, Buthidae). *Rev. nordest. Biol., 5*(1):35-43, 1982.

MELLO-CAMPOS, O. Os escorpiões brasileiros. *Mem. Inst. Osw. Cruz, 17*(2): 237-303, 1924.

MELLO-LEITÃO, C. F. Notas sobre escorpiões sul-americanos. *Arq. Mus. nac.*, Rio de Janeiro, *34*:1-46, 1932.

MELLO-LEITÃO, C. F. Revisão do gênero *Tityus*. *Physis, 17*:57-76, 1939.

MELLO-LEITÃO, C. F. Escorpiões sul-americanos. *Arq. Mus. nac.*, Rio de Janeiro, *40*:1-468, 1945.

PENTHER, A. Beitrag zur Kenntnis amerikanischer Skorpione. *Ann. K. K. naturh. Hofmus. Wien, 27*:239-252, 1913.

PESSÔA, S. B. Nota sobre alguns escorpiões do gênero *Tityus* e *Bothriurus*. *An. paul. Med. Cir., 29*(5):429-436, 1935.

THORELL, T. Etudes scorpiologiques. *Atii Soc. ital. Sci. nat., 19*:75-272, 1877.

VELLARD, J. Scorpions, *In: Mission scientifique au Goyas et au Rio Araguaya. Mém. Soc. zool. France, 29*(6):539-556, 1932.

WERNER, F. Ueber einige Skorpione aus Brasilien. *Abh. Senckenb. Naturf. Ges., 40*:355-358, 1927.

Recebido para publicação em 30-04-1984 e aceito em 15-06-1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:139-142, 1983/84

A OCORRÊNCIA DE ÁCIDO URSÓLICO EM *CITHAREXYLUM MYRIANTHUM* (VERBENACEAE)

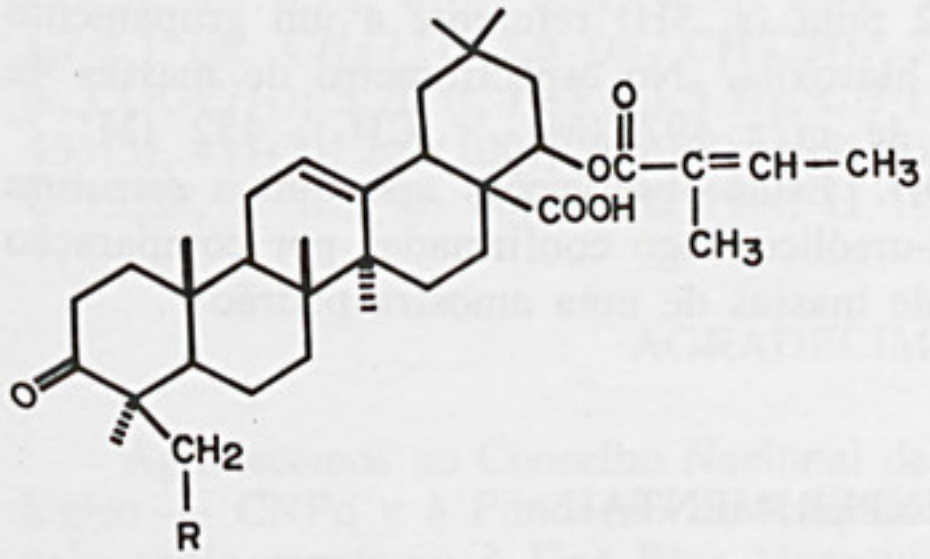
Amabile K. MATIDA *
Ema RABENHORST *
Raymond ZELNIK *

RESUMO: Os extratos acetônicos da periderme e das folhas de *Citharexylum myrianthum* Chamisso L. (Verbenaceae) contêm ácido ursólico e seu derivado 3 β-acetilado.

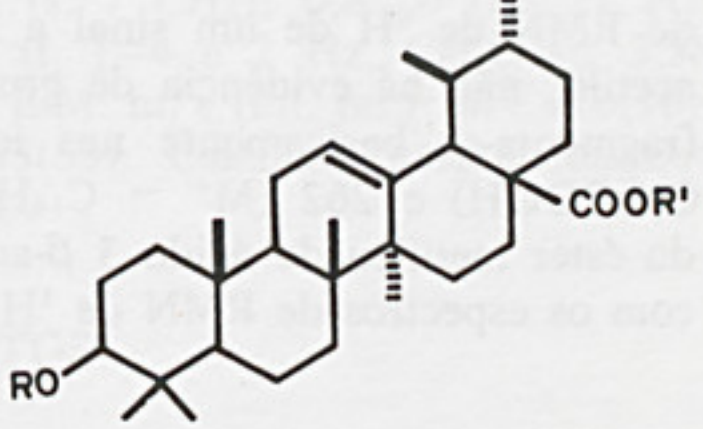
PALAVRAS CHAVE: Verbenaceae; *Citharexylum myrianthum* Chamisso L.; triterpenóides; ácido ursólico; ácido 3 β-acetil-ursólico.

As espécies da família das Verbenaceae, com cerca de 100 gêneros (16 brasileiros) e 2600 espécies, estão espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais [3, 12], sendo que algumas espécies são conhecidas pelas suas propriedades medicinais tais como diuréticas, febrífugas, antiespasmódicas e bactericidas [5, 8, 9, 15].

De *Lantana camara* e de *Lippia rehmanni* foram isoladas, respectivamente, a lantadena 1[18] e a icterogenina 2[2,4]. Estes compostos são tóxicos, causando lesões hepáticas seguidas de fotossensibilização em carneiros.



1 - R = OH
2 - R = H



3 - R = R' = H
3a - R = H, R' = CH_3
4 - R = $COCH_3$, R' = H
4a - R = $COCH_3$, R' = CH_3

* Serviço de Química Orgânica.

MATIDA, A. K.; RABENHORST, E. & ZELNIK, R. A ocorrência de ácido ursólico em *Citharexylum myrianthum* (Verbenaceae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:139-142, 1983/84.

A literatura química descreve vários estudos sobre as Verbenaceae brasileiras: dos gêneros *Lantana* e *Lippia,* foram isolados óleos essenciais [7, 11, 14, 16, 19], em *Duranta repens* foi detectada a presença de esteróiis e alcalóides [17], em *Stacytarpheta australis* foi encontrado o iridoide ipolamiida [1], e em *Lippia sidoides* foram identificados fenóis e cetonas aromáticas [12].

Tendo em vista a ampla distribuição de *Citharexylum myrianthum* (vulgarmente chamada de pimenteira ou pau-de-viola) desde Pernambuco até Rio Grande do Sul, iniciamos o estudo desta espécie visando o isolamento de componentes bioativos. O extrato acetônico da periderme do caule forneceu através de fracionamento em colunas cromatográficas contendo gel de sílica três componentes. Dois foram identificados por análise espectroscópica como sendo o ácido ursólico 3 e seu derivado 3 β-acetilado 4. O terceiro componente está sob investigação.

O produto 3, p.f. 220-240° (MeOH) forma cristais de cor esverdeada e as absorções no Infra-Vermelho a 3400 e 1730 cm^{-1}, sugerem um ácido carboxílico. É solúvel em meio alcalino e precipita por acidificação. A eliminação do pigmento se tornou possível somente após metilação com diazometano seguida de cromatografia em coluna, resultando na obtenção do éster metílico 3a puro, p.f. 107°, de fórmula molecular $C_{31}H_{50}O_3$ (M^+ 470). No espectro de RMN de ^1H pode-se identificar 7 metilas na região de 0,7 a 1,09 ppm, um próton carbinólico a 3,21 ppm (C*H*OH), um grupamento carboximetila a 3,58 ppm e um próton vinílico a 5,24 ppm. No espectrômetro de massas a formação do íon de m/z 262 é típica da dupla ligação C,12-C,13 em triterpenos da classe das α e β-amirinas[6]. Estes dados sugerem para 3a a estrutura do ursolato de metila e esta suposição foi evidenciada pela comparação direta com os espectros de RMN de ^1H e no Infra-Vermelho de uma amostra padrão de ursolato de metila [20].

O produto 4, p.f. 260-270° (MeOH), apresenta-se na forma de cristais esverdeados, de difícil purificação. Como no caso precedente 4 foi metilado, fornecendo o éster metílico 4a, p.f. 235° (acetona). Este derivado possui a fórmula molecular $C_{33}H_{52}O_4$ (M^+ 512) e difere de 3a pela presença no espectro de RMN de ^1H de um sinal a 2,02 ppm (s, 3H) referente a um grupamento acetila; não há evidência de grupo hidroxila. No espectrômetro de massas 4a fragmenta-se basicamente nos íons de m/z 497 ($M^+ - CH_3$), 452 ($M^+ - CH_3COOH$) e 262 ($M^+ - C_{16}H_{26}O_2$). Estas observações apontam a estrutura do éster metílico do ácido 3 β-acetil-ursólico, logo confirmadas por comparação com os espectros de RMN de ^1H e de massas de uma amostra padrão [20].

PARTE EXPERIMENTAL

Os pontos de fusão foram determinados em bloco Kofler-Reichert. Os espectros no IV foram registrados no espectrofotômetro Perkin-Elmer 727 B; os de massas no Hitachi RMU-7MG e os de RMN de ^1H no Jeol PF100 (100 MHz) do Agrupamento de Análises Químicas e Instrumentais do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo. As análises elementares e polarimétricas foram efetuadas no Instituto de Química da USP.

Extração e Isolamento

Os caules de *Citharexylum myrianthum* foram coletados no Horto do Instituto Butantan e a periderme seca à temperatura ambiente. O material (880 g) foi reduzido a pó e refluxado com acetona (3 x 2 l). Os extratos acetônicos foram concentrados à pressão reduzida, produzindo 9 g de resíduc que foram cromatografados em coluna de gel de sílica (Merck 0,05-0,2 mm). As folhas sofreram o mesmo tratamento: 780 g de material seco e moído foram extraídos com acetona (3 x 2,5 l) e o resíduo da concentração (23 g) cromatografado em coluna de gel de sílica.

Ácido 3 β-acetil-ursólico (4)

Os eluatos de benzeno e benzeno-clorofórmio 3:1 forneceram 1,2 g do produto (0,14%; periderme), p.f. 260-270° (MeOH). Este foi metilado com diazometano em solução clorofórmica e o resíduo da concentração cromatografado em coluna de gel de sílica, obtendo-se, do eluato de hexano-benzeno 1:2, o éster 4a (0,9 g), p.f. 235-240° (acetona, lit.[13] 246-7°), $[\alpha]_D^{CHCl3} = +60°$. I.V.(KBr): 1720, 1600, 1240 e 1140 cm^{-1}. RMN de ^1H (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 0,72, 0,80, 0,82, 0,84, 0,93, 1,02, 1,04 (s, 7 CH_3); 0,8-2,0 (m, 21 H); 2,02 (s, OCOCH_3); 1,7-2,1 (m, CH_2-11); 3,58 (s, COOCH_3); 4,46 (dd, J=5 e 2,5 Hz, CH—OAc); 5,24 (t, J=3 e 1,5 Hz, CH—12). E.M. m/z (int. rel.): M^+ 512(9), 452(8), 262(100), 203(53), 189(14), 133(16). Calculado para $C_{33}H_{52}O_4$: C 77,3, H 10,2%; obtido: C 77,4, H 10,4%.

Ácido Ursólico(3)

Os eluatos de benzeno-clorofórmio 1:1 forneceram 0,33 g (0,04%; periderme) do produto de p.f. 220-240° e 9 g (1,1%; folha) de p.f. 214-226°. A metilação (CH_2N_2) e posterior purificação resultou na obtenção do éster metílico 3a (0,175 g, periderme; 5,5 g, folha) p.f. 103-107° (hexano, lit.[20] 105-110°). I.V. (KBr): 3400, 1720, 1600, 1240 e 1140 cm^{-1}. RMN de ^1H (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 0,73, 0,78, 0,91, 0,95, 1,01, 1,12 (s, 7 CH_3); 0,8-2,0 (m, 21 H); 1,7-2,1 (m, CH_2-11); 2,8 (m, CH-OH); 3,21 (t, J=4 e 2 Hz, CH-OH); 3,58 (s, COOCH_3); 5,26 (t, J=3 e 1,5 Hz, CH-12). E.M. m/z (int. rel.): M^+ 470(16), 455(5), 411(7), 262(100), 203(98), 189(33), 133(53). Calculado para $C_{31}H_{50}O_3$: C 79,09, H 10,7%; obtido: C 79,4, H 10,9%.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio contínuo; à Dr.ª Riva Moscovici, do Instituto de Química da USP, pelas análises elementares.

ABSTRACT: The acetone extracts of the bark and leaves of *Citharexylum myrianthum* Chamisso L. (Verbenaceae) contain ursolic acid and its 3 β-acetyl derivative.

KEYWORDS: *Citharexylum myrianthum* Chamisso L.; triterpenoids; ursolic acid; 3 β-acetyl ursolic acid.

MATIDA, A. K.; RABENHORST, E. & ZELNIK, R. A ocorrência de ácido ursólico em *Citharexylum myrianthum* (Verbenaceae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:139-142, 1983/84.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKISUE, G.; ALVARENGA, M. A.; BARROS, D. A. D. & GOTTLIEB, O. R. Presença de ipolamiida em *Stachytarpheta australis* Moldenk. *An. Farm. Quím.* S. Paulo *21*(01):57-60, 1981.
2. ANDERSON, L. A. P.; KOCH, W. T. & ENSLIN, P. R. The constitution of two new physiologically active triperpenoids from *Lippia rehmanni*. *Joernaal van die Suid — Afrikaanse Chemiese Instituut, 14*:58-63, 1961.
3. ANGELY, J. *Flora analítica e fitogeográfica do estado de São Paulo*, S. Paulo, 1.ª Ed. Phyton, 1970. v.4, p. 825-42. L L L L
4. BARTON, D. H. R. & MAIO, P. Triterpenoids part XV. The constitution of icterogenin, a physiologically active triterpenoid. *J. Chem. Soc.*: 887, 1954.
5. BIANCHINI, F. & CORBETTA, F. *Health plants of the world*, New York, Newsweek Books,1977. L L L L L L L L L L L
6. BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M. & DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc., 85*:3688-3699, 1963.
7. CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J.A.; ALENCAR, J. W. & MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de novas espécies de Verbenaceas do nordeste. *Ciên. Cult., 32* (7, supl.): 469, 1980.
8. GANAPATHY, S. & RAO, D. V. Chemical constituents of the leaves of *Citharexylum subserratum. Fitoterapia, 54*(1):13-15, 1983.
9. GONZALES, M. & LOMBARDO, A. Anotaciones de fitoterapia vernacula del Uruguay. *Rev. Farm.* (Buenos Aires), *88*:305, 1946.
10. JOLY, A. B. *Botânica;* introdução à taxonomia vegetal. S. Paulo, Nacional, 1966.
11. LOPES, T. F.; MANCINI, M. A. D. & MANCINI, B. Chromatographic study of essential oils from plants of Araraquara region IV. Thin-layer and vapor-phase chromatographic analysis of essential oil from leaves of *Lantana camara* L., Verbenaceae. *Rev. Fac. Farm. Odontol. Araraquara, 9*(2):199-208, 1975.
12. MACAMBIRA, L. M. A.; ANDRADE, C. H. S. & CRAVEIRO, A. A. Estudo químico de *Lippia sidoides* Cham. *Ciên. Cult., 35*(7, supl.):480, 1983.
13. The MERCK INDEX; An encyclopedia of chemicals and drugs, 8.ª Ed., Rahway, Merck & Co., 1968.
14. MORAIS, A. A.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S. & MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo timol. *An. Acad. bras. Ciênc., 44*(supl.):315-16, 1972.
15. PELLECUER, J.; JACOB. M.; BUOCHBERG, S. M.; DUSART, G.; ATTISSO, M.; BARTHEZ, M.; GOURGAS, L.; PASCAL, B. & TOMEI, R. Tests on the essential oil of mediterranean aromatic plants in conservative odontology. *Plant. Med. Phytother., 14*(2):83-98, 1980.
16. RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R. & ZOGHBI, M. G. B. Óleos esenciais, oleaginosas e látices da Amazônia. 12. Estudo da composição química de algumas espécies da família Verbenacea. *Ciên. Cult., 34*(7, supl.):511, 1982.
17. ROCCA, M. A. Chemical study of berries of *Duranta repens. Rev. Fac. Farm. Odontol. Araraquara, 4*(2):345-6, 1970.
18. SEAWRIGHT, A. A. & HRDLICKA, J. The oral toxicity for sheep of triterpene acids isolated from *Lantana camara. Aust. Vet. J., 53*(5):230-5, 1977.
19. SILVA, M. L.; MAIA, S. J. G.; MOURÃO, J. C.; PEDREIRA, G.; MARX, M. C.; GOTTLIEB, O. R. & MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia VI. *Acta Amazonica, 3*(3):41-2, 1973.
20. ZELNIK, R.; MATIDA, A. K. & PANIZZA, S. Chemistry of the brazilian Labiatae. The occurrence of ursolic acid in *Peltodon radicans* Pohl. *Mem. Ints. Butantan, 42/43*:357-61, 1978/79.

Recebido para publicação em 30/04/1984 e aceito em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:143-155, 1983/84

ECTOPARASITISMO EM SERPENTES: OBSERVAÇÕES GERAIS E ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *IXOBIOIDES* FONSECA, 1934 (ACARINA)

Nélida M. LIZASO *

RESUMO: Expõem-se os dados obtidos do exame de 3.701 serpentes brasileiras das quais 575 estavam parasitadas por ácaros: referências ao habitat das serpentes e sua influência no parasitismo. Analisam-se resultados para o gênero *Ixobioides* Fonseca, 1934, quanto a porcentagem de parasitismo, parasitismo múltiplo, superparasitismo e distribuição geográfica.

PALAVRAS CHAVE: Ácaros: ectoparasitismo em serpentes.

INTRODUÇÃO

O ectoparasitismo por ácaros em serpentes brasileiras vem sendo estudado por nós desde 1976, tanto do ponto de vista sistemático como da especificidade dos ácaros com relação aos hospedeiros, superparasitismo, parasitismo múltiplo e ainda distribuição geográfica.

Fonseca (1934) caracterizou o gênero *Ixobioides* descrevendo *Ixobioides butantanensis,* coletado parasitando *Waglerophis merremii* (Wagler), tendo-o estudado em todas as fases de seu desenvolvimento.

Fain (1961-62), em extenso trabalho sobre ácaros de serpentes, citou alguns exemplares da região Neotropical e alguns deles de ocorrência no Brasil. Trabalhou com material herpetológico de coleções conservadas em álcool, motivo pelo qual desprezou os ácaros encontrados soltos neste líquido, considerando apenas os que estavam aderidos às serpentes ou alojados debaixo das escamas ventrais.

Em 1983 publicamos dados obtidos de material de serpentes coletadas no Estado de São Paulo e a descrição de novos gêneros e espécies de ácaros de serpentes de diversas regiões do Brasil (Lizaso, 1983).

Os dados agora apresentados foram obtidos no período de março de 1976 a abril de 1984.

---

* Seção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan, Caixa Postal 65 — São Paulo — BRASIL.

Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

MATERIAL E MÉTODO

O material herpetológico foi identificado pelos técnicos da Seção de Herpetologia do Instituto Butantan. Consta de 3.701 exemplares pertencentes a 76 espécies distribuídas em 41 gêneros da Família Colubridae e procedem dos seguintes Estados do Brasil: Pará, Rondônia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

As serpentes foram examinadas vivas, logo após a chegada ao laboratório, para evitar possíveis contágios com outros ácaros de especimens mantidos em gaiolas ou serpentários; as que estavam parasitadas foram anestesiadas e em seguida os parasitas removidos um a um com escarificador e colocados em álcool 70%. Para a identificação de algumas espécies de ácaros alguns exemplares foram montados em lâminas e o restante do material mantido na coleção em meio líquido.

Algumas espécies de serpentes, principalmente as que procedem do Norte e Nordeste do Brasil, estão representadas por pequeno número de exemplares enquanto que as da região Sudeste e Sul estão bem representadas em número de exemplares.

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

De um total de 3.701 serpentes examinadas, 575 estavam parasitadas (Tabela 1), o que corresponde a 15,5% de parasitismo.

Comparando este dado global obtido em 8 anos de observações com as porcentagens encontradas anualmente, constatamos que as variações são pequenas quanto ao índice de parasitismo.

No material examinado foram identificadas quatro Famílias de ácaros, sendo 2 parasitas reconhecidamente exclusivas de serpentes: Ixodorhynchidae com os gêneros *Ixobioides* Fonseca, 1934, *Ophiogongylus* Lizaso, 1983 e *Chironobius* Lizaso, 1983 e Ophioptidae com o gênero *Ophioptes* Sambom, 1928; as outras duas Famílias são parasitas em suas formas imaturas: Trombiculidae e Ixodidae. Foi coletado ainda *Heterozercon elegans* Lizaso, 1978, ácaro de vida livre que aparece repetidas vezes sobre as serpentes.

As serpentes podem encontrar-se parasitadas por um único gênero de ácaros ou por dois ou mais gêneros simultaneamente, num parasitismo múltiplo.

Nas serpentes da Família Boidae nota-se fraco grau de parasitismo, representado unicamente pela presença de *Amblyomma* Koch, 1844, que se fixam geralmente na região de união das escamas ventrais com as laterais ou no rebordo da cavidade ocular por terem um hipostómio fortemente cortante; pode-se atribuir a ausência de outras espécies de ácaros ao fato dessas serpentes apresentarem as escamas muito juntas entre si, praticamente sem interstícios de pele nua. Outro fato importante para a ausência de ácaros é que alguns gêneros de Boidae são de vida aquática ou semiaquática. O mesmo ocorre com os Colubrideos do gênero *Liophis*, que são aquáticos, nos quais também não foram achados parasitados.

O habitat das serpentes parece não ter influência em relação às espécies de ácaros pelas quais são parasitadas, já que tanto podem ser encontrados nas serpentes arborícolas como nas terrestres e nas de hábitos noturnos quanto diurnos, exceção feita para as aquáticas ou semiaquáticas.

TABELA 1

Relação das serpentes examinadas e das encontradas parasitadas por ácaros
Relation of the examined snakes and of the ones found parasited by acari

Hospedeiros	E	P	Hospedeiros	E	P
Anilius scytale	1	1	*Liophis brazili*	2	—
Apostolepis assimilis	3	—	*Liophis jaegeri*	3	—
Apostolepis erythronota	1	—	*Liophis miliaris*	123	—
Atractus serranus	1	—	*Liophis undulatus*	7	—
Boa constrictor	144	3	*Liophis viridis*	1	—
Chironius bicarinatus	53	5	*Lygophis flavifrenatus*	3	—
Chironius carinatus	1	1	*Lygophis meridionalis*	7	1
Chironius flavolineatus	23	1	*Lystrophis dorbignyi*	4	—
Chironius foveatus	13	2	*Lystrophis nattereri*	1	—
Chironius laevicolis	2	—	*Mastigodryas bifossatus*	262	14
Chironius quadricarinatus	48	3	*Mastigodryas boddaerti*	1	—
Clelia neglecta	2	—	*Oxybeles aeneus*	3	1
Clelia occipitolutea	14	1	*Oxyrhopus clathractus*	4	—
Clelia plumbia	5	—	*Oxyrhopus petola*	15	—
Dipsas indica	2	—	*Oxyrhopus trigeminus*	242	7
Ditaxon taeniatus	2	—	*Philodryas aestivus*	11	2
Corallus caninus	2	—	*Philodryas mattogrossensis*	1	—
Corallus enydris	1	—	*Philodryas nattereri*	4	1
Dromiluber brazili	2	—	*Philodryas olfersii*	159	31
Drymarchon corais	23	4	*Philodryas patogoniensis*	219	37
Elapomorphus mertensi	3	—	*Phimophis guerini*	4	1
Elapomorphus nasutus	1	—	*Pseudoboa haasi*	2	—
Elapomorphus quinquelineatus	1	—	*Pseudoboa nigra*	5	—
Elapomorphus tricolor	3	1	*Pseudoeryx plicatilis*	1	—
Epicrates cenchria	55	2	*Pseutes sulphureus*	1	1
Erythrolamprus aesculapii	88	30	*Rhachidelus brazili*	7	—
Eunectes murinus	7	—	*Sybinomorphus mikanii*	76	3
Helicops angulatus	2	2	*Simophis rhinostoma*	35	18
Helicops carinicaudus	7	—	*Spilotes pullatus*	53	16
Helicops modestus	39	—	*Thamnodynastes hypoconia*	11	—
Hydrodynastes bicinctus	4	1	*Thamnodynastes pallidus*	55	1
Hydrodynastes gigas	36	1	*Thamnodynastes strigatus*	95	3
Leimadophis almadensis	21	—	*Tomodon dorsatus*	128	8
Leimadophis poecilogyrus	208	22	*Tropidodryas serra*	17	1
Leimadophis reginae	10	1	*Waglerophis merremii*	1.148	313
Leimadophis typhlus	10	5	*Xenodon guentheri*	29	6
Leptoderia annulata	17	1	*Xenodon neuwiedii*	97	21
Leptophis ahaetulla	10	2	*Xenodon severus*	2	1

E: Número de exemplares examinados

P: Número de exemplares parasitados

Analisaremos em continuação os dados de *Ixobioides* Fonseca, 1934 (Ixodorhynchidae) por apresentarem menos especificidade de hospedeiros e distribuição geográfica mais ampla.

O gênero *Ixobioides* Fonseca, 1934 foi descrito parasitando *Waglerophis merremii* (Wagler). São ácaros ovovivíparos, parasitas exclusivos de serpentes em todas as fases de desenvolvimento.

TABELA 2

Distribuição do gênero ixobioides nas serpentes, como parasita exclusivo ou em parasitismo múltiplo com um ou mais gêneros de ácaros

TABLE 2

Distribution of the genus *Ixobioides* in the snakes, exclusive parasite or the multiple parasite

HOSPEDEIROS / PARASITAS	*Ixobioides butantanensis*	*Ixibioides fonsecae*	*Ixobioides brachispinosus*	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae	*Ixobioides butantanensis Amblyomma sp*	*Ixobioides butantanensis Ophioptes parkeri*	*Ixobioides butantanensis Heterozercon elegans*	*Ixobioides brachispinosus Ophiogongylus rotundus*	*Ixobioides brachispinosus* Trombiculidae	*Ixobioides butantanensis Ophioptes parkeri* Trombiculidae	*Ixobioides butantanensis Amblyomma sp* Trombiculidae	*Ixobioides brachispinosus Ophiogongylus rotundus* Trombiculidae	*Ixobioides butantanensis Ophioptes parkeri Amblyomma sp* Trombiculidae	*Ixobioides butantanensis Ophiptes parkeri Heterozercon elegans* Trombiculidae	*Ixobioides brachispinosus Ophiogongylus rotundus Ophioptes parkeri* Trombiculidae	N.º total de serpentes examinadas
Chironius bicarinatus	1		1													53
Chironius flavolineatus				1												23
Chironius quadricarinatus	3															48
Drymarcon corais				1												23
Erythrolamprus aesculapii	1			1						1						88
Helicops angulatus	1															2
Leimadophis almadensis	1															21
Leimadophis poecilogyrus	3			6		1				4						208
Leimadophis reginae	1			1												10
Leptophis typhlus				1												10
Leptopois ahaetulla	1															10
Lygophis meridionalis						2				3						7
Tomodon dorsatus	8			1							1					262
Oxyrhopus trigeminus	1									2						242
Philodryas aestivus										1						11

Philodryas olfersii	19			1	7	1				2							159
Philodryas patagoniensis	26			1													219
Sibinomorphus mikanii	1																76
Simophis rhinostoma				4										1			35
Spilotes pullatus	2			2	2						1		1				53
Thamnodynastes pallidus	3																55
Thamnodynastes strigatus	2		1														95
Tomodon dorsatus	12			2				1									128
Waglerophis merremii	182	1		48	8	2	3		1	1	1						1.148
Xenodon guentheri		5															29
Xenodon neuwiedii		1	3					8				5				1	97
TOTAL PARASITADAS	268	7	5	70	17	6	3	9	1	14	3	5	1	1	1		3.112

LIZASO, N. M. Ectoparasitismo em serpentes: observações gerais e algumas considerações sobre o gênero *Ixobioides* Fonseca, 1934 (Acarina). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:143-155, 1983/84.

TABELA 3

Distribuição Geográfica do Gênero *Ixobioides* Fonseca, parasitando 26 espécies de serpentes partencentes a 17 gêneros da Família Colubridae, em parasitismo único ou múltiplo

TABLE 3

Geografical Distribution of the Genus *Ixobioides* Fonseca, parasiting 26 species of snakes belonging to 17 genus of family Colubridae, in unique or multiple parasitism

n.º total de exemplares	Hospedeiro	n.º exempl. parasitados	Localidade	Parasitas
53	*Chironius bicarinatus* (Wied)	1	Pindorama, SP	*Ixobioides brachispinosus*
		1	Foz do Areia, PR	*Ixobioides butantanensis*
23	*Chironius flavolineatus* (Boettger)	1	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis*
48	*Chironius quadricarinatus* (Boie)	1	Aparecida, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis*
23	*Drymarchon corais* (Boie)	1	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis*
		1	Penápolis, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
88	*Erythrolamprus aesculapii* (Linneaus)	1	Assis, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Rancharia, SP	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* Trombiculidae
		1	Pedro Nolasco, ES	*Ixobioides butantanensis*
2	*Helicops angulatus* (Linneaus)	1	Mirinzal, MA	*Ixobioides butantanensis*
21	*Leimadophis almadensis* (Wagler)	1	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis*
208	*Leimadophis poecilogyrus* (Wied)	8	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* Trombiculidae
		1	Juiz de Fora, MG	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri*
		2	Birigüi, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Nova Odessa, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Campo Grande, MS	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Cassilândia, MS	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
10	*Leimadophis reginae* (Linneaus)	1	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Foz do Iguaçu, PR	*Ixobioides butantanensis*
10	*Leimadophis typhlus* (Linneaus)	1	Capital, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
10	*Leptophis ahaetulla* (Linneaus)	1	Foz do Iguaçu, PR	*Ixobioides butantanensis*

n.º total de exemplares	Hospedeiro	n.º exempl. parasitados	Localidade	Parasitas
7	*Ligophis meridionalis* Schenkel	5	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* Trombiculidae
		1	Birigüi, SP	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri*
262	*Mastigodryas bifossatus* (Raddi)	1	Mirinzal, MA	*Ixobioides butantanensis*
		1	Padre Bernardo, GO	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp Trombiculidae
		1	Iguatemi, MT	*Ixobioides butantanensis*
		1	Três Lagoas, MS	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* *Heterozercon elegans* Trombiculidae
		1	Assis, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Birigüi, SP	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp
		1	Cajuru, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Ribeirão Claro, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	São Miguel Arcanjo, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Santa do Parnaíba, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Tatuí, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Valinhos, SP	*Ixobioides butantanensis*
242	*Oxyrhopus trigeminus* (Duméril, Bibon and Duméril)	1	Brumado, BA	*Ixobioides butantanensis*
		2	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* Trombiculidae
11	*Philodryas aestivus* (Duméril, Bibon and Duméril)	1	Uraí, PR	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* Trombiculidae
159	*Philodryas olfersii* (Lichtenstein)	3	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* Trombiculidae
		1	Assis, SP	*Ixobioides butantanensis*
		17	Birigüi, SP	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* *Amblyomma* sp Trombiculidae
		1	Campinas, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	São Paulo, Capital	*Ixobioides butantanensis*
		1	Taciba, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Foz do Iguaçu, PR	*Ixobioides butantanensis*
219	*Philodryas patagoniensis* (Girard)	1	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Antonio João, MS	*Ixobioides butantanensis*
		1	Assis, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Barueri, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Campos do Jordão, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Garça, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Jundiaí, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Juquitiba, SP	*Ixobioides butantanensis*

n.º total de exemplares	Hospedeiro	n.º exempl. parasitados	Localidade	Parasitas
		1	Lins, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Mairiporã, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Parelheiros, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Paranapanema, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Pirajuí, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	São Carlos, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	São João Novo, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Votuporanga, SP	*Ixobioides butantanensis*
		3	Curitiba, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Engenheiro Marsilac, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Irati, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Palmeira, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Porto Amazonas, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Telêmaco Borba, PR	*Ixobioides butantanensis*
76	*Sibinomorphus mikanii* (Schlegel)	1	Pres. Bernardes, SP	*Ixobioides butantanensis*
35	*Simophis rhinostoma* (Schlegel)	2	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Casa Branca, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
53	*Spilotes pullatus* (Linneaus)	1	Belém, PA	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* *Amblyoma* sp Trombiculidae
		1	Iramaia, BA	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp
		1	Santa Vitória, MG	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Buri, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Juquiá, SP	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp Trombiculidae
		1	Santa Fé do Sul, SP	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp
		1	São Sebastião, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Ponta Grossa, PR	*Ixobioides butantanensis*
55	*Thamnodynastes pallidus* Linneaus	1	Miranda, MS	*Ixobioides butantanensis*
		2	Foz do Areia, PR	*Ixobioides butantanensis*
95	*Thamnodynastes strigatus* (Gunther)	2	Caieiras, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Rio Azul, PR	*Ixobioides brachispinosus*
128	*Tomodon dorsatus* Duméril Bibon and Duméril	1	Gonçalves Júnior, SP	*Ixobioides butantanensis*
		8	Foz do Areia, PR	*Ixobioides butantanensis*
		2	Guajuvira, PR	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Iratí, PR	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Telêmaco Borba, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Canoinhas, SC	*Ixobioides butantanensis*

n.º total de exemplares	Hospedeiro	n.º exempl. parasitados	Localidade	Parasitas
1.148	*Waglerophis merremii* (Wagler)	1	Pesqueira, PE	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		3	Goiânia, GO	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		8	Itumbiara, GO	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* *Amblyomma* sp Trombiculidae
		1	Padre Bernardo, GO	*Ixobioides butantanensis*
		1	Brumado, BA	*Ixobioides butantanensis*
		1	Iramaia, BA	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp
		1	Campo Grande, MT	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	São Bento, MT	*Ixobioides butantanensis*
		1	São Félix do Araguaia, GO	*Ixobioides butantanensis*
		1	Rochedo, MT	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Belo Horizonte, MG	*Ixobioides butantanensis* *Hetrozercon elegans*
		4	Costa Rica, MG	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Iguatemi, MG	*Ixobioides butantanensis*
		1	Pedro Leopoldo, MG	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Três Lagoas, MG	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Tupaciguara, MG	*Ixobioides butantanensis*
		1	Uberlândia, MG	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Xavantina, MG	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Antônio João, MS	*Ixobioides butantanensis*
		13	Paranaíba, MS	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp Trombiculidae
		1	Nioaqui, MS	*Ixobioides butantanensis*
		1	Mendes, RJ	*Ixobioides butantanensis*
		1	Piraí, RJ	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp
		1	Valença, RJ	*Ixobioides butantanensis*
		1	Arujá, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Agudos, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		17	Assis, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		5	Araraquara, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Álvares Machado, SP	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp
		1	Aparecida do Norte, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Araçatuba, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Barueri, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Barretos, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae

n.º total de exemplares	Hospedeiro	n.º exempl. parasitados	Localidade	Parasitas
		6	Bauru, SP	*Ixobioides butantanensis* *Ixobioides brachispinosus* Trombiculidae
		3	Bebedouro, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Birigüi, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Boa Esperança do Sul, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Cotia, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Cafelândia, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Castilho, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Capão Bonito, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Carapicuíba, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Campo Limpo, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Dracena, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Embu, SP	*Ixobioides butantanensis*
		9	Fernandópolis, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Franca, SP	*Ixobioides butantanensis* *Amblyomma* sp
		4	Garça, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Guararema, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Guarulhos, SP	*Ixobioides butantanensis*
		4	Jaú, SP	*Ixobioides butantanensis* *Ophioptes parkeri* Trombiculidae
		1	Jales, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Juquitiba, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Jacareí, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Lavínia, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Martinópolis, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		3	Matão, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Mogi das Cruzes, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Nazaré Paulista, SP	*Ixobioides butantanensis*
		3	Oriente, SP	*Ixobioides butantanensis*
		3	Olímpia, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Osvaldo Cruz, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		2	Orlândia, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Palmital, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Pradópolis, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		4	Penápolis, SP	*Ixobioides butantanensis* *Ixobioides butantanensis*
		1	Paraguaçu Paulista, SP	Trombiculidae
		3	Pindamonhangaba, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Parelheiros, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Pindorama, SP	*Ixobioides butantanensis*
		5	Pres. Prudente, SP	*Ixobioides butantanensis* Trombiculidae
		1	Pres. Bernardes, SP	*Ixobioides butantanensis*

n.º total de exemplares	Hospedeiro	n.º exempl. parasitados	Localidade	Parasitas
		1	Pompéia, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Pres. Venceslau, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Ribeirão Pires, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Ribeirão Preto, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	Rincão, SP	*Ixobioides butantanensis*
				Trombiculidae
		3	São Carlos, SP	*Ixobioides butantanensis*
				Ophioptes parkeri
		1	São José dos Campos, SP	*Ixobioides butantanensis*
		1	São Paulo, Capital	*Ixobioides butantanensis*
		3	Santa Fé do Sul, SP	*Ixobioides butantanensis*
				Trombiculidae
		4	São José do Rio Preto, SP	*Ixobioides butantanensis*
				Trombiculidae
		2	Santo Anastácio, SP	*Ixobioides butantanensis*
				Trombiculidae
		1	Sertãozinho, SP	*Ixobioides butantanensis*
		3	Taboão da Serra, SP	Trombiculidae
				Ixobioides butantanensis
		1	Taubaté, SP	*Ixobioides butantanensis*
				Amblyomma sp
		4	Três Fronteiras, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Valparaíso, SP	*Ixobioides butantanensis*
				Amblyomma sp
		1	Votuporanga, SP	*Ixobioides butantanensis*
		2	Curitiba, PR	*Ixobioides butantanensis*
		5	Londrina, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Morretes, PR	*Ixobioides butantanensis*
		2	Paranavaí, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Paulo Frontin, PR	*Ixobioides butantanensis*
				Trombiculidae
		2	Ponta Grossa, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Porto Amazonas, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	Rio Azul, PR	*Ixobioides butantanensis*
		1	São João do Triunfo	*Ixobioides butantanensis*
		2	São José dos Pinhais	*Ixobioides butantanensis*
		1	Caçador, SC	*Ixobioides fonsecae*
		5	Canoinhas, SC	*Ixobioides butantanensis*
		1	Filipe Schmidt, SC	*Ixobioides butantanensis*
				Trombiculidae
		3	Ibicaré, SC	*Ixobioides butantanensis*
		3	Itaiópolis, SC	*Ixobioides butantanensis*
				Heterozercon elegans
		6	Piratuba, SC	*Ixobioides butantanensis*
		2	Rio Negrinho, SC	*Ixobioides butantanensis*
		3	Tangará da Serra, SC	*Ixobioides butantanensis*
				Heterozercon elegans
		1	Gaurama, RS	*Ixobioides butantanensis*
		1	Porto Alegre, RS	*Ixobioides butantanensis*
29	*Xenodon guentheri* Boulenger	2	Caçador, SC	*Ixobioides fonsecae*
		1	Porto União, SC	*Ixobioides fonsecae*
		1	Cruz Machado, PR	*Ixobioides fonsecae*
		2	Porto Vitória, PR	*Ixobioides fonsecae*

n.º total de exemplares	Hospedeiro	n.º exempl. parasitados	Localidade	Parasitas
97	*Xenodon neuwiedii* (Gunther)	8	Juquitiba, SP	*Ixobioides brachispinosus* *Ophiogongylus rotundus*
		1	Mogi das Cruzes, SP	*Ixobioides brachispinosus* *Ophiogongylus rotundus* Trombiculidae
		1	Ribeirão Pires, SP	*Ixobioides brachispinosus* *Ophiogongylus rotundus*
		2	Santa Isabel, SP	*Ixobioides brachispinosus* *Ophiogongylus rotundus* Trombiculidae
		1	São Paulo, Capital	*Ixobioides brachispinosus* *Ophiogongylus rotundus*
		1	São Roque, SP	*Ixobioides brachispinosus* *Ophiogongylus rotundus* Trombiculidae

O presente material consta de milhares de ácaros coletados parasitando 26 espécies de serpentes pertencentes a 17 gêneros de Colubridae. Esta observação corresponde a 3.092 das serpentes examinadas.

Identificamos três espécies de *Ixobioides: I. butantanensis* Fonseca, 1934 com distribuição geográfica em toda América do Sul, é a mais freqüente e com menor especificidade de hospedeiro; *I. fonsecae* (Fain, 1961) da região Sul do Brasil parasita *Waglerophis merremii* e *Xenodon; I. brachispinosus* Lizaso, 1983 da região Sudeste e Sul do Brasil, parasita *Xenodon, Chironius* e *Thamnodynastes.*

O gênero *Ixobioides* pode ser encontrado como parasita exclusivo de um determinado hospedeiro ou em parasitismo múltiplo com um ou mais gêneros de ácaros. No material por nós estudado o parasitismo simples deu-se em 65,2% dos exemplares (Tabela 2). Pode ser encontrado escasso número de exemplares (3 ou 4) em um hospedeiro ou até alguns milhares — superparasitismo — constatado diversas vezes em *Waglerophis merremii.*

Estes ácaros podem localizar-se na parte inferior da cabeça, cavidade ocular, região periocular, regiões lateral e dorsal do corpo, sendo mais numerosos no terço anterior da serpente, e, aumentando a intensidade do parasitismo, no terço médio e posterior, num gradiente de infestação da região anterior para a posterior Poucas vezes se localizam debaixo das escamas ventrais.

De modo geral estão bem aderidos ao hospedeiro e não se desprendem, mesmo quando a serpente passa pela água.

O gênero *Ixobioides* apresenta ampla distribuição geográfica, especialmente *I. butantanensis.* O material relacionado em um total de 357 lotes está assim distribuído (Tabela 3): Pará, 1; Maranhão, 2; Paraíba, 1; Pernambuco, 1; Bahia, 4; Mato Grosso, 16; Goiás, 37; Minas Gerais, 7; Espírito Santo, 1; Rio de Janeiro, 3; São Paulo, 199; Paraná, 55; Santa Catarina, 27; Rio Grande do Sul, 3.

LIZASO, N. M. Ectoparasitismo em serpentes: observações gerais e algumas considerações sobre o gênero *Ixobioides* Fonseca, 1934 (Acarina). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:143-155, 1983/84.

ABSTRACT: We have examined 3.701 brazilian snakes from which 575 were parasitised by Acari. Data on the snakes habitat and their influence on the parasitism are given. We pointed out the percentage of the parasitism, the multiple parasitism and superparasitism and geografic distribution on the genus *Ixobioides* Fonseca.
KEYWORDS: Acari: snakes ectoparasitism.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAIN, A. Espèces et genres nouveaux dans la famille Ixodorhynchidae Ewing, 1922. *Rev. Zool. Bot. Afri., 64*(1-2):175-182, 1961.

FAIN, A. Les acariens mesostigmatiques ectoparasites des serpents. *Bulln Inst. r. Sci. nat. Belg., 38*(18):1-149, 1962.

FONSECA, F. Der Schlangenparasit *Ixobioides butantanensis*, novi generis, n. sp. (Acarina, Ixodorhynchidae nov. fam.) *Z. Parasitkde, 6*(4):508-527, 1934.

LIZASO, N. M. Levantamento da fauna acarológica ectoparasita de serpentes não venenosas do Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Zool.*, S. Paulo, *1*(3):203-209, 1983.

LIZASO, N. M. Novos gêneros e espécies de ácaros (Mesostigmata, Ixodorhynchidae) ectoparasitas de serpentes. *Rev. Bras. Zool.*, S. Paulo, *1*(3):193-201, 1983.

Recebido para publicação em 14/05/1984 e aceito em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:157-164, 1983/84

BIONOMIA COMPARATIVA DE TRIATOMíNEOS. II — *TRIATOMA BRASILIENSIS* NEIVA, 1911 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)*

Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE**

RESUMO: O ciclo evolutivo completo de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 é estudado em condições de laboratório. Acasalamentos, posturas, duração dos estádios ninfais, vida adulta e número de repastos são analisados e comparados com os de *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835), *Triatoma sordida* (Stal, 1859) e *Triatoma vitticeps* Stal, 1835, trabalhos já publicados desta série, dos quais só agora sai a nota II, por motivos independentes da nossa vontade.

PALAVRAS-CHAVE: *Triatoma brasiliensis* Nevia, 1911: ciclo evolutivo em laboratório.

INTRODUÇÃO

Sendo *T. brasiliensis* uma espécie restrita às zonas semi-áridas do nordeste brasileiro (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e norte de Goiás e Minas Gerais) sua adaptação às condições climáticas em São Paulo foi bastante difícil. Iniciamos a criação desta espécie em 1972, mas os dados obtidos não foram numerosos. Em 1977 reiniciamos uma nova criação e os resultados também não foram satisfatórios. As observações aqui publicadas, embora em pequeno número, não significativas para um estudo estatístico ou para dar uma ampla visão das variações biológicas, permitem mostrar a sua difícil adaptação às condições adversas do seu habitat natural.

A maioria dos trabalhos sobre o seu ciclo de vida em laboratório como os de Brasileiro (1, 2), Costa (3), Ferreira (5), Perondini e al. (11) abordam apenas fases do ciclo de vida desta espécie e em condições laboratoriais controladas (30°C de temperatura e umidade relativa por volta de 70 a 80%). Trabalhos não tão recentes como os de Pinto (12), Dias (4) e Lucena (9) já apresentam o ciclo completo em laboratório. Lucena (9) dá as condições ambientais em que trabalhou (temperatura entre 25,4 e 28,3% e umidade entre 76 e 82%) e Pinto (12) comenta que há variações no ciclo em temperaturas e umidades diferentes.

As nossas observações são feitas no laboratório da Seção de Parasitologia do Instituto Butantan, situada no Horto Oswaldo Cruz, onde as temperaturas

* Bolsista do CNPq
** Seção de Parasitologia do Instituto Butantan.

oscilam durante o ano entre 18 e 26°C, raramente atingindo os 30°C e por vezes alcançando temperaturas abaixo de 10°C. A umidade relativa anual fica entre 50 e 70%.

MATERIAL E MÉTODO

O material foi obtido de descendentes de uma fêmea recebida de Jaguarari, BA (Faz. Caraíbas) por oferecimento de Caraíbas Metais S.A. em 29-09-1972 e pelos descendentes de outra fêmea recebida de São Raimundo Nonato, PI, Maria Aparecida Pereira leg., em 05-01-1977.

As ninfas, em número de 43, descendentes da primeira fêmea, nos dois primeiros estágios evolutivos foram criadas isoladamente em pequenos borréis, passando depois para borréis maiores com ninfas de outras espécies para facilitar a alimentação coletiva. As ninfas descendentes da segunda fêmea, em número de 32, foram, após eclosão, colocadas diretamente nos borréis maiores com ninfas de outras espécies e, outras 28 ninfas desta mesma fêmea, foram criadas num mesmo borrel durante os dois primeiros estádios e somente depois passadas para os de criação.

Além desse material temos mais 20 observações, obtidas pelo acasalamento em laboratório de descendentes do material do Piauí.

A alimentação foi feita em coelho em intervalos de aproximadamente 15 a 20 dias.

Para facilitar a descrição dos estádios, faremos os relatos separadamente de cada lote de observações e no final, reuniremos as conclusões, fazendo-se uma súmula do ciclo evolutivo para a espécie em pauta.

MATERIAL DESCENDENTE DA FÊMEA DA BAHIA

ESTÁDIO I — Das 43 ninfas eclodidas entre 22-10 e 19-12-1972, 32 morreram antes de completar o estádio, com 2 a 78 dias de vida e quase todas sem se alimentar; duas se alimentaram por uma vez, morrendo com 10 e 16 dias e outra por três vezes, morrendo com 78 dias de vida.

As 11 ninfas restantes completaram o estádio I entre 36 e 70 dias, sendo dois espécimens com menos de 40 dias; seis espécimens de 40 aos 47 dias e os três exemplares restantes com 54, 67 e 70 dias. A média foi de 47,91 dias.

A primeira refeição ocorreu entre o 5.° e 41.° dia, predominando entre o 10.° e 20.° dia. Apenas uma ninfa ficou 41 dias sem se alimentar e dois dias depois de fazê-lo, sofreu a ecdise.

O número de refeições oscilou de um a quatro, sendo mais freqüente duas.

O período anual destas observações foi de 22-10-1972 a 27-02-1973.

ESTÁDIO II — Foi completado pelas 11 ninfas entre 22 e 50 dias, sendo quatro observações com menos de 30 dias, 5 observações com 33 a 40 dias e os dois casos restantes com 49 e 50 dias. A média foi de 33,37 dias.

Quanto ao número de refeições, oscilou entre um e três.

As ninfas entraram neste estádio entre 18-12-1972 e 27-02-1973 e saíram dela entre 18-01 e 03-04-1973, predominando os meses de janeiro e fevereiro.

ESTÁDIO III — Este estádio durou de 29 a 104 dias, sendo que até o 51.º dia, nove ninfas já o haviam realizado. Os dois últimos casos duraram de 90 a 104 dias, prolongando-se mais para o meio do ano, com isto, abrangendo períodos de temperaturas mais frias. A média foi de 51,82 dias.

O número de repastos foi de dois a sete (este para a ninfa de estádio mais prolongado). O período anual foi de 18-01 a 03-04-1973 para a entrada no estádio e 03-03 a 16-07-1973 para a saída.

ESTÁDIO IV — Apenas uma ninfa não completou este estádio, morrendo com 55 dias neste estádio e 167 dias de vida total, após 5 alimentações deficientes. Os exemplares que o completaram, o realizaram com 37 a 211 dias, sendo 5 com menos de 71 dias e os 5 restantes com 109, 141, 143 e 211 dias, passando parte dele no inverno ou em temperaturas baixas, que durante o ano de 1973, iniciaram em fins de maio perdurando até outubro, havendo ligeira elevação em novembro, embora com noites muito frias. A média de duração deste estádio foi de 70,5 dias.

O número de repastos foi de dois a treze.

As 10 ninfas entraram neste estádio entre 03-03 e 16-07-1973, saindo dele entre 09-04 e 18-12-1973.

ESTÁDIO V — Este estádio foi bastante crítico para as ninfas, sendo que, das 10, apenas quatro atingiram a fase adulta. Uma morreu por acidente durante a ecdise, ficando bastante defeituosa e sendo sacrificada no mesmo dia; outra, com 12 dias nesta fase, sem fazer nenhum repasto e os outros quatro casos com 131, 144, 148 e 462 dias neste estádio, alimentando-se 17, 14, 8 e 52 vezes respectivamente. Todas elas, notadamente o último caso citado não conseguiam se alimentar suficientemente, não alcançando uma completa replecção, morrendo bastante depauperadas.

As quatro restantes completaram o estádio V com 61, 86, 118 e 154 dias, alimentando-se 4, 7, 9 e 14 vezes respectivamente. A média foi de 104,75 dias.

O período anual foi para a entrada no estádio 19-04 a 20-06-1973 e a saída foi 15-08 a 05-11-1973.

VIDA NINFAL — O desenvolvimento ninfal completo do desalagamento até a fase adulta nos quatro exemplares obtidos foi de 245, 278, 280 e 336 dias. A média foi de 284,75 dias.

VIDA ADULTA — Os quatro exemplares adultos, todos fêmeas, viveram neste estádio 30, 366, 411 e 503 dias, portanto executando o primeiro dado, vemos que os 3 outros viveram de um a um ano e meio aproximadamente. A média foi 327,5 dias.

O número de repastos foi de dois a trinta e nove.

VIDA TOTAL — A vida total (vida ninfal mais a vida adulta) dessas fêmeas foi de 310, 644, 656 e 839 dias, e a média ficou nos 609,25 dias.

ACASALAMENTO — Em virtude de termos apenas fêmeas, não pudemos realizar acasalamento intra-específicos, mas observamos que as fêmeas de *T. brasiliensis* cruzam-se facilmente com machos de outras espécies. Esses acasalmentos foram obtidos por acaso, em virtude das criações conjuntas com as demais espécies. Obtivemos, assim, dois acasalamentos com descendentes:

1) Num frasco onde havia uma fêmea de *T. brasiliensis* com 158 dias de vida adulta e que já havia oviposto 39 óvulos, coabitou com um macho de *T. lenti* com apenas um dia de vida, em 25-01-1974. Dessa data até 13-02, a fêmea ovipôs 8 óvulos ou ovos que não eclodiram. De 13-02 até 01-08-1974, a fêmea ovipôs 148 ovos que eclodiram em períodos de 29 a 60 dias, dando, ao todo 118 ninfas híbridas. Até a morte da fêmea em 05-10-1974, o casal permaneceu no mesmo frasco.

2) Num frasco onde havia uma fêmea de *T. brasiliensis* com 189 dias de vida adulta e que já havia oviposto 24 óvulos (no período de 20-10-1973 a 13-02-1974), uma ninfa de *T. lenti* se transformou em macho a 21-02-1974. Em 9 e 12 de março, a fêmea ovipôs mais quatro ovos que não eclodiram. De 23-03 a 09-07-1974 ela produziu 32 ovos, eclodindo destes, 18 ninfas. O casal permaneceu junto até a morte da fêmea em 16-09-1974.

Com a fêmea de vida adulta curta (30 dias) não tentamos nenhum acasalamento e ela, também, não elaborou óvulos. Com a fêmea de vida adulta mais longa (503 dias) fizemos várias tentativas de acasalamentos com machos de *T. lenti* mas não obtivemos descendentes apesar dela ovipor 254 ovos não viáveis ou óvulos.

MATERIAL DESCENDENTE DA FÊMEA DO PIAUÍ

ESTÁDIO I — Das 32 ninfas eclodidas entre 20-03 e 07-04-1977, 23 não completaram o estádio, morrendo com 5 a 73 dias de vida, recusando a alimentarem-se, embora lhes fosse oferecido a orelha de coelho. As 9 ninfas restantes tiveram um estádio I de 177 a 256 dias, com a média de 211,13 dias.

O número de repastos foi de 3 a 7. Fez três refeições, além da ninfa de estádio mais curto (177 dias), mais uma ninfa de estádio de 207 dias. A ninfa com 7 repastos, completou o estádio em 199 dias e a ninfa de estádio mais longo (256 dias) fez apenas 4 refeições.

A primeira refeição ocorreu entre o 20.º e o 54.º dia e foi de 18 dias o maior intervalo entre as refeições, embora tivessem tido oportunidade de se alimentarem em intervalos menores.

As ninfas entraram neste estádio em 20-03 a 07-04-1977 e passaram ao estádio II entre 24-09 e 10-12-1977, predominando o mês de outubro.

ESTÁDIO II — Das nove ninfas que entraram neste estádio entre 24-09 e 10-12-1977, uma não o completou, morrendo com 99 dias tendo feito um único repasto. Esta ninfa já havia apresentado dificuldades de se alimentar durante o estádio anterior que foi de 197 dias e com 6 repastos, alguns deficientes.

As ninfas restantes tiveram um estádio entre 49 e 175 dias, sendo a média de 84,14 dias.

O número de repastos foi de dois a cinco.

O período anual em que predominou este estádio foi de outubro a dezembro de 1977.

ESTÁDIO III — Apenas sete ninfas completaram este estádio entre 58 e 319 dias, com a média de 126,86 dias. A morte ocorrida foi de uma ninfa com 52 dias neste estádio e sem fazer nenhum repasto.

O número de repastos foi de dois a cinco.

O período anual foi de 04-12-1977 a 03-06-1978 para a entrada e 12-03 a 28-11-1978 para a saída do estádio, predominando ninfas neste estádio, nos três primeiros meses de 1978.

ESTÁDIO IV — Ocorreram mais duas mortes neste estádio: ninfas com 113 e 135 dias de vida e 4 repastos. As 5 ninfas restantes tiveram um estádio IV com durações de 65 a 335 dias, com média de 211,4 dias.

O número de repastos foi de três a oito.

As ninfas entraram neste estádio de 12-03 a 28-11-1978 e saíram entre 11-11-1978 e 30-10-1979.

ESTÁDIO V — Apenas duas ninfas chegaram a completar este estádio, com 404 e 525 dias e 2 a 16 refeições. A média ficou em 464,5 dias.

Os óbitos ocorreram: um por acidente durante a ecdise, ao entrar neste estádio; uma ninfa morreu com 222 dias, fazendo 6 refeições deficientes, outra ninfa morreu com 558 dias neste estádio, fazendo 11 refeições no período, sendo algumas deficientes.

As ninfas que completaram o estádio fizeram 7 e 13 repastos.

O período anual foi: 11-11-1978 a 30-10-1979 para a entrada e 04-05 a 07-12-1980 para a saída.

VIDA NINFAL — Apenas duas ninfas completaram a vida ninfal com 1.136 e 1.348 dias, dando a média de 1.242 dias.

ADULTOS — Os dois exemplares adultos obtidos foram um macho e uma fêmea. O macho teve uma vida adulta de 105 dias (04-05 a 15-08-1980) fazendo apenas dois repastos. A fêmea teve vida adulta de 548 dias (07-12-1980 a 08-06-1982), fazendo 16 repastos.

VIDA TOTAL — Os dois exemplares tiveram uma vida total (da eclosão à morte do adulto) de 1.241 e 1.896 dias, dando uma média de 1.568,5 dias (4 anos e 3 meses aproximadamente).

ACASALAMENTOS — Não foram tentados acasalamentos.

As 28 ninfas restantes deste lote foram criadas em conjunto no mesmo frasco durante os dois primeiros estádios, portanto não foram anotados os períodos evolutivos. A partir do terceiro estádio só restavam 21 ninfas, as demais haviam morrido.

ESTÁDIO III — Destas 21 ninfas, 4 morreram durante o estádio com 33 a 122 dias. As restantes tiveram este estádio com durações de 60 a 612 dias, dando a média de 166,87 dias.

O número de repastos foi de dois a quatorze.

Não houve um período anual definido para esta amostragem, pois houve observações desde 04-06-1978 até 02-12-1979 para o início do estádio e 12-12-1978 a 22-11-1980 para o término.

ESTÁDIO IV — Ocorreram dois óbitos no decorrer deste estádio com ninfas com 14 a 108 dias neste estádio. As 15 ninfas restantes tiveram um estádio com durações de 64 a 371 dias e com média de 231,27 dias. O número de repastos foi de dois a oito.

ESTÁDIO V — Como nas amostragens anteriores este estádio foi bastante crítico. Houve nove mortes dos 61 aos 717 dias de vida neste estádio. As cinco ninfas restantes tiveram um estádio V entre 154 e 443 dias, dando uma média de 297,5 dias.

VIDA NINFAL — Como iniciamos as observações deste lote somente a partir do estádio III, não pudemos computar a duração da vida ninfal nem da vida total.

ADULTOS — Obtivemos um macho (176 dias) e quatro fêmeas (com 74, 178, 551 e 626 dias de duração). As alimentações foram em número de duas a dezesseis.

ACASALAMENTOS — A fêmea que viveu apenas 74 dias não foi acasalada e com 51 dias de vida adulta iniciou a postura de óvulos (total sete).

A fêmea que viveu 178 dias não foi acasalada nem ovipôs. A fêmea de maior vida adulta (626 dias) não foi acasalada mas elaborou quatro óvulos entre 413 e 425 dias de vida adulta. A fêmea com 551 dias de vida adulta foi acasalada com 178 dias de vida adulta com um macho sem registro, retirado da criação geral. Ela produziu 34 ovos dos quais eclodiram 20 ninfas que foram criadas em laboratório.

MATERIAL RESULTANTE DO ACASALAMENTO ANTERIOR

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO — As 20 ninfas ovipostas entre 20-02 e 31-03-1981 tiveram um desenvolvimento entre 32 e 68 dias com uma média de 40,4 dias.

ESTÁDIO I — Das 20 ninfas desalagadas, 15 morreram com 26 a 274 dias de vida e a maioria sem se alimentar; as que se alimentaram fizeram de um a dois repastos deficientes. Apenas a ninfa que viveu 274 dias fez 6 repastos deficientes.

As 5 restantes tiveram um estádio entre 140 a 237 dias com a média de 200,6 dias. O número de refeições foi de três a quatro.

Essas ninfas passaram, neste estádio, a época predominantemente fria do ano, principalmente os meses de junho e julho e que no ano de 1981 atingiram temperaturas bem baixas.

ESTÁDIO II — Das 5 ninfas, apenas duas completaram o estádio com 105 e 118 dias e com média de 111,5 dias. Os óbitos ocorreram com 83 a 300 dias neste estádio.

ESTÁDIO III — Mais um óbito aos 316 dias de vida neste estádio e a única ninfa sobrevivente fez um estádio de 45 dias e apenas um repasto.

ESTÁDIO IV — O único exemplar teve este estádio com 307 dias e fez 5 repastos.

ESTÁDIO V — A ninfa não o completou, morrendo com 151 dias de vida neste estádio.

RESUMINDO OS DADOS OBTIDOS TEMOS:

Desenvolvimento embrionário: 32 a 68 dias, com média de 40,4 dias.
Duração do Estádio I — 36 a 256 dias, com média de 134,13 dias.

Duração do Estádio II — 22 a 175 dias, com média de 59,15 dias.

Duração do Estádio III — 29 a 612 dias, com média de 114,88 dias.

Duração do Estádio IV — 37 a 371 dias, com média de 188,35 dias.

Duração do Estádio V — 61 a 525, com média de 257,64 dias.

Duração da Vida Ninfal — 245 a 1.348 dias, com média de 603,83 dias.

Duração da Fase Adulta — 30 a 626 dias, com média para as fêmeas de 365,11 dias e para os machos de 140,5 dias.

Duração da Vida Total — 310 a 1896, com média de 930,83 dias.

CONCLUSÕES

T. brasiliensis mostrou ser uma espécie muito adaptada a certas condições de temperatura e umidade, inexistentes nos Estados sulinos do Brasil, o que a delimita muito, existindo apenas na Região nordeste. Sua criação, em laboratório; requer controles de temperatura e umidade, fato que está fora dos propósitos da nossa pesquisa que é estudar o comportamento dos diversos triatomíneos ao mesmo ambiente, Pinto (12) nos dá para o ciclo evolutivo completo, aproximadamente 290 dias, Dias (4) da entre 333 e 392 dias e Lucena (9) 399,61 dias para a fase ninfal e 417,92 para vida total, valores muito abaixo dos encontrados por nós.

Outro fato que nos chamou a atenção foi a alta mortalidade observada nos estádio I e V, fato que ocorreu com todas as criações realizadas.

Comparando-se com os dados obtidos por Heitzmann-Fontenelle [6], [7], [8], temos para o desenvolvimento ninfal: *Panstrongylus megistus* — 352,7 dias; *Triatoma sordida* — 460,12 dias; *Triatoma vitticeps* — 466,89 dias e para *Triatoma brasilienses* — 603,83 dias, portanto, esta espécie teve a maior duração entre as das espécies já estudadas, além de apresentar um alto índice de mortalidade. Para a duração da fase adulta, o máximo obtido para *Panstrongylus megistus* foi de 370 dias; para *Triatoma sordida* foi de 955 dias; para *Triatoma vitticeps* foi de 807 dias e para *Triatoma brasiliensis* foi de 626 dias.

ABSTRACT: The complete evolutive cycle of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 is here studied in laboratory conditions and compared with those of *Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida* and *Triatoma vitticeps*.

KEYWORDS: *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: Evolutive cycle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASILEIRO, V.L.F. Biologia do *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): Tempo de sução e repleção de ninfas de 4.º e 5.º estádio. *Rev. Bras. Ent.*, *18*:43-50 figs, 1974.

2. BRASILEIRO, V.L.F. Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). I Influências da cópula e da longevidade. *Rev. Bras. Biol.*, *42*(1):1-13, 9 figs, 1980.

3. COSTA, M.J. Estudo do jejum em *Triatoma brasiliensis*. Memórias de Mestrado. Dep. Biol. Inst. Biociências da USP.

4. DIAS,E. Notas sobre o tempo de evolução de algumas espécies de triatomíneos em laboratório. *Rev. Bras. Biol., 15*(2):157-158, 1972.

5. FERREIRA, V.L. Relação entre quantidade de sangue ingerido e muda em 5.º estádio de *T. brasiliensis*. *Mem. de* Mestrado Dep. Biol. Inst. Biociências USP, 1972.

6. HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de Triatomíneos I — *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) Hemiptera, Reduviidae). *Studia Ent.*, (19):201-210, 1976.

7. HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de Triatomíneos. III — *Triatoma sordida* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). *Studia Ent., 20*(1-4):89-98, 1978.

8. HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de Triatomíneos. IV — *Triatoma sordida* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). *Studia Ent., 20*(1-4): 1980.

9. LUCENA, D.T. Evolução do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, no laboratório. *Rev. Bras. Biol., 20*(3):295-302, 1960.

10. NEIVA, A. Contribuição ao estudo dos hematófagos brasileiros e descrição de nova espécie de *Triatoma*. *Brasil Med., 25*:461-462, 1911.

11. PERONDINI, A.L.P.; Costa, M.J. & BRASILEIRO, V.L.F. Biologia de *Triatoma brasiliensis* II. Observação sobre a ontogenia. *Rev. Saúde Publ.* S. Paulo, *9*(3):363-370, 4 figs e 24 refs, 1975.

12. PINTO, C. Biologia de *Triatoma brasiliensis* Neiva, *Sci. Med., 2*(10):541, 1924.

Recebido e aceito para publicação em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:165-174, 1983/84

BIONOMIA COMPARATIVA DE TRIATOMíNEOS. V — *TRIATOMA LENTI* SCHERLOCK & SERAFIM, 1967 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)*

Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE**

RESUMO: O ciclo evolutivo de *Triatoma lenti* é estudado em condições de laboratório e comparado com as demais espécies já estudadas nas mesmas condições.

PALAVRA-CHAVE: *Triatoma lenti*: ciclo evolutivo em laboratório.

INTRODUÇÃO

Dando continuidade à série de estudos bionômicos de triatomíneos prováveis vectores da Moléstia de Chagas, apresentamos as conclusões obtidas da criação, em laboratório, de *Triatoma lenti* Scherlock & Serafim, 1967.

Sendo espécie autóctone da Bahia, sua climatização às condições mais úmidas e frias do laboratório da Seção de Parasitologia, localizada no Horto Oswaldo Cruz do Instituto Butantan, São Paulo, apresentou problemas, mas a sua adaptação foi mais fácil do que a da espécie *brasiliensis* restrita às zonas tropicais do Nordeste brasileiro.

MATERIAL E MÉTODO

Em janeiro de 1972, a Seção de Parasitologia recebeu, por intermédio do Dr. A. B. Galvão, um lote rotulado como *T. pessoai,* posteriormente corrigido para *T. lenti,* sinonímia estabelecida em 1979 por Lent & Wigodzinsky (5) provenientes de uma criação existente no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia de Goiânia, GO, a partir de material somente com indicação da Bahia.

Desse lote, surgiram os primeiros adultos em dezembro de 1972, dentre os quais isolamos, em janeiro de 1973, uma fêmea, supostamente fecundada, que elaborou 44 ovos entre 12 de janeiro e 3 de fevereiro, formando a primeira amostragem de observações. Aproximadamente um ano após, isolamos 68 ovos

* Trabalho efetuado com auxílio do CNPq.

** Seção de Parasitologia do Instituto Butantan.

de três fêmeas descendentes da primeira amostragem e acasaladas em laboratório, perfazendo um total de 112 observações.

Como estamos fazendo um estudo comparativo com as demais espécies em observação, o método de criação seguiu os mesmos detalhes dos trabalhos anteriores, apenas que a alimentação em coelho, comumente feita quinzenalmente, passou a ser feita mais amiúde — 2 vezes por semana — porque alguns exemplares desta espécie apresentaram problemas para se alimentar, fazendo várias tentativas para introduzir o rostro na pele do coelho e mudando de posição várias vezes durante o repasto. Geralmente, quando as ninfas apresentavam essa deficiência, pereciam antes de completar o ciclo de desenvolvimento.

Para uma melhor visão dos problemas que acompanharam a criação em laboratório dessa espécie, fora do seu ambiente habitual, vamos analisar separadamente as observações em duas amostragens: a primeira formada pelos 44 ovos iniciais e a segunda pelos 68 ovos descendentes da amostragem anterior, portanto vamos analisar o comportamento de exemplares recém-chegados a um clima frio e úmido e outro com mais tempo de convívio nesse ambiente.

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Amostragem I — Dos 44 ovos ovipostos entre 13-01 e 03-02-1973, dois não eclodiram e os demais eclodiram entre 29 e 35 dias, dando uma média de 32,55 dias.

Amostragem II — Neste lote houve oviposições em quase todos os meses do ano: 3 ovos de 15 a 31-03-74 com desenvolvimento entre 40 a 49 dias, com a média de 43,67 dias; 9 ovos de 02 a 27-04-74 com desenvolvimento de 42 a 51 dias e média de 46,56 dias; dois ovos de 11-05-74 com 42 dias de desenvolvimento; dois ovos de 01 a 30-06-74 com desenvolvimento de 38 a 51 dias e média de 44,05 dias; 20 ovos de 01 a 31-07-74 com desenvolvimento de 42 a 64 dias e média de 53 dias; 5 ovos de 07 a 26-09-74 com desenvolvimento de 56 a 60 dias e média de 58 dias; 3 ovos de 13 a 28-10-74 com desenvolvimento de 42 a 48 dias e média de 45,33 dias; 3 ovos de 15 a 19-11-74 com desenvolvimento de 42 a 44 dias com média de 43 dias; 2 ovos de 10 a 27-12-74 com desenvolvimento de 37 a 40 dias e média de 38,5 dias e, finalmente, 1 ovo de 17-01-75 com desenvolvimento de 34 dias.

ESTÁDIO I

Amostragem I — Das 42 ninfas, apenas uma não completou o estádio, morrendo após 49 dias, sem se alimentar, embora tentasse em todas as ocasiões que lhe foi oferecido o alimento. As demais levaram de 25 (duas observações) a 80 dias para completar o estádio, havendo predominância entre 41 a 60 dias (25 casos) correspondendo a 60,98% da amostragem. A média foi de 45,8 dias.

O período anual predominante foi fevereiro e março de 1973

Quanto ao número de refeições, como dissemos no início, foi maior nesta criação, mas quatro ninfas completaram o estádio com apenas uma refeição. Foram ninfas de estádio I curto (31, 32, 39 e 40 dias). Duas ninfas com o estádio mais curto (25 dias) tiveram dois e três repastos, sendo que o terceiro

repasto desse exemplar não foi satisfatório, alimentando-se muito pouco. A ninfa de estádio I mais longo (80 dias) fez também o maior número de repastos — sete, sendo que alguns deles não foram satisfatórios.

A primeira refeição ocorreu do 5.º ao 25.º dia de vida, embora se tenha observado duas ninfas tentando fazê-lo no 2.º dia de vida, mas ambas pouco se alimentaram. Até o 10.º dia, 43,9% da amostragem já havia feito a primeira refeição e 87,8% da amostragem fez o primeiro repasto antes do 20.º dia de vida.

Amostragem II — Das 68 ninfas, 18 não completaram o estádio: uma morrendo um dia após a eclosão; em 5 casos a morte ocorreu com menos de 20 dias de vida (duas com dois repastos e três sem se alimentar); em 4 casos a morte ocorreu entre 21 e 40 dias (todos após algumas tentativas de repastos, mas sem se alimentarem direito); em 7 casos a morte ocorreu de 41 aos 60 dias (uma com um repasto, três com 2 repastos e três com 3 repastos), e, finalmente houve duas mortes com 72 e 94 dias de vida respectivamente. A primeira, após três repastos, presa ao fundo do frasco nas fezes ainda úmidas, e a outra após 5 tentativas de repastos.

As demais ninfas completaram o estádio entre 45 e 172 dias, predominando 51 a 70 dias (23 observações) dando 46% da amostragem. A média foi de 80,68 dias.

O menor número de refeições foi dois, observado em 4 ninfas com estádio de 47 (duas observações), 55 e 66 dias. A ninfa de estádio mais curto (45 dias) fez 5 refeições e a de estádio mais longo (172 dias) fez 10. O maior número de repastos foi 11, referente a duas ninfas de 110 e 171 dias, sendo que esta última ninfa, após o segundo repasto, não mais se alimentou em condições suficientes.

Na amostragem II, praticamente tivemos ninfas no estádio I durante o ano todo, mas houve uma maior incidência nos meses de julho a outubro de 1974.

ESTÁDIO II

Amostragem I — Das 41 ninfas deste lote, cinco não completaram o estádio: uma morrendo com 16 dias e sem se alimentar. Esta ninfa já havia apresentado problemas de deficiência na alimentação durante o estádio anterior, embora tenha tido um estádio I curto (46 dias) com três refeições. O segundo óbito foi de uma ninfa, após 25 dias da ecdise e uma refeição (o estádio I foi de 49 dias e com duas refeições sem problemas). As outras mortes foram com 52, 68 e 72 dias de vida neste estádio e com 4, 5 e 4 refeições respectivamente. Destas três ninfas, apenas a que viveu 68 dias apresentou problemas de alimentação.

Nas demais ninfas, o estádio II variou de 21 a 334 dias, sendo predominante o intervalo de 31 a 50 dias (19 observações) dando uma percentagem de 52,78% da amostragem. A média foi de 67,39 dias.

O número de refeições neste estádio variou entre 1 e 32, predominando duas a cinco. Três ninfas fizeram apenas uma refeição com estádio II de 21 (o estádio mais curto), 31 e 25 dias. Três ninfas tiveram um número exagerado de refeições: uma ninfa com estádio II de 186 dias fez 12 refeições; uma ninfa de estádio II de 288 dias fez 23 repastos muito deficientes e a ninfa de estádio II mais longo (334 dias) fez 32 repastos, o que não é muito para o longo prazo deste estádio.

Amostragem II — Das 50 ninfas deste lote, nove não completaram o estádio: 2 ninfas sofreram acidente durante a ecdise II, ficando presas às exúvias, fato que nos obrigou a sacrificá-las; outra ninfa morreu poucos dias após a ecdise sem se alimentar; as demais mortes ocorreram com 47 dias e três refeições deficientes; com 86 dias e 6 refeições deficientes; com 112, 117 e 126 dias e 9 refeições (2 das ninfas com deficiência) e uma com 258 dias e 12 refeições deficientes

As ninfas restantes tiveram um estádio entre 34 e 266 dias, predominando 51 a 100 dias. A média foi de 102, 32 dias.

Quanto ao número de alimentações foi de 2 a 18, predominando 3 a 7 refeições. Duas ninfas fizeram dois repastos: uma com estádio II de 34 dias (estádio mais curto) e outra com estádio de 43 dias. Apenas três ninfas fizeram mais de 10 refeições: uma com 171 dias e 12 refeições (deficientes), outra com 190 dias e 13 refeições e a ninfa de estádio mais longo (266 dias) com 18 refeições (deficientes). Neste estádio observamos um caso de hematofagismo sobre outro parceiro de frasco: uma ninfa após 79 dias neste estádio e de ter feito seis repastos em coelho, aproveitou a ecdise de uma ninfa de *T. vitticeps*, parceira de frasco, para sugá-la.

ESTÁDIO III

Amostragem I — Das 36 ninfas que entraram neste estádio, sete não o completaram: duas sofreram acidentes durante a ecdise, ao entrar neste estádio; uma com seis dias e sem repastos; três com 71, 73 e 75 dias e com respectivamente 6, 8 e 3 repastos, sendo que a ninfa de 75 dias fez três repastos deficientes. Uma ninfa morreu com 134 dias e após 13 repastos.

As 29 ninfas restantes tiveram um estádio de 46 a 237 dias, predominando o intervalo de 81 a 120 dias. A média foi de 114,31 dias.

O número de refeições foi de dois a vinte, predominando de dois a dez. Duas ninfas efetuaram dois repastos e tiveram estádios curtos de 66 e 71 dias. A ninfa que fez 20 repastos teve um estádio de 237 dias (registro mais longo para o estádio). A ninfa de estádio mais curto (46 dias) fez três repastos.

O período anual predominante foi de maio a setembro de 1973.

Amostragem II — Das 41 ninfas que entraram neste estádio, seis não o completaram: duas logo após a ecdise, por acidente durante a muda — uma delas já havia apresentado problemas na alimentação durante o estádio anterior que teve uma duração de 171 dias (um dos mais longos), quando fez 18 repastos, sendo o primeiro e o último deficientes. Outra ninfa, também por problemas durante a ecdise, só viveu 16 dias e sem repastos. Dos três óbitos restantes: um foi aos 114 dias e após 4 repastos, outra com 146 dias e 7 tentativas de repastos e finalmente uma ninfa com 214 dias e 10 repastos, alguns deficientes.

As demais ninfas, em número de 34, tiveram um estádio com 45 a 343 dias, com a média de 147,24 dias.

O número de repastos variou de três a vinte e cinco, predominando de três a dez. Três ninfas fizeram três repastos e tiveram estádios de 45 dias (o mais curto) e duas com 65 dias. A ninfa com 25 repastos, sendo dois deficientes, teve o estádio mais longo (343 dias).

ESTÁDIO IV

Amostragem I — O índice de mortalidade foi bem grande neste estádio: 11 ninfas morreram, sendo que 10 com poucos dias de vida neste estádio. Quatro ninfas sofreram acidentes durante a ecdise; outras quatro morreram com 4 a 19 dias, sem se alimentar; uma com 26 dias e um repasto deficiente; outra com 104 dias, 12 repastos sendo três deficientes e o último óbito foi o de uma ninfa com 209 dias neste estádio e 25 tentativas de repastos.

As 18 ninfas restantes tiveram um estádio IV entre 50 e 353 dias, com média de 128,06 dias.

O número de repastos foi de quatro a 32, predominando de 4 a 9. Fez quatro repastos uma ninfa com estádio de 89 dias e, 32 repastos (sendo os seis primeiros deficientes) a ninfa com 353 dias (o estádio mais longo). A ninfa de estádio mais curto (50 dias) fez 5 repastos.

Amostragem II — O índice de mortalidade também foi elevado. Das 35 ninfas, 11 morreram: 4 por acidente durante a ecdise e destes, apenas uma ninfa havia apresentado problemas no estádio anterior que foi longo (262 dias) e com 18 repastos, alguns deficientes. Outra morte ocorreu com ninfa 38 dias e sem repastos. Duas ninfas morreram com 57 dias, com uma e duas tentativas de repastos. Outra ninfa morreu com 68 dias e 3 tentativas de repastos. A nona morte ocorreu com ninfa com 112 dias de vida neste estádio e 7 tentativas de repastos. A décima e décima primeira mortes ocorreram com ninfas com 234 e 249 dias neste estádio, após 17 e 16 repastos deficientes.

As demais ninfas tiveram um Estádio IV de 63 a 604 dias com média de 210,58 dias.

O número de repastos oscilou entre 3 e 37. Duas ninfas fizeram apenas três repastos, com 66 e 74 dias de duração do estádio IV. A ninfa que fez 37 repastos teve um estádio de duração de 604 dias (o mais longo), embora parte dos repastos tenha sido deficiente. A ninfa de estádio mais curto (63 dias) fez 6 repastos.

Neste estádio observamos 3 casos de hematofagismo em ninfas parceiras de frasco.

ESTÁDIO V

Amostragem I — Esta amostragem, já reduzida a 18 observações, sofreu mais a perda de 8 ninfas durante este estádio. Duas mortes foram por acidentes durante a ecdise, sendo que em uma das ninfas o estádio anterior já havia sido longo (440 dias) e com 28 repastos (a maioria deficientes). Uma morte ocorreu aos 49 dias, com 4 repastos, sendo dois deficientes; a quarta morte foi observada em uma ninfa com 81 dias neste estádio e sete repastos deficientes; a quinta morte foi de uma ninfa com 185 dias e após 15 repastos. Os três últimos óbitos foram em ninfas com 429, 475 e 490 dias neste estádio e após 32, 42 (algumas deficientes) e 35 refeições.

As 10 ninfas restantes tiveram este último estádio ninfal com 74 a 298 dias, com média de 169,3 dias. O intervalo mais freqüente foi de 121 a 200 dias.

O número de refeições foi de 7 a 23. Teve 7 repastos a ninfa com estádio V de 74 dias (estádio mais curto) e 23 repastos a ninfa de estádio mais longo (298 dias).

Amostragem II — Das 24 ninfas que entraram neste estádio, 10 não o completaram: 3 por acidente durante a ecdise (uma teve o estádio IV entre os mais longos, com 440 dias e 28 repastos, sendo que apenas os cinco últimos foram relativamente normais); outra com estádio IV de 315 dias, 23 repastos, alguns deficientes e a terceira ninfa com estádio IV curto (107 dias) e quatro repastos normais. As outras mortes ocorreram com ninfas com 165 a 456 dias, com muitos repastos, sendo alguns deficientes.

As 14 ninfas restantes fizeram este estádio num período de 144 a 609 dias, com a média em torno de 337,62 dias.

O número de repastos variou de 8 (ninfa com o estádio de 144 dias) a 31 (ninfa com o estádio de 609 dias).

VIDA ADULTA

Amostragem I — As 10 ninfas que chegaram a fase adulta, resultaram em 4 fêmeas com vida adulta de 66 a 349 dias, com média de 230 dias, e, 6 machos com vida adulta de 70 a 336 dias e com média de 221,17 dias.

O número de repastos foi, para as fêmeas, de 2 (para a fêmea de 66 dias) a 24 (para as fêmeas de 269 e 349 dias). Os machos fizeram de dois repastos (sendo um deficiente) para uma vida adulta de 70 dias a 19 repastos (alguns deficientes) para um macho de vida adulta de 336 dias.

Amostragem II — Das 14 ninfas que chegaram à fase adulta, cinco se tornaram fêmeas e nove machos. As fêmeas tiveram essa fase com 6 a 419 dias, mas como a ninfa de vida adulta de somente 6 dias havia sofrido uma queda durante a ecdise, tornando-se deformada, este dado não será considerado, então, a vida adulta mínima foi de 126 dias e a média foi de 267,5 dias. Para os machos a vida adulta oscilou entre 9 (também deformado por acidente na ecdise) a 429. A média, tirada de oito observações foi de 199,71 dias.

O número de repastos oscilou entre 5 a 19 (este para a fêmea de vida adulta mais longa) e entre os machos oscilou entre uma a dez refeições. O macho com vida mais longa (429 dias) fez apenas 6 repastos.

VIDA NINFAL

Amostragem I — A vida ninfal das 10 observações que completaram o desenvolvimento variou de 329 (para um macho) a 796 dias (para uma fêmea). A média foi de 473 dias.

Amostragem II — A vida ninfal das 14 observações que a completaram variou de 518 (para um macho) a 1.357 (para uma fêmea), com média de 802,23 dias.

VIDA TOTAL

Amostragem I — A vida total (do ovo até morte do adulto) nos 10 espécimens foi de 559 (para um macho) a 862 (para uma fêmea), com média de 697,7 dias.

Amostragem II — A vida total nas 13 observações foi de 620 dias (para um macho) a 1.737 dias (para uma fêmea), a média foi de 987 dias.

ACASALAMENTOS

Dos 10 adultos obtidos na amostragem I (3 fêmeas e 7 machos) temos que todas as fêmeas foram acasaladas, mas entre os machos, 4 não foram acasalados. Os acasalamentos foram:

1. Fêmea com 236 dias de vida adulta foi acasalada aos poucos dias de vida adulta com um macho (com um mês de vida adulta). Elaborou 37 ovos, dando apenas duas ninfas.

2. Fêmea de 269 dias de vida adulta, foi acasalada aos quatro dias de vida adulta com macho com dois dias de vida adulta. Elaborou 78 ovos, resultando 26 ninfas.

3. Fêmea com 349 dias de vida adulta foi acasalada aos 47 dias nesta fase com macho com 56 dias de vida adulta. Produziu 99 ovos, alguns deformados, resultando 40 ninfas.

Essas 68 ninfas obtidas nos três acasalamentos formaram a amostragem II.

Um dos machos desta amostragem foi acasalado com uma fêmea de *T. brasiliensis* produzindo ninfas híbridas.

Dos 14 adultos obtidos na segunda amostragem, 5 foram fêmeas e 9 machos. Das fêmeas, duas não foram acasaladas. Com uma fêmea foram feitas tentativas de acasalamento com macho de *T. brasiliensis,* mas apesar de produzir 14 ovos, não houve descendência.

A quarta fêmea foi acasalada com um macho de *T. brasiliensis* produzindo 20 ovos, resultando 17 ninfas. Esta mesma fêmea foi acasalada com um macho da mesma espécie, produzindo 18 ovos viáveis.

A fêmea restante, com vida adulta de 145 dias, foi cruzada com um macho híbrido de *T. brasiliensis* e *T. lenti*. Conviveram no mesmo frasco por 73 dias. A fêmea elaborou 16 ovos, resultando apenas uma ninfa que pereceu com poucos dias de vida.

Dos 9 machos, cinco não foram acasalados. Com um dos machos foi tentado acasalamento com fêmea híbrida de *T. brasiliensis* e *T. lenti,* mas não houve prole. Novo acasalamento foi tentado com esse macho e uma fêmea de *T. brasiliensis* mas, quatro dias após, a fêmea morreu e o macho sobreviveu ainda 116 dias sem mais acasalamentos.

CONCLUSÕES

Esta espécie apresentou problemas de adaptação às nossas condições ambientais (Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, SP) e como nas observações sobre *T. brasiliensis* (Heitzmann-Fontenelle), os índices de mortalidade foram altos, notadamente nos estádios IV e V quando de 61 observações no estádio III, passamos para 42 no estádio IV e ficamos reduzidos a 21 observações no estádio V.

Comparando-se o ciclo evolutivo desta espécie com o das espécies já estudadas (1, 2, 3 e 4) teremos o seguinte:

Duração do desenvolvimento embrionário (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	23	28	24,51
Triatoma sordida	22	34	27,50
Triatoma vitticeps	30	43	34,59
Triatoma brasiliensis	32	68	40,40
Triatoma lenti	29	49	38,11

Duração do estádio I (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	26	119	58,05
Triatoma sordida	31	232	71,49
Triatoma vitticeps	28	105	54,08
Triatoma brasiliensis	36	256	134,13
Triatoma lenti	25	172	63,88

Duração do estádio II (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	26	102	52,67
Triatoma sordida	23	209	68,35
Triatoma vitticeps	32	243	64,76
Triatoma brasiliensis	22	175	59,15
Triatoma lenti	21	334	86,06

Duração do estádio III (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	30	84	46,73
Triatoma sordida	40	172	77,50
Triatoma vitticeps	39	184	64,50
Triatoma brasiliensis	29	612	98,64
Triatoma lenti	45	343	130,87

Duração do estádio IV (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	24	90	53,78
Triatoma sordida	45	342	101,19
Triatoma vitticeps	42	287	106,56
Triatoma brasiliensis	37	371	188,35
Triatoma lenti	50	604	175,21

Duração do estádio V (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	43	377	111,41
Triatoma sordida	42	1.112	167,33
Triatoma vitticeps	98	517	186,24
Triatoma brasiliensis	61	525	257,64
Triatoma lenti	74	609	264,43

Duração da fase adulta (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	31	370	117,81
Triatoma sordida	56	955	307,97
Triatoma vitticeps	66	820	369,69
Triatoma brasiliensis	30	626	324,27
Triatoma lenti	54	429	214,32

Duração da vida ninfal (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	119	346	323,43
Triatoma sordida	306	1.408	489,90
Triatoma vitticeps	349	781	463,66
Triatoma brasiliensis	245	1.348	603,83
Triatoma lenti	329	1.357	659,09

Duração da vida total (em dias)

	mínimo	máximo	média
Panstrongylus megistus	260	689	443,70
Triatoma sordida	478	1.473	808,62
Triatoma vitticeps	523	1.316	833,55
Triatoma brasiliensis	310	1.896	930,83
Triatoma lenti	559	1.737	861,22

Pela tabela acima podemos ver que, embora as durações dos estádios variem entre as diversas espécies, a duração da vida ninfal foi mais ou menos constante entre as duas espécies de *Triatoma* mais aclimatadas *(sordida* e *vitticeps)* e entre as duas espécies com problemas de adaptação *(brasiliensis* e *lenti)* e diferem do gênero *Panstrongylus*. Quanto a vida total podemos ver que todas as espécies de *Triatoma* têm aproximadamente durações equivalentes.

ABSTRACT: Here we are studying the *Triatoma lenti* life cycle and it are compared with those Triatominae species that have been reared in some laboratory conditions.

KEYWORD: *Triatoma lenti* — evolutive cycle in laboratory.

HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de Triatomíneos. V — *Triatoma lenti* Scherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*: 165-174, 1983/84.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia Comparativa de Triatomíneos: I — *Panstrongylus megistus* (Burn., 1835). (Hemiptera, Reduviidae). *Studia Ent., 19*(1-4) :201-210, 1976.

2. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia Comparativa de Triatomíneos. III — *Triatoma sordida* (Stal, 1859),. (Hemiptera, Reduviidae). *Studia Ent., 20*(1-4) :89-98, 1978.

3. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia Comparativa de Triatomíneos. IV — *Triatoma vitticeps* Stal, 1835. (Hemiptera, Reduviidae). *Ecossistema, 5*:39-46, 1980.

4. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia Comparativa de Triatomíneos. II — *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*: 157-164, 1983/84.

5. LENT, H. & WYGODZINSKY, P. Revision of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas'disease. *Bull. Amer. Must. Nat. Hist., 153*(3) :123-520, 320 figs., 2 tabl., 1979.

Recebido e aceito para publicação em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:175-181, 1983/84

BIONOMIA COMPARATIVA DE TRIATOMíNEOS. VI — HíBRIDOS DE *TRIATOMA BRASILIENSIS* NEIVA, 1911 X *TRIATOMA LENTI*, SCHERLOCK & SERAFIM, 1967 HEMIPTERA, REDUVIIDAE) *

Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE **

RESUMO: O ciclo evolutivo de híbridos resultantes do cruzamento em laboratório, de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma lenti*, é estudado desde sua fase embrionária até adulto, e os dados obtidos são comparados com os dos ciclos evolutivos das duas espécies que lhes deram origem e também criadas em laboratório, com as mesmas condições ambientais.

PALAVRA-CHAVE: Híbridos de *Triatoma brasiliensis* x *Triatoma lenti*: ciclo evolutivo em laboratório.

INTRODUÇÃO

A obtenção de híbridos entre os triatomíneos, não é fato inédito, NEIVA [7] já menciona a possibilidade de cruzamento entre espécies diferentes. ABALOS [1], GALVÃO [2], MAZZOTTI & OSORIO [5], [6] referem a híbridos experimentais mas de um modo geral, é abordado principalmente, o aspecto morfológico dos híbridos resultantes. Este aspecto será assunto de um próximo trabalho, e agora irei considerar apenas a sua bionomia, comparando-a com as duas espécies que lhe deram origem [3], [4].

MATERIAL E MÉTODO

No laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, a criação de triatomíneos é feita em pequenos borréis contendo de seis a dez espécimens diferenciáveis taxonomicamente ou pela fase evolutiva, para ser possível o acompanhamento individual dos seus ciclos de vida. Esse agrupamento se faz necessário para um aproveitamento mais racional do tempo gasto nas alimentações, dado a grande quantidade de observações simultâneas.

Durante o ano de 1973, criava, no laboratório, espécimens de *T. brasiliensis* e *T. lenti*. Casualmente, num frasco de criação, onde já havia uma fêmea de

* Trabalho efetuado com auxílio do CNPq.

** Seção de Parasitologia do Instituto Butantan.

T. brasiliensis, uma ninfa de *T. lenti* tornou-se um macho. O casal foi conservado junto e das posturas resultantes, eclodiram 118 ninfas híbridas. Ainda, na mesma época, fiz outras tentativas de acasalamentos e obtive mais 18 ninfas, mas sempre de fêmeas de *T. brasiliensis.* O acasalamento inverso, isto é, de fêmea de *T. lenti* com macho de *T. brasiliensis* não deram descendentes.

Dois anos após, tentei novamente o cruzamento de fêmea de *T. lenti* com macho de *T. brasiliensis* e obtive mais 17 ninfas híbridas.

Em virtude do ciclo evolutivo em laboratório ter apresentado variações, vou analisar separadamente, os descendentes híbridos das fêmeas de *T. brasiliensis* e de *T. lenti.*

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Como os 153 ovos foram ovipostos em vários meses do ano, vou considerar as posturas mensais, pois o desenvolvimento embrionário é variável com o período sazonal (verão-inverno).

No período de 13-02 a 24-02-1974 foram ovipostos pela fêmea *brasiliensis,* 23 ovos que desalagaram após 29 a 39 dias, com média de 32, 73 dias. A fêmea *lenti* ovipôs entre 17-02 e 28-02-1976, 6 ovos com períodos embrionários de 39 a 49 dias e média de 42, 67 dias.

No período de 02-03 a 29-03-1974, obtive 29 ovos da fêmea de *brasiliensis* que desalagaram após 34 a 53 dias dando a média de 45, 10 dias. A fêmea de *lenti,* ovipôs entre 04-03 e 19-03-1976, 10 ovos com desenvolvimento embrionário de 44 a 66 dias, com média de 56, 70 dias.

No período entre 02-04 a 17-04-1974 obtive 4 ovos da fêmea de *brasiliensis,* com períodos embrionários entre 45 e 49 dias e com média de 47 dias, além de um ovo da fêmea de *lenti* com desenvolvimento embrionário de 78 dias.

No período de 01-05 a 27-05-1974, a fêmea de *brasiliensis* elaborou 28 ovos que tiveram um desenvolvimento embrionário entre 32 e 43 dias, com a média de 40,04 dias.

No período de 01-06 a 29-06-1974 obtive 42 ovos da fêmea de *brasiliensis,* com desenvolvimento embrionário de 40 a 50 dias e com média de 43,63 dias.

Em julho, foram ovipostos 9 ovos pela fêmea *brasiliensis,* com desenvolvimento embrionário de 46 a 61 dias e com média de 51,22 dias. Em agosto, apenas um ovo da fêmea de *brasiliensis,* com um período embrionário de 60 dias.

ESTÁDIO I

Das 136 ninfas desalagadas entre 16-03 e 05-10-1974 e descendentes de fêmea *brasiliensis,* 44 morreram antes de completar este estádio: 32 ninfas morreram com menos de 20 dias de vida, sem se alimentar (a maioria) ou após um repasto. Quatro morreram entre 21 e 30 dias de vida, sendo uma sem repasto, duas com um repasto deficiente e uma com dois repastos. As outras mortes foram com ninfas de 50 a 156 dias de vida e com repastos deficientes.

As 92 ninfas restantes tiveram um Estádio I entre 31 e 155 dias, sendo que dos 31 aos 80 dias houve uma ocorrência de 45,65% (42 observações) e

dos 81 aos 120 houve uma ocorrência de 46,74% (43 observações). Acima de 121 dias tive 7 observações (7,61%). A média foi de 80,66 dias.

O número de repastos variou de um a 11, prevalecendo de 3 a 7 repastos. A ninfa de estádio mais curto (31 dias) fez apenas um repasto. Duas ninfas fizeram 11 repastos: uma com estádio de 155 dias (o mais longo) e outra com estádio de 137 dias.

A primeira refeição ocorreu entre o 5.º e o 28.º dias, sendo que 43,48% da amostragem já havia feito seu primeiro repasto até o 10.º dia e 88,04% da amostragem, antes do 20.º dia. Apenas uma ninfa fez o seu primeiro repasto no quinto dia e teve um estádio de 37 dias e, também, apenas uma ninfa fez o repasto no 28.º dia, com um estádio de 106 dias. A ninfa de estádio mais curto fez a primeira refeição aos 13 dias e a de estádio mais longo o fez no sétimo.

Das ninfas eclodidas entre 30-03 e 19-06-1976, descendentes da fêmea *lenti*, 10 morreram antes de completar o estádio, com 8 a 214 dias, sendo que a ninfa que viveu apenas 8 dias, fazendo um repasto no 7.º, morreu por acidente, presa ao papel suporte, nas fezes dos outros triatomíneos do frasco. Mais duas ninfas morreram com menos de 30 dias, sem repastos; 5 morreram com menos de 100 dias e após uma ou duas refeições. Duas mortes ocorreram com 115 e 214 dias, após 2 e 8 repastos, respectivamente.

As demais ninfas, em número de 7, tiveram um estádio entre 113 e 239 dias, com média de 195,33 dias.

O número de repastos nesta amostragem oscilou de 6 a 9. Fez 6 repastos a ninfa de estádio mais curto (113 dias) e fizeram 9 repastos, duas ninfas com 200 e 205 dias. A ninfa de estádio mais longo (239 dias) fez 8 repastos.

A primeira refeição ocorreu entre o 13.º (para a ninfa de estádio mais curto) e 37.º dia (para a ninfa de estádio mais longo).

ESTÁDIO II

Das 92 ninfas que entraram neste estádio entre 27-04-1974 e 04-01-1975, 27 ninfas não o completaram, morrendo com 3 a 369 dias neste estádio. As mortes ocorreram: cinco com menos de 20 dias, sendo três por acidentes durante a ecdise. Dos 21 aos 50 dias, houve 7 mortes: uma sem se alimentar e as demais com dois a quatro repastos deficientes e duas delas tentaram o hematofagismo em ninfas de tamanho maior, parceiras de frasco. Dos 51 aos 100 dias ocorreram 7 mortes após 2 a 5 repastos deficientes. Dos 101 aos 150 dias ocorreram mais 7 mortes: uma sem repasto e as demais após 5 a 8 repastos deficientes. A última morte ocorreu em ninfa com 369 dias neste estádio e 25 repastos deficientes.

As 65 ninfas restantes tiveram um Estádio II entre 54 e 213 dias, com média de 111,50 dias.

O número de refeições variou entre 3 e 15, predominando de 5 a 10. Fizeram 3 repastos, duas ninfas, com estádios de 63 e 72 dias e apenas uma ninfa fez 15 repastos, sendo alguns deficientes, completando o estádio em 162 dias. A ninfa de estádio mais curto (54 dias) fez 4 repastos e a ninfa de estádio mais longo (213 dias) fez 13.

Nas sete ninfas do segundo lote de observações, o Estádio II, iniciado entre 22-07 e 02-12-1976, durou de 37 a 133 dias com média de 78,43 dias.

O número de repastos foi de 2 a 5. Duas ninfas fizeram 2 repastos, com estádios de 37 (o mais curto) e 53 dias. Fez 5 repastos uma ninfa com estádio de 133 dias (o mais longo).

ESTÁDIO III

Das 65 ninfas que iniciaram este estádio entre 08-07-1974 e 03-07-1975, 27 não o completaram, 10 por acidente durante a ecdise, sendo que uma ainda viveu 4 dias; 9 morreram antes dos 100 dias e após um a sete repastos deficientes; 5 com 102 a 159 dias neste estádio e 6 a 14 repastos deficientes. Três mortes ocorreram com 333, 423 e 436 dias e após 23, 31 e 33 repastos deficientes. Na ninfa que morreu com 423 dias, foi observado uma tentativa de hematofagismo em ninfa de T. *vitticeps*.

As 38 ninfas restantes tiveram um Estádio III com durações de 31 a 452 dias, dando a média de 73,24 dias.

O número de repastos oscilou entre um (ninfa de estádio mais curto) e 30 (ninfa de estádio mais longo). Neste mesmo exemplar, foi observado, por duas vezes, tentativas de hematofagismo. Em outra ninfa, com estádio de 273 dias, também houve tentativa de hematofagismo em duas ocasiões.

As 7 ninfas descendentes da fêmea de *lenti,* tiveram um Estádio III, iniciado entre 02-12-1976 e 15-03-1977, com durações de 67 a 330 dias, dando a média de 192,86 dias.

O número de repastos foi de 2 a 11. A ninfa de estádio mais curto fez 2 e a de estádio mais longo fez 11.

ESTÁDIO IV

Das 38 observações que entraram neste estádio, entre 22-10-1974 e 31-03-1976, 15 morreram: 9 por acidentes durante a ecdise, sendo 8 com morte imediata e uma após 39 dias. As mortes restantes ocorreram com 29 a 201 dias e após uma a oito refeições deficientes.

As 23 ninfas restantes tiveram um estádio IV com durações de 47 a 428 dias, com média de 203,61 dias.

Das 7 ninfas que entraram neste estádio entre 22-02 e 17-11-1977, uma morreu aos 46 dias e após um repasto. As demais tiveram um estáido entre 206 e 386 dias, dando a média de 302,17 dias.

O número de repastos foi de 6 a 12, sendo 6 para a ninfa de estádio com 206 dias (o mais curto). Três ninfas fizeram 12 repastos: duas com 386 dias (o mais longo) e outra com 362 dias.

ESTÁDIO V

Das 23 ninfas que entraram neste estádio entre 27-01-1975 e 28-01-1977, seis não o completaram, morrendo: duas por acidente durante a ecdise; duas

com 107 e 115 dias e ambas após 7 repastos não-satisfatórios; uma com 352 dias no estádio e 13 repastos, sendo alguns deficientes e, o outro óbito foi com uma ninfa com 722 dias no estádio e 41 repastos, havendo duas tentativas de hematofagismo.

As 17 ninfas restantes tiveram um Estádio V de 76 a 610 dias, com média de 327,12 dias.

O número de repastos foi de 4 (para a ninfa de estádio mais curto) a 41 (para a ninfa de estádio mais longo).

Das 6 ninfas que entraram neste estádio entre 03-11-1977 e 25-11-1978, uma morreu com 1153 dias e após 27 repastos. As demais tiveram um Estádio V de 104 a 748 dias, com média de 358,80 dias.

O número de repastos variou entre 3 e 17, sendo 3 para a ninfa de estádio mais curto e 17 para a de estádio mais longo.

VIDA ADULTA

Apenas 17 ninfas chegaram à fase adulta, iniciada entre 16-10-1975 e 27-02-1978, resultando em 7 fêmeas e 10 machos. A vida adulta entre as fêmeas, excetuando-se três delas que, por acidentes durante a ecdise, tiveram apenas poucos dias de vida (4, 8 e 15 dias), foi de 110 a 604 dias, com média de 313,75 dias. A vida adulta dos machos foi de 62 a 453 dias, com média de 184,20 dias.

O número de repastos foi de dois (para o macho com fase adulta mais curta) a 23 (para a fêmea de vida adulta mais longa). Foram observados alguns casos de hematofagismo.

As 5 ninfas do segundo lote e que entraram na fase adulta entre 15-02-1978 a 11-12-1980, resultaram em três machos e duas fêmeas. A vida adulta dos machos foi de 129 a 348 dias, dando a média de 216,33 dias. A vida adulta das fêmeas foi de 70 e 123 dias, dando a média de 96,50 dias.

O número de repastos foi de 2 (para as duas fêmeas) e 4 a 12 para os machos.

VIDA NINFAL

A vida ninfal das 17 ninfas que a completaram, durou de 502 dias (01-06-1974 a 16-10-1975) em uma fêmea, a 1332 dias (26-06-1974 a 27-02-1978) em um macho. A média foi de 866,65 dias, mas se considerarmos por sexo, a vida ninfal dos machos foi de 833,20 e das fêmeas 913,86 dias.

O desenvolvimento evolutivo das 5 ninfas do segundo lote foi de 683 (03-04-1976 a 15-02-1978) para um macho e de 1715 dias (03-05-1976 a 12-12-1980) para uma fêmea. A média foi de 1087 dias, mas, por sexo, ela foi de 805,67 para os machos e 1509 dias para as fêmeas.

O exemplar que morreu durante o Estádio V, com 1153 dias, teve uma vida ninfal bem mais longa que a ninfa de maior vida ninfal: ela foi de 2115 dias (de 03-04-1976 a 17-01-1980).

HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de Triatomíneos. VI — Híbridos de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 X *Triatoma lenti*, Scherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:175-181, 1983/84.

VIDA TOTAL

A vida total das 17 observações foi de 770 a 1554 dias para os machos, com média de 1098,14 dias e de 612 a 1525 dias para as fêmeas, com média de 1011,20 dias.

A vida total dos 5 espécimens, resultantes da fêmea de *T. lenti* foi de 855 a 1329 dias, para os machos, dando a média de 1022 dias, e 1431 e 1785 dias para as fêmeas, dando a média de 1608 dias.

ACASALAMENTOS

Dos 10 machos híbridos obtidos a partir de fêmea *brasiliensis,* 6 não foram acasalados e com os 4 restantes foram feitas tentativas de acasalamento com fêmeas também híbridas, quer descendentes de fêmea *brasiliensis* ou *lenti,* sendo que do acasalamento com uma fêmea híbrida descendente de fêmea *brasiliensis,* resultou uma ninfa que durou apenas 9 dias

Das seis fêmeas híbridas deste lote, com duas não foram tentados acasalamentos, sendo que uma delas elaborou 29 óvulos. Das outras 5 fêmeas tive:

1 — Fêmea acasalada aos 10 dias de vida adulta com macho híbrido em 21-12-1976, elaborou 6 ovos (entre 01-03 e 13-04-1977), sendo que um eclodiu, após 35 dias de desenvolvimento embrionário, dando uma ninfa muito pequena, que viveu apenas 9 dias. Em 01-07-1977, coabitou com outro macho híbrido, elaborando mais 10 ovos não-viáveis.

2 — Fêmea acasalada com 6 dias de vida adulta com macho híbrido. A fêmea viveu apenas 8 dias, não ovipondo.

3 — Fêmea acasalada com 6 dias de vida adulta com macho de *T. lenti,* elaborando 8 ovos não-viáveis. Com a mesma fêmea foi tentado outro acasalamento com macho híbrido, mas ela morreu 29 dias após, sem ovipôr.

4 — Fêmea pouco deformada por acidente durante a ecdise, coabitou com um macho híbrido, mas conviveu apenas 15 dias, não ovipôs.

5 — Fêmea com 425 dias de vida adulta, coabitou com macho de *T. lenti,* não ovipondo.

Dos 5 adultos obtidos do lote descendente de fêmea de *T. lenti* temos: um macho não foi acasalado; um macho foi acasalado com uma fêmea de *T. lenti,* e que apesar de eliminar o espermatóforo não deixou descendentes, e um macho foi acasalados com uma fêmea híbrida, descendente de fêmea *brasiliensis.*

As duas fêmeas deste lote não foram acasaladas.

CONCLUSÕES

Os híbridos obtidos mostraram grande dificuldade de adaptação, haja vista pela mortalidade alta durante as fases ninfais (85,62% da amostragem), pelo grande número de acidentes durante as ecdises, pela grande quantidade de alimentações deficientes e pelas mortes após estágios muito prolongados.

Quanto ao seu comportamento durante o ciclo evolutivo, embora fossem perceptível certas diferenças de comportamento entre os resultados obtidos de

descendentes de fêmea *T. brasiliensis* e de fêmea de *T. lenti,* os resultados finais não as colocam próximas aos das espécies ascentes. Assim, a duração média para a vida ninfal de *T. brasiliensis* foi de 603,83 dias, o que foi próxima da de *T. lenti* que foi de 659,09 dias. Para os espécimes híbridos de fêmea *brasiliensis* a vida ninfal teve a duração média de 866,65 dias e para os híbridos de fêmea de *lenti* a duração média de 1087 dias. A vida total foi: 861,22 dias para *T. lenti;* 930,83 dias para *T. brasiliensis;* 1046,75 dias para os híbridos descendentes de fêmea *brasiliensis* e de 1256 dias para os híbridos descendentes de fêmea *lenti.* Portanto, o desenvolvimento evolutivo dos híbridos esteve acima do das duas espécies que lhe deram origem.

ABSTRACTS: The life cycle of hybrids from *T. brasiliensis* x *T. lenti* is here studied in laboratory conditions from oviposition until death of adults and the results obtained in this paper is compared with those of *T. brasiliensis* and *T. lenti.*

KEYWORDS: Hybrids of *T. brasiliensis* x *T. lenti*: Evolutive cycle in laboratory.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABALOS, W.J. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma. An. Inst. Med. Reg. Tucumán, 2*:209-223, figs. 1948.
2. GALVÃO, A.B. Diferenças fenotípicas externas entre híbridos interespecíficos e suas respectivas espécies, vetoras da Doença de Chagas no Brasil (Triatominae, Reduviidae). *Rev. Bras. Biol., 38*(1):45-54, 1958.
3. HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de triatomíneos. II — *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:157-164, 1983/84.
4. HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de triatomíneos. V — *Triatoma lenti* Scherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:165-174, 1983/84.
5. MAZZOTTI, L. & OSORIO, M.T. Resultados obtenidos en cruzamientos con espécies diferentes de *Triatoma. Rev. Fac. Med. Bogotá, 10*(2):159-160, 1941.
6. MAZZOTTI, L. & OSORIO, M.T. Cruzamientos experimentales entre várias espécies de *Triatoma. Rev. Med. Méx., 22*:215-222, figs. 1942.
7. NEIVA, A. Revisão do gênero *Triatoma* Lap. Rio de Janeiro, de *Rodrigues* et *Cie* édit., 80 p., 1914.

Recebido e aceito para publicação em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:183-188, 1983/84

BIONOMIA COMPARATIVA DE TRIATOMíNEOS. VII — *RHODNIUS NEGLECTUS* LENT, 1954 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)

Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE *

RESUMO: O ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, é estudado desde ovo até a morte dos adultos e os dados obtidos comparados com os das espécies já estudadas em mesmas condições laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhodnius neglectus* Lent, 1954: ciclo evolutivo em laboratório.

INTRODUÇÃO

Pertencem ao gênero *Rhodnius,* barbeiros de pequeno porte, com desenhos nos hemiélitros, que o fazem parecer a certos percevejos predadores, não vectores da Doença de Chagas. Sua freqüência no Estado de São Paulo não é muito grande e as espécies mais encontradas são *prolixus* e *neglectus.*

Costa e colaboradores (1, 2 e 3) estudaram bem a espécie *neglectus,* assunto desta nota, no Laboratório da Universidade de Veterinária de Minas Gerais (Belo Horizonte) e seus trabalhos tratam da evolução, jejuns, acasalamento e fertilidade. O nosso trabalho é mais uma contribuição para o conhecimento desta espécie em condições ambientais diferentes.

MATERIAL E MÉTODO

O material em estudo foi isolado de uma criação geral, existente no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, desde 1972, que, por sua vez, foi obtida de criação do Laboratório da Escola Nacional de Saúde Pública, RJ, e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Samuel B. Pessoa. A localidade de origem do material é desconhecida.

Dessa nossa criação geral, foram isolados 51 ovos ovipostos entre 30-10 e 4-12-1980 (dois em outubro, 41 em novembro e 8 em dezembro).

Esses ovos eram colocados em pequenas caixas plásticas com tampa e forradas de papel-filtro, anotando-se a data de postura e, as ninfas, à medida

* Seção de Parasitologia do Instituto Butantan.

que iam eclodindo, eram postas em pequenos borréis de criação junto com ninfas diferenciáveis, por espécies ou por estádios, para tornar possível as suas distinções. Cada ninfa era identificada por um número colado externamente no frasco e seu desenvolvimento, bem como a freqüência da alimentação e outros dados de interesse, eram devidamente anotados.

A alimentação era feita em orelha de coelho e por uma só pessoa, a fim de se evitar influências por manuseios diferentes.

A observação da amostragem levou 3 anos e 4 meses (30-10-1980 a 7-2-1984).

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Dos 51 ovos ovipostos entre 30-10 e 4-12-1980, o período embrionário variou de 17 a 28 dias, sendo a maior incidência entre 19 e 25 dias (88,24% da amostragem). A média foi de 21,8 dias.

ESTÁDIO I

Das 51 ninfas eclodidas entre 23-11 e 21-12-1980, nove morreram antes de efetuar a primeira ecdise, entre 3 e 63 dias de vida e sem se alimentar; outra ninfa, que fez sua única refeição aos 45 dias, morreu aos 49 dias.

As 41 ninfas restantes completaram o Estádio I entre 14 e 72 dias, tendo 25 observações (60,98% da amostragem) com este estádio entre 21 e 40 dias. A média foi de 33,9 dias.

O período anual predominante deste estádio foi de novembro de 1980 a janeiro de 1981.

O número de repastos foi de um a quatro, sendo que, das 41 observações, 25 fizeram apenas um. A ninfa de estádio mais curso (14 dias) fez um repasto e a de estádio mais longo (72 dias) fez dois. A ninfa com o maior número de refeições (quatro) teve um estádio de 54 dias.

A primeira refeição ocorreu a partir do 5.º dia (três observações, sendo duas em ninfas com estádios de 14 dias e outra com estádio de 29 dias). Apenas duas ninfas levaram 45 dias para fazer a sua primeira refeição: a que morreu aos 49 dias e outra com estádio I de 63 dias e que fez, durante o estádio, duas refeições. Quarenta por cento da amostragem já havia feito um repasto aos 10 dias de vida e 42% fez o seu primeiro repasto entre 11 e 20 dias.

O maior jejum inicial foi de 45 dias e, durante o estádio, o maior jejum foi de 44 dias, entre o 1.º e 2.º repastos, num exemplar de estádio de 72 dias.

ESTÁDIO II

Das 41 ninfas que entraram neste estádio entre 15-12-1980 e 22-2-1981, duas não o completaram: uma morrendo dois dias após a ecdise e a outra 28 dias após, tendo feito uma refeição aos 19 dias; ambas por acidentes no manuseio, pois sendo ninfas pequenas e muito ativas, subindo rapidamente pelo suporte, inadvertidamente foram esmagadas no tampo ao se fechar o frasco.

Das 39 restantes, em duas não anotamos a ocorrência da ecdise II, mas foram ninfas de estádio curto, pois a soma dos dois estádios (II e III) nos deu 50 e 69 dias, respectivamente. Para as demais, o estádio II durou de 19 a 127 dias, predominando a faixa dos 19 aos 50 dias. A média foi de 52,43 dias.

O período anual predominante foi de janeiro a fevereiro de 1981.

O número de repastos foi de um a quatro, predominando um (26 observações no total de 37). Três ninfas com estádio de 19 dias (o mais curto) fizeram apenas um repasto e a ninfa de estádio mais longo (127 dias) fez quatro.

ESTÁDIO III

Das 39 ninfas que iniciaram este estádio entre 26-1 e 12-5-1981, em duas não anotamos as datas de ecdises e completaram, como já dito, os estádios II+III em 50 e 69 dias. Duas outras não completaram o estádio, morrendo, com 7 e 70 dias após a ecdise, por acidentes durante a muda.

As 35 ninfas restantes tiveram o estádio com durações de 22 a 230 dias, predominando estádio de 31 a 60 dias. A média foi de 64,37 dias.

O período anual predominante foi de março a maio de 1981.

O número de repastos foi predominantemente de apenas um (26 observações). Uma única ninfa fez quatro repastos e foi justamente a de estádio mais longo (230 dias).

ESTÁDIO IV

As 37 ninfas que entraram neste estádio entre 17-2 e 2-10-1981, o completaram entre 33 e 265 dias, sendo pouco freqüentes estádios com menos de 50 dias (5 observações) ou acima de 160 dias (6 observações). A média geral foi de 120,22 dias.

O período anual predominante foi de maio a agosto de 1981.

O número de repastos foi de um a cinco, predominando dois a três. A ninfa de estádio mais curto (33 dias) fez um repasto e a de estádio mais longo (265 dias) fez três. O maior número de repastos (cinco) foi feito por três ninfas de estádios com 157, 165 e 211 dias.

ESTÁDIO V

Das 37 ninfas que entraram neste estádio entre 27-3-1981 e 4-4-1982, sete não o completaram: duas morrendo por acidentes durante a ecdise; uma morrendo com 152 dias neste estádio e que após ficar sem se alimentar 47 dias antes e 106 após a ecdise num total de 153 dias, fez um repasto bastante deficiente; outra morreu com 192 dias neste estádio e sem se alimentar (antes da ecdise fizera um jejum de 58 dias, perfazendo 248 dias sem se alimentar); as outras três mortes foram com 338, 399 e 449 dias e após 5 a 8 repastos. Em todas as observações com vários repastos, sempre houve um ou mais deficientes, com pouca ingestão de sangue.

Nas 30 ninfas restantes, o Estádio V levou de 34 a 463 dias. Houve apenas quatro observações com menos de 100 dias (34, 79, 86 e 90 dias) e oito observações acima de 200 dias: cinco entre 208 e 261 dias, uma com 313 dias e duas acima de 400 dias (445 e 463 dias). A média foi de 175,87 dias.

O período anual predominante foi de julho de 1981 a julho de 1982.

O número de repastos foi de um (efetuado pela ninfa de estádio mais curto) a dez (feito pela ninfa de estádio mais longo).

VIDA ADULTA

Dos 51 ovos selecionados, apenas 30 alcançaram a fase adulta dos quais 16 foram machos e 14 fêmeas.

O primeiro adulto surgiu em 30-09-1981 (um macho, após um período de desenvolvimento de 288 dias) e o último foi uma fêmea em 2-12-1982 que infelizmente sofreu acidente durante a última ecdise.

A vida adulta variou de 40 a 791 dias: 5 com vida adulta inferior a 100 dias (4 machos e uma fêmea); duas com vida adulta entre 101 e 200 dias (um macho e uma fêmea); quatro observações com vida adulta de até 300 dias (machos); nove observações dos 301 a 400 dias (5 fêmeas e 4 machos); seis entre 401 e 500 dias (quatro fêmeas e dois machos) e finalmente, as duas observações de vida adulta mais longa, foram duas fêmeas com 692 e 791 dias.

Em relação ao sexo temos: para as fêmeas, a fase adulta foi de 62 a 791 dias, dando uma média de 366,5 dias e para os machos, tivemos durações de 40 a 454 dias, com média de 232,88 dias.

O número de repastos variou de um único (para os adultos com menos de 100 dias) a 22 (para a fêmea de vida adulta mais longa). Um macho que viveu 109 dias não fez nenhum repasto. Além disso, devemos mencionar que uma grande parte dos adultos, pelo menos uma vez nesta fase, fez repastos exagerados, ficando excessivamente gordos chegando, quando machos, a extroverter a genitália.

VIDA NINFAL

Das 51 observações iniciais, 21 ninfas morreram durante o desenvolvimento e destas, 10 ninfas morreram no estádio I; duas ninfas morreram no estádio II, vítimas de acidentes no manuseio; duas ninfas morreram por acidente, durante a Ecdise II e 7 ninfas morreram no estádio V, sendo que duas por acidentes durante a ecdise IV.

As 30 ninfas que completaram o período ninfal o fizeram entre 23-11-1980 e 2-12-1982, tendo levado de 288 dias (um macho) a 728 dias (uma fêmea), predominando as observações de 301 a 500 dias (22 observações).

Os machos tiveram vidas ninfais de 288 a 723 dias, com média de 449,25 dias, e as fêmeas tiveram vidas ninfais de 357 a 728 dias, com média de 455,93 dias.

VIDA TOTAL

A vida total (da eclosão à morte do adulto) oscilou entre 397 a 1.150 dias. A maioria oscilou entre 601 a 850 dias (11 machos e 11 fêmeas).

O macho de menor vida total viveu 397 dias e de maior viveu 948 dias. A fêmea de menor vida total viveu 602 dias e a de maior viveu 1.150 dias. A média foi de 685,25 para os machos e de 822,5 para as fêmeas.

ACASALAMENTOS

Como já mencionamos, obtivemos 16 machos e 14 fêmeas. Das 14 fêmeas, uma morreu logo após sofrer a última ecdise, devido a acidente durante a muda. Três outras morreram antes de se acasalarem com 62, 130 e 308 dias de vida adulta. A fêmea que viveu 62 dias elaborou um único óvulo aos 28 dias de vida adulta. As 10 restantes foram acasaladas, mas três delas elaboraram óvulos (36 óvulos no total).

Os acasalamentos foram efetuados tardiamente, quando as fêmeas já contavam entre 157 e 378 dias. Apenas uma fêmea foi acasalada com 11 dias, e outra fêmea efetuou dois acasalamentos.

Quanto aos 16 machos: um morreu logo após a última ecdise por acidente. Outros quatro não acasalaram, e foram os machos de vida curta (40 a 109 dias). Os 11 restantes foram acasalados com idades de 36 a 454 dias.

A produção de ovos feita pelos 10 acasalamentos não foi grande. Apenas 441 ovos no total e o índice de viabilidade dos ovos também foi baixo — obtivemos apenas 110 ninfas — 22,68%.

CONCLUSÕES

As nossas observações sobre *Rhodnius neglectus* nos mostraram ser uma espécie de desenvolvimento rápido, tendo uma vida total entre um ano e um mês a três anos e dois meses. Quanto ao número de alimentações também foi bastante pequeno, principalmente na fase ninfal, sendo observado em uma ninfa apenas sete repastos (um repasto em cada estádio até o III e dois repastos nos estádios IV e V).

Comparando-se com as espécies já estudadas (4, 5, 6, 7 e 8) vemos que *Rhodnius neglectus* teve o menor desenvolvimento embrionário (21,8 dias) e o menor estádio I (33,9 dias). O estádio II foi de duração aproximada com o de *Panstrongylus megistus* (52,43 dias para *neglectus* e 52,67 dias para *megistus)*. O estádio III esteve acima da média de *megistus* (46,73) mas bem próximo da de *T. vitticeps* (64,5 dias para esta e 64,37 dias para *neglectus)*. O estádio IV esteve acima de *megistus, sordida* e *vitticeps*. O estádio V acima de *megistus* (111,41 dias) e de *sordida* (167,33 dias). A vida adulta, considerando apenas a duração máxima, esteve abaixo de *sordida* (955 dias) e *vitticeps* (820 dias).

ABSTRACTS: The life cycle of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, is here studied in laboratory conditions, from oviposition until death of adults. The results obtained is compared with those of the others Triatominae reared in some laboratory conditions.

KEYWORDS: *Rhodnius neglectus*, Lent, 1954: evolutive cycle in laboratory.

HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de Triatomíneos. VII — *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:183-188, 1983/84.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COSTA, H. M., COSTA, J. O. & FREITAS, M. G. Alguns aspectos da biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera — Triatominae) em condições de laboratório. II — Influência do acasalamento e da alimentação na oviposição e fertilidade dos ovos. *Arq. Esc. Vet. Univ. Minas Gerais, 19*:107-116, 1967.

2. COSTA, H. M., COSTA, J. O. & FREITAS, M. G. Alguns aspectos da biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera — Triatominae) em condições de laboratório. III — Resistência ao jejum. *Arq. Esc. Vet. Univ. Minas Gerais, 19*:147, 1967.

3. FREITAS, M. G., COSTA, J. O. & COSTA, H. M. Alguns aspectos da biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera — Triatominae) em condições de laboratório. I — Evolução. *Arq. Esc. Vet. Univ. Minas Gerais, 19*:81-87, 1967.

4. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia comparativa de triatomíneos. I — *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835). (Hemiptera, Reduviidae). *Studia Ent., 19*(1-4):201-210, 1976.

5. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia comparativa de triatomíneos. III — *Triatoma sordida* (Stal, 1859). (Hemiptera, Reduviidae). *Studia Ent., 20*(1-4):89-98, 1978.

6. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia comparativa de triatomíneos. IV — *Triatoma vitticeps* Stal, 1835 (Hemiptera, Reduviidae). *Ecossistema, 5*:39-46, 1980.

7. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia comparativa de triatomíneos. II — *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:157-164, 1983/84.

8. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia comparativa de triatomíneos. V — *Triatoma lenti* Scherlock & Serafim, 1967. (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:165-174, 1983/84.

9. LIMA, J. D. & COSTA, H. M. Alguns aspectos da biologia de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, Hemiptera, Triatominae, em condições de laboratório. V — Evolução em temperatura ambiente. *Arq. Esc. Vet. Univ. Minas Gerais, 22*: 151-158, figs. 3, 1970.

Recebido e aceito para publicação em 15/06/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:189-194, 1983/84

NECROSE DE PONTA DE CAUDA EM *EUNECTES NOTAEUS* COPE, 1862 (SERPENTES, BOIDAE, BOINAE)

Tatiana VEINERT *
Hélio Emerson BELLUOMINI **
Hideyo IIZUKA ***
José Daniel Luzes FEDULLO *

RESUMO: No presente trabalho os autores descrevem um caso de necrose de ponta de cauda em sùcuri amarela *Eunectes notaeus*, produzido por *Proteus* e *Alcaligenes*. Pelo antibiograma, verificou-se que os germes eram sensíveis aos antibióticos: Kanamicina, Sisomicina, Sulfazotrin e Novamin. Após a intervenção cirúrgica e devida medicação, a serpente reagiu satisfatoriamente e o comportamento foi recuperado. O animal morreu onze meses após, por causa diversa.

PALAVRAS-CHAVE: Necrose, *Proteus mirabilis* e *Alcaligenes foecalis*, *Eunectes notaeus*, Boidae.

INTRODUÇÃO

As serpentes apresentam com freqüência infecções produzidas por uma série de microrganismos.

Na literatura são relatados alguns casos de infecções na cavidade bucal produzidas por *Proteus* e *Alcaligenes sp.* (Williams e col. [12]).

Ledbetter e Kutscher [6] também chegaram a resultados semelhantes, quando pesquisaram a flora bacteriana do orofaringe e venenos de serpentes norte-americanas.

Parrish e col. [8], também examinando a flora bacteriana de serpentes venenosas dos Estados Unidos, verificaram que o microrganismo mais comumente encontrado era *Proteus vulgaris,* e Camin [3] quando isolou *Proteus hydrophillus*

* Fundação Parque Zoológico de São Paulo.
** FUNDACENTRO.
*** Instituto Butantan.
Endereço para correspondência: Tatiana Veinert — Rua Professor Francisco Maffei, n.º 469 — Interlagos — CEP 04787 — São Paulo — SP.

VEINERT, T., BELLUOMINI, H. E., IIZUKA, H. & FEDULLO, J. D. L. Necrose de ponta de cauda em *Eunectes notaeus* Cope, 1862 (Serpentes, Boidae, Boinae). *Mem. Inst. Butantan*, *47/48*:189-194, 1983/84.

(Sanarelli) verificou ser esse agente etiológico o responsável pelo alto índice de mortalidade de serpentes.

Moreno e col. [7], estudando a flora intestinal de anfíbios e répteis, registraram a elevada predominância de espécies de enterobactérias do gênero *Proteus*.

Dissmann, Veinert e Belluomini (1969) assinalaram necrose de ponta de cauda em *Eunectes murinus*, causada por *Klebsiella sp.* (informação pessoal).

OBSERVAÇÃO

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo recebeu um exemplar macho adulto de *Eunectes notaeus* Cope, 1862 — Sucuri amarela (Serpentes, Boidae, Boinae), procedente do Parque Municipal "Quinzinho de Barros", de Sorocaba, em 17-3-77. O referido animal pesava na ocasião 5.000 g e media 200 cm de comprimento.

Após o período de quarentena, a serpente foi colocada em aquário junto com outras sucuris da espécies *Eunectes murinus murinus*.

A adaptação do animal ao meio foi satisfatória e com a ocorrência de alguns cruzamentos heterólogos (Veinert e Belluomini 1980 [11]).

Apesar de a serpente alimentar-se normalmente, com isso ganhando 4000 g de peso, o crescimento não ocorreu. Esse fato perdurou até que exame mais acurado em 1.º-7-80 evidenciou necrose de ponta de cauda, com exposição de algumas vértebras. (Figs. 1 e 2)

A perda de tecido na porção distal, bem como o agravamento da lesão, determinou a intervenção cirúrgica, em 10-7-80, que consistiu na amputação da porção da cauda que apresentava o processo necrótico.

Na ocasião foi colhido material para isolamento de microrganismos. Enquanto se aguardava o resultado do exame bacteriológico e o antibiograma, a serpente submetida à intervenção cirúrgica foi medicada com Penicilina G sólida cristalina *, um frasco em dias alternados, sete aplicações por via subcutânea.

Colheita de Material

Uma amostra de cerca de 5,0 g do tecido da cauda lesada foi triturada até ficar reduzida a estado pastoso, em gral estéril. Em seguida, foi homogeneizada e emulsionada em 5,0 ml de solução fisiológica, para exame bacterioscópico e cultura [5].

A semeadura do material foi feita, em duplicata, em volume de 0,1 ml em meios básicos de cultura, tioglicolato, Tarozzi, ágar sangue e "cooked meat", incubados a 37°C. Uma parte do material foi aquecida a 80°C, durante quinze minutos, para seleção de germes esporulados.

A leitura das placas foi feita após 24 e 48 horas. As que apresentavam colônias perfeitamente isoladas foram escolhidas para seqüência de obtenção de cultura pura e transferidas para tubos, os quais foram incubados a 37°C durante 48 horas.

* Climacilim pediátrico — Laboratório Climax.

Os esfregaços corados pelo Gram possibilitaram a separação dos bacilos Gram negativos aeróbios, de outros microrganismos. A triagem prévia de germes Gram negativos aeróbios foi realizada empregando-se meios de cultura capazes de fornecer identificação perfunctória [2, 10].

Para identificação bacteriológica foram empregados meios básicos, adicionando diferentes fontes de carbono e provas bioquímicas, através de ensaios de rotina [2, 4, 6].

As amostras isoladas no decorrer do trabalho foram mantidas em meio de Lignières, à temperatura ambiente.

Determinação de sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos

Pelo método da difusão em ágar, de acordo com a técnica de Kirby-Bauer [1], segundo as observações constantes nos trabalhos de Rocha e col. [9] fez-se o antibiograma. Nesta prova utilizaram-se discos impregnados de quimioterápicos (DIFCO) e meio de Müller Hinton (DIFCO).

Os discos empregados tinham os seguintes antibacterianos: Penicilina G, Estreptomicina, Tetraciclina, Eritromicina, Cloranfenicol, Novobiocina, Kanamicina, Colistina, Neomicina, Amoxicilina, Rifomicina, Polimicina B, Oleandomicina, Sisomicina, Ácido nalidíxico, Cefalotina, Staficilin, Hetacilina, Ampicilina, Sulfazotrin, Novamin e Fosfocina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos exames bacteriológicos mostraram a presença de duas espécies distintas de bacilos Gram negativos aeróbios, no foco necrótico amputado da cauda de *Eunectes notaeus:* o *Proteus mirabilis* e o *Alcaligenes foecalis.* Como se sabe, *Proteus mirabilis* é agente potencialmente infeccioso e patogênico, acreditando-se ser o principal responsável pela lesão que ocasionou a necrose.

Apesar do *Alcaligenes foecalis* ser um germe estritamente aeróbio, também considerado germe saprófito, no presente caso, a sua associação ao *Proteus sp.* o qualifica como sendo invasor secundário da infecção necrótica observada em *Eunectes notaeus.* Tendo em vista que este animal apresenta níveis metabólicos diferentes e baixa temperatura corpórea, acreditamos que estas condições explicariam o estabelecimento desta infecção mista.

Confrontando-se os achados aqui relatados com os de outros autores, chama atenção a alta freqüência com que são encontrados os microrganismos do gênero *Proteus.* O resultado obtido nos testes de sensibilidade de microrganismos isolados aos antibióticos e quimioterápicos, encontra-se na Tabela 1. As provas revelaram que as duas amostras isoladas foram sensíveis à Kanamicina, Sisomicina, Sulfazotrin e Novamin; por outro lado, resistentes à Eritromicina, Amoxicilina, Oleandomicina, Cefalotina e Staficilin, respectivamente.

Os resultados com os demais antibacterianos testados foram variáveis, tanto em relação ao grau de sensibilidade, quanto às diferenças de comportamento entre as duas espécies.

Após a intervenção cirúrgica ocorreu a cura do animal. Tendo em vista que o músculo retrator do hemipênis tem sua inserção na cauda, a preocupação

era de haver prejuízo nos futuros cruzamentos. Não obstante, houve a primeira cópula, após o período operatório, em 24-4-81 e a partir dessa data os cruzamentos voltaram a se repetir normalmente. Nessa ocasião a serpente ganhou 3.000 g de peso. Durante onze meses o local da operação manteve-se cicatrizado, havendo recidiva em 1.º-8-81. Apesar da medicação específica utilizada, a morte ocorreu em 25-9-81.

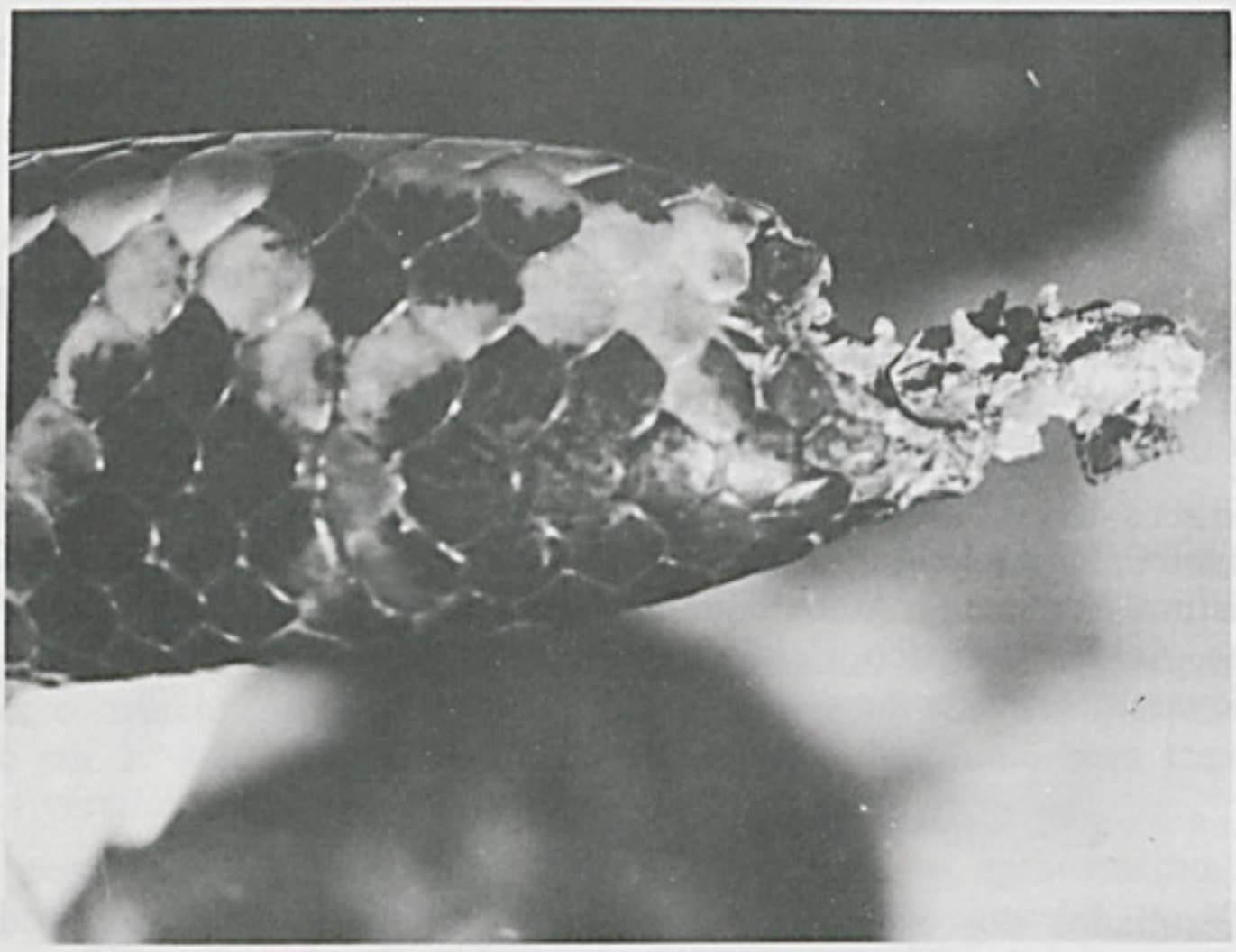


Fig. 1 — Vista lateral de necrose de ponta de cauda com exposição de vértebras.

Fig. 2 — Vista ventral de necrose de ponta de cauda com exposição de vértebras.

VEINERT, T., BELLUOMINI, H. E., IIZUKA, H. & FEDULLO, J. D. L. Necrose de ponta de cauda em *Eunectes notaeus* Cope, 1862 (Serpentes, Boidae, Boinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:189-194, 1983/84.

TABELA 1

Comportamento de *Proteus mirabilis* e *Alcaligenes sp.* frente a quimioterápicos

Drogas	*Proteus mirabilis*	*Alcaligenes sp*	Drogas	*Proteus mirabilis*	*Alcaligenes sp*
Penicilina G	±	−	Polimixina B	−	±
Estreptomicina	±	±	Oleandomicina	−	−
Tetraciclina	+	±	Sisomicina	+	+
Eritromicina	−	−	Ácido nalidíxico	+	±
Cloranfenicol	+	±	Cefalotina	−	−
Novobiocina	±	−	Staficilin	−	−
Kanamicina	+	+	Hetacilina	±	−
Colistina	−	±	Ampicilina	±	−
Neomicina	±	±	Sulfazotrin	+	+
Amoxicilina	−	−	Novamin	+	+
Nitrofurantoina	±	−	Fosfocina	±	−
Rifomicina	−	±			

(−) = Resistente (±) = Moderadamente sensível (+) = Sensível

ABSTRACT: Incidence of necrosis at the tail's extremity of "anaconda" *Eunectes notaeus* has been described. The infection was caused by *Proteus* and *Alcaligenes*. The antibiogram revealed these microorganisms to be sensitive to the following antibiotics: Kanamycin, Sisomycin, Sulfazotrine and Novamine. After surgical intervention an adequate medication was applied; the reaction was satisfactory and the behavior became normal. After a period of eleven months a relapse caused the death of the animal.

KEYWORDS: Necrotic; *Proteus mirabilis; Alcaligenes foecalis; Eunectes notaeus;* Boidae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. & TURCK, M. An antibiotic susceptility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Path., 45*:493-496, 1966.

2. BIER, O. G. Bacteriologia e imunologia e suas aplicações a medicina e à higiene. 18. ed./São Paulo, Melhoramentos, 1977, 1056 p.

3. CAMIN, J. H. Mite transmission of a hemorrhagic septicemia in snakes. *J. Parasitol., 34*:345-354, 1948.

4. EDWARDS, P. R. & ZWING, H. W. Identification of enterobacteriase. Atlanta, Georgia/Burgess Publishing, 1972. 360 p.

5. FURLANETTO, R. S.; BELLUOMINI, H. E.; IIZUKA, H. & ROLIM ROSA, R. Epizootia provocada por um bacilo difteróide em serpentes mantidas em biotério. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), *10*(4):139-143, 1979.

6. LEDBETTER, E. O. & KUTSCHER, A. G. The aerobic and anaerobic flora of rattlesnave fangs and venom. *Archs. Environ. Heth, 19*:770-778, 1969.

VEINERT, T., BELLUOMINI, H. E., IIZUKA, H. & FEDULLO, J. D.'L. Necrose de ponta de cauda em *Eunectes notaeus* Cope, 1862 (Serpentes, Boidae, Boinae). *Mem. Inst. Butantan, 47/48*:189-194, 1983/84.

---

7. MORENO, G.; LOPES, C. A. M.; BELLUOMINI, H. E.; PESSOA, G. V. A.; BIASI, P. & ANDRADE, J. C. R. Enterobacterias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, *15*(3):122-126, 1973.

8. PARRISH, H. M.; MAC LAURIN, A. W. & TURTTLE, R. L. North american pit vipers. Bacterial flora of the mouths and venon glands. *Virginia Med. Monthly, 83*:383-385, 1956.

9. ROCHA, H.; ZULIANI, M. E. & TRABULSI, L. R. Antibiograma. *Rev. Microbiol.*, (São Paulo), *3*:51-60, 1972.

10. RUGAI, E. & ARAUJO, A. Meio de cultura para identificação preventiva de bacilos intestinais Gram-negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz, 28*:79-83, 1968.

11. VEINERT, T. & BELLUOMINI, H. E. Observações do comportamento e da cópula heteróloga de sucuris em cativeiro *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes notaeus* Cope, 1862. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:391-402, 1980/1981.

12. WILLIAMS, F. E.; FREEMAN, M. & KENNEDY, E. The bacterial flora of mouth of Australian venomous snakes in captivity. *Med. J. Australia, 11*: 190-193, 1934.

Recebido para publicação em 15/06/1984 e aceito em 27/07/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:195-204, 1983/84

ESTUDO DA BIOLOGIA DE *AMBLYOMMA ROTUNDATUM* (KOCH, 1844), EM INFESTAÇÕES EXPERIMENTAIS DE *BUFO MARINUS* (L., 1758) SOB CONDIÇÕES VARIADAS DE UMIDADE RELATIVA E DE TEMPERATURA DO AR

Maria Shirley Pizolato OBA *
Teresinha T. Sato SCHUMAKER **

RESUMO: Os autores reestudaram o ciclo evolutivo de *Amblyomma rotundatum* e o obtiveram 188 dias no mínimo e 275 dias no máximo, trabalhando à temperatura e umidade ambientais e 135 dias no mínimo e 250 dias no máximo à temperatura de 27°C e cerca de 80% de umidade relativa. Houve uma correlação positiva entre o peso das fêmeas e o número de ovos postos, quando as condições de temperatura e umidade foram favoráveis. A umidade constitui um fator importante para a eclosão dos ovos. Utilizando como hospedeiro *Bufo marinus*, *A. rotundatum* comportou-se como carrapato de três hospedeiros.

PALAVRAS-CHAVE: *Amblyomma rotundatum;* Ixodidae, Biologia de Ixodidae.

INTRODUÇÃO

A biologia de *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844, carrapato comum no Brasil como parasito de vertebrados de sangue frio, foi parcialmente estudada por ROHR (1909), em exemplares identificados como *A. goeldii* Newman, 1899. Nesse trabalho ROHR (1909) empregou 398 ninfas, obtendo somente fêmeas.

ARAGÃO (1912), após extensos estudos morfobiológicos sobre estes carrapatos, reconheceu-lhe a condição partenogenética, redescrevendo-os como *Amblyomma agamum* n. sp.

A partenogenese foi confirmada por BRUMPT (1924) em experimento para tal fim delineado observando, também, variações quanto ao número de hospedeiros envolvidos no ciclo (dois ou três).

ROBINSON (1926), em sua monografia sobre o gênero *Amblyomma,* colocou *A. agamum* n. sp. como sinonímia de *A. rotundatum,* sumariando os dados sobre biologia, levantados por ARAGÃO (1912).

* Professora Assistente Doutora do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Falecida.

** Professora Assistente do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

ARAGÃO (1936) corrigiu as anteriores confusões em torno da sistemática deste ixodídeo, reconhecendo que a espécie referida como *A. agamum* n. sp. em seus trabalhos, tratava-se na realidade de *A. rotundatum,* esclareceu ainda, ser *A. goeldii* espécie parasita de vertebrados de sangue quente restrita ao norte do Brasil. Resume os dados sobre biologia por ele obtidos em 1912, acrescentando as características morfológicas diferenciais entre as espécies mencionadas sob forma de chave de identificação.

Além do estudo do ciclo biológico da espécie em questão, o presente trabalho tem como objetivos verificar a influência da temperatura e umidade relativa do ar sobre a postura e a eclosão dos ovos, bem como uma possível correlação entre peso da fêmea ingurgitada e número de ovos postos.

MATERIAL E MÉTODOS

Ninfas colhidas em *Waglerophis merremii* foram colocadas para se alimentar em sapo da espécie *Bufo marinus*. Após 13 dias o hospedeiro morreu. As ninfas foram colocadas sobre outro hospedeiro da mesma espécie onde se refixaram. Estes ixodídeos deram origem a 9 fêmeas que uma vez ingurgitadas, foram pesadas e mantidas à temperatura e à umidade relativa ambientais, em frascos de cultura individuais, até a eclosão de seus ovos. Acompanhou-se a evolução dos indivíduos resultantes desses ovos, mantidos sob condições ambientais, tendo sido registrados os tempos máximos e mínimos de fixação, pré-muda e pré-postura.

Com o objetivo de se verificar possíveis influências da temperatura (T) e da umidade relativa do ar (U.R.) sobre período de pré-postura, período de postura-incubação, número de ovos e porcentagens de eclosão, 19 fêmeas (F_0) colhidas em *Bothrops jararaca,* após queda natural, foram pesadas e distribuídas ao acaso em 3 grupos experimentais:

Grupo	N.º de fêmeas	Temp.	U.R.
1	6	ambiental	ambiental
2	7	27°C	cerca de 45%
3	6	27°C	cerca de 80%

Calcularam-se as médias aritméticas (M_0) e os desvios-padrões dos ovos postos por fêmeas mantidas em cada uma das condições experimentais. Foram também determinados os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os pesos destas fêmeas ingurgitadas e o número de ovos postos. Fixou-se em 5% o nível de rejeição da hipótese da nulidade.

Registraram-se dados individuais sobre período de pré-muda e de fixação para todos estádios evolutivos de (F_1), indivíduos originários de (F_0), os quais foram mantidos a 27°C e cerca de 80% U.R. do ar. Utilizou-se também *B. marinus* como hospedeiro.

Com a finalidade de ampliar os estudos, especialmente aqueles referentes ao coeficiente de correlação de Pearson (r), acompanhou-se a evolução de 20 fêmeas F_1 mantidas na condição experimental acima citada.

Tendo como base os dados tanto para F_0 quanto para F_1 calculou-se a amplitude do ciclo biológico dos exemplares mantidos a 27°C e cerca de 80% de U.R. Estimou-se também a amplitude do ciclo biológico dos exemplares colhidos em *W. merremii,* mantidos sob condições ambientais. Os tempos de fixação empregados foram os mesmos, para as duas situações (por ocorrer este fenômeno sempre sob condições ambientais). Estabeleceu-se uma média de 4 dias para o período de pré-fixação dos três estádios evolutivos.

Os dados sobre temperatura e umidade relativa do ar foram fornecidos pelo Centro Tecnológico de Hidráulica (C.T.H.) do Departamento de Águas e Energia Elétrica (D.A.E.E.) — Estação Hidrometeorológica da Cidade Universitária de São Paulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sob as condições do presente trabalho *A. rotundatum* comportou-se invariavelmente como carrapato partenogenético, incluindo três hospedeiros em seu ciclo biológico. Entretanto ARAGÃO (1912) e BRUMPT (1924) observaram que esta espécie pode se comportar tanto como carrapato de três, quanto de dois hospedeiros. Os dados obtidos por esses autores revelaram que esta variação não pode ser atribuída ao emprego de diferentes espécies de hospedeiros, nem as características das populações de carrapatos ou mesmo às influências dos fatores ambientais. Para BRUMPT (1924) o modo de evolução desta espécie ainda não está fixado: *A. rotundatum* pode estar sofrendo uma evolução no sentido de reduzir o número de hospedeiro ou, ao contrário, aumentando o número de hospedeiros em seu ciclo.

A literatura consultada registra com freqüência a morte dos hospedeiros, tal como se observou neste experimento. ARAGÃO (1912) e BRUMPT (1924) atribuíram este fato à inoculação de toxinas pela espécie ora estudada. Ainda mais, BRUMPT (1924) interpretou o fenômeno da refixação das ninfas em outro hospedeiro, observada também neste trabalho, como uma adaptação à morte repentina do hospedeiro inicial, conseqüente à inoculação de tal toxina.

As médias mensais e anuais da Temperatura (°C) e da Umidade relativa do ar (%) registradas no ano de 1979 estão contidas na Tabela 1.

As fêmeas originárias de ninfas recolhidas de *W. merremii,* sob condições ambientais dos meses de fevereiro, março e abril, apresentaram posturas com baixas porcentagens de eclosão variando entre 0,03 e 1,39%. Os períodos de pré-postura e postura-incubação variaram respectivamente nos intervalos de 7 a 17 dias e 67 a 68 dias (Tabela 2).

As fêmeas F_0, colhidas em *B. jararaca,* mantidas sob condições ambientais dos meses de abril, maio e junho, apresentaram período de pré-postura variando entre 15 e 30 dias e não ocorreu eclosão dos ovos (Tabela 3), esperada para os meses de maio e junho. Para aquelas F_0 mantidas a 27°C e cerca de 45% de U.R. registrou-se um período de pré-postura entre 7 e 13 dias e porcentagens de eclosão entre 0,09 e 0,38% (Tabela 3). Fêmeas F_0 mantidas a 27°C e cerca de 80% de U.R. apresentaram período de pré-postura entre 3 e 13 dias, período de postura-incubação entre 40 e 41 dias e porcentagens de eclosão entre 35,48% e 72,46% (Tabela 3). As fêmeas F_1 mantidas também a 27°C e cerca de 80% de U.R. apresentaram a duração do período de pré-postura entre

3 e 13 dias, período de postura-incubação entre 39 e 48 dias e porcentagens de eclosão entre 51,3% e 93,0% (Tabela 4). Os dados obtidos sugerem ter sido a temperatura fator atuante sobre a duração dos períodos de pré-postura e postura — incubação (Tabelas 2, 3 e 4). O período de pré-postura apresentou-se mais prolongado na população mantida sob condições ambientais (Tabela 1) em relação àquelas submetidas à temperatura constante e superior (27°C). A U.R. parece não influir sobre a duração do período de pré-postura (Tabelas 3 e 4). Entretanto, este fator mostrou-se essencial para a evolução dos ovos, conforme indicam os dados obtidos nos experimentos conduzidos à temperatura constante de 27°C e diferentes condições de U.R. (Tabela 3). Assim, observou-se que nos experimentos mantidos a 27°C e cerca de 80% U.R. ocorreram as maiores porcentagens de eclosão (Tabelas 3 e 4).

A Tabela 5 registra os tempos de fixação e pré-muda de indivíduos de F_1 dos diferentes estádios evolutivos, mantidos a 27°C e cerca de 80% de U.R. As larvas desprenderam-se do hospedeiro entre 27.° e 38.° dias, com maior freqüência de queda ocorrendo no 34.° dia. As quedas das ninfas se verificaram entre o 18.° e o 43.° dia de fixação, enquanto que as fêmeas se desprenderam entre o 15.° e o 44.° dia. Nestes dois últimos estádios não se pode reconhecer os tempos em que ocorreram as maiores freqüências de queda. Verificou-se portanto, uma grande variação nos tempos de fixação de *A. rotundatum* sobre seu hospedeiro, em qualquer um dos estádios evolutivos, fato possivelmente relacionado com as condições de irrigação do sítio de fixação.

A temperatura reduziu também os períodos de pré-muda dos diferentes estádios evolutivos, resultando em ciclos de menores durações para as populações submetidas à temperatura elevada e constante de 27°C (Tabelas 5 e 6). Foram registrados ciclos biológicos de fêmeas mantidas a 27°C e cerca de 80% de U.R. com duração entre 135 e 250 dias. Sob condições ambientais os exemplares apresentaram ciclos com durações entre 188 e 275 dias. ARAGÃO (1912) registrou ciclos com durações entre 3 e 5 meses sob condições ambientais não registradas e empregou diferentes espécies de hospedeiros para os diferentes estádios evolutivos. O emprego de diferentes espécies de hospedeiros é justificado pelo referido autor pelo sucesso com que obteve criações de *A. rotundatum* sobre vários gêneros de animais de sangue frio *(Bufos, Eunectes, Tejus* etc. . .), não explicitando nenhuma forma de alteração do padrão biológico destes carrapatos.

Durante os experimentos foram obtidos pesos de fêmeas adultas, tomados antes do repasto, que variavam entre 4 mg e 14 mg tendo em média 10 mg. resultados compatíveis com aqueles obtidos por BRUMPT (1924). Este autor registrou pesos tomados após alimentação variando entre 750 e 900 mg. No presente trabalho foram constatadas fêmeas cujos pesos oscilaram entre 165 e 1187 mg (Tabelas 2, 3 e 4). Mesmo fêmeas de baixo peso (165 mg) apresentaram capacidade de postura, com ovos viáveis.

As fêmeas mantidas sob condições ambientais apresentaram uma média de ovos entre 1041,70 ± 965,7 (Tabela 3) e 2396,65 ± 774,79 (Tabela 2). Fêmeas mantidas a 27°C e cerca de 45% de U.R. apresentaram uma média de ovos de 2205, 71 ± 1456,87 (Tabela 3) enquanto que aquelas submetidas a 27°C e cerca de 80% de U.R. apresentaram 3701,5 ± 1416,07 (Tabela 3) e 3272,75 ± 551,69 (Tabela 4). Conforme resultados obtidos, as médias de número de ovos por fêmea foram nitidamente superiores para aquelas mantidas a 27°C e cerca de 80% de U.R.

Somente fêmeas mantidas a 27°C e cerca de 80% de U.R. apresentaram coeficientes de correlação positivos entre pesos e número de ovos postos, com valores estatisticamente significantes; r=0,9610 (Tabela 3) e r=0,9756 (Tabela 4). Para as fêmeas submetidas às demais condições experimentais não foi possível demonstrar tal correlação (Tabela 2 e 3).

TABELA 1

Médias mensais e anuais da Temperatura (°C) e da umidade relativa do ar (%) registradas em 1979. Cidade Universitária de São Paulo.

Mês	T (°C) — Média das			U.R. (%) — Média das		
	Máx.	Min.	Méd.	Máx.	Min.	Méd.
Janeiro	24,2	16,3	20,3	91	62	76
Fevereiro	27,4	18,2	22,8	91	60	76
Março	25,9	16,9	21,4	91	57	74
Abril	24,1	15,3	19,7	93	57	75
Maio	22,5	14,0	18,3	92	60	76
Junho	21,3	11,3	16,3	93	54	74
Julho	20,9	10,5	15,7	91	51	71
Agosto	23,8	13,5	18,6	94	54	74
Setembro	21,8	13,1	17,4	93	60	77
Outubro	25,7	16,5	21,1	93	59	76
Novembro	24,7	15,6	20,1	92	61	77
Dezembro	26,2	18,1	22,2	96	66	81
Média	24,0	14,9	19,5	92	58	75
Maior	27,4	18,2	22,8	96	66	81
Menor	20,9	10,5	15,7	91	51	71

TABELA 2

A. rotundatum segundo peso da fêmea ingurgitada, período de pré-postura, período de postura — incubação e porcentagem de eclosão, sob condição de temperatura e umidade relativa ambientais. São Paulo, 1979.

Peso da fêmea (mg)	% de eclosão	Período de postura incubação (dias)	Total de ovos postos	N.º de larvas	Período de pré-postura (dias)
340	13	—	1.096	0	—
580	13	67	1.963	5	0,25
637	11	68	2.508	35	1,39
670	8	68	2.507	4	0,15
670	14	—	1.160	0	—
690	13	67	2.399	6	0,25
770	7	—	3.447	0	—
800	10	—	2.638	1	0,03
800	17	67	2.852	23	0,80

M_o = média do número de ovos por fêmea = 2396,65 ± 774,79.

r = coeficiente de correlação entre o peso da fêmea ingurgitada e o número de ovos postos = 0,3339.

TABELA 3

A. rotundatum (F_o) segundo peso da fêmea ingurgitada, período de pré-postura, período de postura-incubação, porcentagem de eclosão, sob diferentes condições experimentais; São Paulo, 1979

Condição da cultura	Peso da fêmea (mg)	Período de pré-postura (dias)	Período de postura incubação (dias)	Total ovos postos	N.º de larvas	% de eclosão
T = 27°C UR = ± 80%	460	15 a 30	—	1.163	—	—
	570		—	1.747	—	—
	720		—	2.453	—	—
	870			866	—	—
	987		—	12	—	—
	1.173		—	9	—	—
M_o = 1.041,7 ± 965,6 ovos					r =	— 0,7058
UR = ± 45% T = 27°C	320	7 a 13	N.D.	1.005	1	0,09
	492		N.D.	1.638	2	0,12
	640		—	2.426	—	—
	840		N.D.	780	3	0,38
	913		—	4.165	—	—
	994		—	4.219	—	—
	1.187			1.207	—	—
M_o = 2.205,71 ± 1.456,87 ovos						r = 0,3354
Te UR ambientes	451	3 a 13	41	1.629	578	35,48
	525		40	2.276	1.086	47,72
	771		40	4.160	2.132	51,25
	827		40	4.214	1.529	36,28
	918		41	4.836	3.504	72,46
	1.110		40	5.094	2.179	40,81
M_o = 3.701,5 ± 1.416,07 ovos						r* = 0,9610

r* = significante
N.D. = não determinado

TABELA 4

A. rotundatum (F_2) segundo peso da fêmea ingurgitada, período de pré-postura, período de postura-incubação e porcentagem de eclosão à temperatura de 27°C e cerca de 80% de U.R., São Paulo, 1979

Condição da cultura	Peso da fêmea (mg)	Período de pré-postura (dias)	Período de postura-incubação (dias)	Total ovos postos	N.º de larvas	% de eclosão
TEMPERATURA = 27°C U.R. = 80%	165	9	42	548	399	72,9
	166	13	39	269	153	56,8
	193	9	42	705	617	87,5
	324	9	41	903	595	65,9
	490	5	42	2.113	1.888	89,4
	536	7	39	3.156	1.619	51,3
	630	6	42	2.348	1.115	47,8
	662	7	42	3.156	2.361	74,9
	687	4	42	3.034	2.811	92,6
	704	4	40	3.037	2.825	93,0
	735	7	42	3.154	1.651	52,3
	757	6	45	3.866	2.961	76,5
	818	5	47	3.040	2.552	83,9
	873	8	42	3.831	3.334	87,0
	888	3	42	4.723	3.985	84,3
	933	3	41	5.021	4.338	86,3
	1.060	6	42	4.913	3.510	71,4
	1.068	6	42	5.870	4.914	83,7
	1.113	4	48	6.233	5.651	90,6
	1.152	5	40	5.535	4.202	75,9

$M_o = 3272,75 \pm 551,69$ $r^* = 0,9756$

OBA, M. S. P. & SCHUMAKER, T. T. S. Estudo da biologia de *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844), em infestações experimentais de *Bufo marinus* (L., 1758) sob condições variadas de umidade relativa e de temperatura do ar. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*: 195-204, 1983/84.

TABELA 5

A. rotundatum (F_2) segundo estádio evolutivo, tempo de fixação, período de pré-muda e freqüência, à temperatura de 27°C e cerca de 80% de U.R.; São Paulo, 1979

Estádio evolutivo	Tempo de fixação (dias)	Freqüência	Período de pré-muda (dias)	Freqüência
LARVAS	27	2	11	2
	28	1	12	12
	29	3	13	12
	30	2	14	17
	31	6	15	14
	34	15	16	3
	35	11	17	—
	36	5	18	—
	37	9	19	1
	38	7		
	Total	61	Total	61
NINFAS	18	1	10	1
	25	3	14	3
	26	2	15	4
	27	1	16	3
	32	2	17	2
	33	3	18	2
	34	3	19	4
	35	1	25	2
	36	3	26	3
	38	2	28	1
	41	1		
	48	1		
	Total	25	Total	25
ADULTOS	15	1		
	16	1		
	22	1		
	26	3		
	31	1		
	32	4		
	33	3		
	34	3		
	36	2		
	37	1		
	39	5		
	40	1		
	41	3		
	42	1		
	43	1		
	44	4		
	Total	35		

OBA, M. S. P. & SCHUMAKER, T. T. S. Estudo da biologia de *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844), em infestações experimentais de *Bufo marinus* (L., 1758) sob condições variadas de umidade relativa e de temperatura do ar. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*: 195-204, 1983/84.

TABELA 6

Durações dos períodos do ciclo de vida de *A. rotundatum* à temperatura de 27°C e cerca de 80% de U.R.; São Paulo, 1979

Condição / *A. rotundatum*		Amplitude (dias)		T. e U.R. ambientes		T = 27°C e U.R. = 80%	
Estádio	Período	min.	máx.	min.	máx.		
ovo	postura incubação	67	68	39	48		
larva	prefixação	4	4	4	4		
	fixação	27	38	27	38		
	pré-muda	13	31	11	19		
ninfa	prefixação	4	4	4	4		
	fixação	18	48	18	48		
	pré-muda	25	28	10	28		
adulta	prefixação	4	4	4	4		
	pré-postura	15	43	15	44		
	fixação	8	17	3	13		
TOTAL		188	275	135	250		

CONCLUSÕES

1. Tal como ARAGÃO (1912) e BRUMPT (1924), verificou-se que em *A. rotundatum* os exemplares com repasto incompleto tendem a refixar-se no mesmo ou outro indivíduo da espécie hospedeira *B. marinus*.

2. Exemplares de *A. rotundatum* mantidos a 27°C tiveram os períodos de pré-postura e postura-incubação reduzidos em relação aos espécimes mantidos sob temperatura ambiente (T média = 19,5°C).

3. A umidade mostrou-se um fator importante para a eclosão dos ovos de *A. rotundatum*.

4. Quando são favoráveis as condições de temperatura e de umidade relativa há correlação positiva entre peso das fêmeas e número de ovos produzidos.

5. O tempo para um ciclo biológico de *A. rotundatum* foi de no mínimo 188 dias e de 275 no máximo para populações mantidas à temperatura e à umidade relativa ambientes. Variou entre 135 e 250 dias para os exemplares mantidos a 27°C e cerca de 80% de U.R. Estes dados foram obtidos a partir de exemplares não-submetidos a períodos de jejum o que poderia ampliar a duração do ciclo.

OBA, M. S. P. & SCHUMAKER, T. T. S. Estudo da biologia de *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844), em infestações experimentais de *Bufo marinus* (L., 1758) sob condições variadas de umidade relativa e de temperatura do ar. *Mem. Inst. Butantan, 47/48*: 195-204, 1983/84.

ABSTRACTS: The authors studied the life cycle of *A. rotundatum* which took from 188 to 275 days to be completed, at ambient laboratory temperature and relative air humidity. On the other hand when kept at constant temperature and air humidity-respectively 27°C and 80% — the length of the cycle went down to time limits of 135 and 250 days. A positive correlation was found between the initial weight of tick females and the number of eggs they produced under favorable conditions of temperature and of air humidity. Relative air humidity was a very relevant factor in egg embryonations and eclosion. *Bufo marinus* proved to be a good host for *A. rotundatum*, which behaved inquestionably as a "three host tick".

KEYWORD: *Amblyomma rotundatum*. Ixodidae. Biology of Ixodidae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, H. B. Contribuição para a sistemática e biologia dos ixodidas. Partenogenese em carrapatos. *Amblyomma agamum* n. sp. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 4*(1) :96-119, 1912.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 31*(4) :759-843, 1936.

BRUMPT, E. Particularités évolutives de l'*Amblyomma agamum*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 2*(2) :113-20, 3 figs., 1924.

ROBINSON, L. E. The genus *Amblyomma*. In: NUTTAL, G. H. F.; WARBURTON, C.; ROBINSON, L. E. *Ticks. A monograph the Ixodoidea*. London, Cambridge Univ. Press., 1926. v.4.

ROHR, C. J. *Estudos sobre ixodídas do Brasil*. Trabalhos do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, GOMES & IRMÃOS, 219p., 1909.

Recebido para publicação em 29/06/1984 e aceito em 10/10/1984.

Mem. Inst. Butantan
47/48:205-216, 1983/84

LISTA REMISSIVA DOS TRABALHOS PUBLICADOS NAS MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN, *39-46*, 1975/82

ANATÒMIA PATOLÓGICA

817. BARTKEVITCH, M. A. C.; MÜLLER, H. & MARIGO, C. Importância da constituição anatômica da ponta do ventrículo esquerdo na patologia dessa região nas miocardiopatias no Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 39*:207-215, 1975.

818. BELLUOMINI, H. E.; DINIZ, L. S. M. & SALIBA, A. M. Findings of pathological anatomy in mammals from the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" 1971. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:133-152, 1980/81.

819. BELLUOMINI, H. E.; SALIBA, A. M. & ABE, A. S. Inquérito anátomo-patológico em serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:123-128, 1976/77.

820. DENARO, L.; LANGLADA, F. G.; MACHADO, J. C.; ESTEVES, M. I.; ABRÃO, A. & CAPPELANO, R. S. L. Blastic transformation and cytogenetic studies of peripheral blood lymphocytes from lymphosarcomatus patients, after stimulation by phytohemagglutinin. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:71-76, 1978/79.

821. DENARO, L.; MACHADO, J. L. & MARTINS, Y. R. Changes in chromosome structure observed in patient with concomitant Hodgkin's diseases and measles. *Mem. Inst. Butantan, 39*:225-231, 1975.

822. DENARO-MACHADO, L.; MACHADO, J. C.; AMARAL, A. G.; ESTEVES, M. I.; BIANCHI, A. & D'ANDREA, M. L. Absence of E — Rosette — Positive cases in a series of 17 children with acute lymphoid leukemia from São Paulo, Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:119-126, 1980/81.

823. LANGLADA, F. G.; MORAES JR., R. L.; DENARO, L. & MACHADO, J. C. Nota prévia; sobre a possibilidade de um acúmulo linfóide encontrado em antro cloacal de serpentes, corresponder à Bursa de Fabricius das aves. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:367-371, 1978/79.

824. MACHADO, J. C.; CARDOSO, J. L. C. & DONOSO, N. Lesões necrótico-degenerativas das glândulas sudoríparas como componente peculiar das lesões cutâneas histopatológicas observadas em casos de loxoscelismo humano acidental. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:21-26, 1978/79.

825. MACHADO, J. C.; CARNEIRO, S. M. & VIANNA, S. R. Moléstia de Hodgkin; relato de caso com possível início neonatal. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:27-32, 1978/79.

A lista correspondente aos volumes 1-33 foi publicada no v. 34 e a lista referente aos volumes 34-38, foi publicada no v. 39.

826. MACHADO, J. C. & DENARO, L. Relato e considerações sobre a presença de células de Warthin — Finkeldey em paciente portador de moléstia de Hodgkin em atividade. *Mem. Inst. Butantan, 39*:217-223, 1975.

827. MACHADO, J. C.; GASPARINI, A. L. C. & MACHADO, T. C. Neoformação de linfonodos e aspectos morfológicos confundíveis com a assim chamada degeneração gordurosa ou lipomatose dessas estruturas. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:127-131, 1980/81.

828. MACHADO, J. C. & GIANNOTTI F.º, O. Adenopatia angio-imunoblástica. Apresentação de três casos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:65-70, 1978/79.

829. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R. S. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *B. Jararaca*. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:345-355, 1978/79.

ARACNÍDEOS E ARTRÓPODES
BIOLOGIA

830. EICKSTEDT, V. R. D. VON. Aranhas coletadas nas grutas calcárias de Iporanga, São Paulo, Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 39*:61-71, 1975.

831. PIMONT, R. P. & LUCAS, S. Estudo de série de recursos audiovisuais sobre o tema: artrópodes peçonhentos. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:187-203, 1976/77.

ARACNÍDEOS E ARTRÓPODES
SISTEMÁTICA

832. CEKALOVIC, K. T. Estado actual de la coleccion arachnologica del Museo de Zoologia de la Universidad de Concepción (M.Z.U.C.), parte scorpiones. *Mem. Inst. Butantan, 46*:187-192, 1982.

830. EICKSTEDT, V. R. D. VON. Aranhas coletadas nas grutas calcárias de Iporanga, São Paulo, Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 39*:61-71, 1975.

833. EICKSTEDT, V. R. D. VON. Aranhas do gênero *Ctenus* coletada na foz do rio Culuene, Xingu; descrição de uma espécie nova e redescrição de *Ctenus Villasboasi* Mello-Leitão (Araneae; Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*: 161-169, 1980/81.

834. EICKSTEDT, V. R. D. VON. Estudo sistemático de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria keyserlingi* (Pickard-Cambridge, 1897) *(Araneae; Labidognatha; Ctenidae). Mem. Inst. Butantan, 42/43*:95-126, 1978/79.

835. EICKSTEDT, V. R. D. VON. Estudo sobre a sistemática de *Ctenus taeniatus*. (Araneae; Labidognatha). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:211-219, 1976/77.

836. EICKSTEDT, V. R. D. VON. Redescrição dos tipos de *Ctenus similis, Ctenus minor* (Araneae, Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:171-179, 1980/81.

837. LIZASO, N. M. Ácaros ectoparasitas de serpentes. Descrição de *Ophioptes longipilis*, sp. n. e *Ophioptes brevipilis*, sp. n. (Trombidiformes, Ophiptidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:377-381, 1980/81.

838. LIZASO, N. M. Ácaros pilícolas do Brasil *(Acarina: Listrophoridae). Mem. Inst. Butantan, 39*:73-77, 1975.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

---

839. LIZASO, N. M. Ácaros pilícolas do Brasil. II. Descrição de *Prolistrophorus inornatus*. sp. n. (Acarina: Listrophoridae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*: 205-210, 1976/77.

840. LIZASO, N. M. Um novo ácaro da família Heterozerconidae coletado sobre serpentes brasileiras. Descrição de *Heterozercon elegans*. sp. n. (Acarina: Mesostigmata). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:139-144, 1978/79.

841. LOURENÇO, W. R. Compléments à la description du scorpion brésilien *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932. (Scorpiones; Scorpionidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:425-438, 1980/81.

842. LOURENÇO, W. R. EICKSTEDT, V. R. D. VON. A propósito da indicação de um neotipo para *Tityus serrulatus* Lutz e Melo, 1922. (Scorpiones, Buthidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:181-190, 1980/81.

843. LUCAS, S. Descrição de gênero e espécie novos da subfamília Theraphosinae (Araneae, Orthognatha, Theraphosidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*: 157-160, 1980/81.

844. LUCAS, S. Sobre a distribuição geográfica dos gêneros da subfamília Theraphosinae Thorell, 1870 no Brasil (Araneae, Theraphosidae). *Mem. Inst. Butantan, 46*:339-352, 1982.

845. LUCAS, S. Sobre a posição sistemática de *Trasyphoberus parvitarsis* Simon, 1903. (Araneae, Theraphosidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:153-156, 1980/81.

846. LUCAS, S.; CIRELLI, A.; KNYSAK, I. & ZVEIBIL, L. Aracnídeos coletados no Piauí durante a realização do "Projeto Rondon XXII". *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:127-138, 1978/79.

847. LUCAS, S. M.; CIRELLI, A.; KNYSAK, I. & ZVEIBIL, L. F. Descrição do macho de *Acanthoscurria juruenicola* Mello-Leitão, 1923 (Araneae — Theraphosidae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:151-158, 1978/79.

831. PIMONT, R. P. & LUCAS, S. Estudo de série de recursos audiovisuais sobre o tema; artrópodes peçonhentos. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:187-203, 1976/77.

BIBLIOGRAFIA — TRABALHOS

848. AMARAL, A. DO. Afrânio do Amaral — Bibliografia de seus trabalhos. *Mem. Inst. Butantan, 39*:11-25, 1975.

BIOGRAFIA

849. FALCÃO, E. C. Breve notícia sobre a vida científica de Afrânio do Amaral. *Mem. Inst. Butantan, 39*:3-9, 1975.

850. SOERENSEN, B. A carreira científica da Dr.ª Jandyra Planet do Amaral. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:1-7, 1978/79.

EDUCAÇÃO

831. PIMONT, R. P. & LUCAS, S. Estudo de série de recursos audiovisuais sobre o tema: artrópodes peçonhentos. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:187-203, 1976/77.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

ENTOMOLOGIA MÉDICA

851. HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia dos Triatomíneos. O surgimento de adultos nas colônias dê *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835). (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:343-353, 1980/81.

852. MORAES, R. H. P. & TRAVASSOS FILHO, L. P. Contribuição para o conhecimento das lagartas urticantes. I. *Cerodirphia avenata arayuensis.* Lemaire, 1971. (Lep. Attacidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:367-376, 1980/81.

941. VEIGA, R. M. O.; BORBA, H. L.; TRAVASSOS F.º, L. P. & DOBBIN Jr., J. E. Contribuição para o conhecimento dos Triatominae — Hemiptera, Reduviidae. I. *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:355-365, 1980/81.

ENVENENAMENTO ARACNÍDICO

824. MACHADO, J. C.; CARDOSO, J. L. C. & DONOSO, N. Lesões necrótico degenerativas das glândulas sudoríparas como componente peculiar das lesões cutâneas histopatológicas observadas em casos de loxoscelismo humano acidental. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:21-26, 1978/79.

853. MACHADO, J. C. & SILVEIRA FILHO, J. F. da. Indução de pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico de *T. Serrulatus. Mem. Inst. Butantan, 40/41*:1-9, 1976/77.

854. MARCHIORI, P. E.; SCAFF, M.; NÓBREGA, J. P. S.; ROSENBERG, S. & ASSIS, J. L. Acute necrotic myelopatia after spider bite. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:213-218, 1980/81.

855. TORRES, J. B. & CARLOTTO, P. R. Levantamento dos gêneros de ofídios e espécies de aracnídeos causadores de acidentes na casuística do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. (Período compreendido entre 1977 a agosto de 1981). *Mem. Inst. Butantan, 46*:207-218, 1982.

856. VIEIRA, E. G. J.; SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ÁVILA, S. C. & ROLIM ROSA, R. Emprego de camundongos na titulação de venenos e antivenenos escorpiônicos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:299-306, 1980/81.

ENVENENAMENTO OFÍDICO

857. HAAD, J. S. Accidents humanos por las serpientes de los gêneros *Bothrops y Lachesis. Mem. Inst. Butantan, 44/45*:403-423, 1980/81.

858. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H. M. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:271-279, 1980/81.

859. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & GUIDOLIM, R. Evidenciação em camundongos da soro-neutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:337-344, 1978/79.

860. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & VIEIRA, E. G. J. Perspectivas de padronização das titulações de venenos e antivenenos elapídicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:289-297, 1980/81.

861. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R. S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-323, 1978/79.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

---

862. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & DE LORENZO, J. L. Possibilidade da determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta-muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:281-288, 1980/81.

855. TORRES, J. B. & CARLOTTO, P. R. Levantamento dos gêneros de ofídios e espécies de aracnídeos causadores de acidentes na casuística do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. (Período compreendido entre 1977 a agosto de 1981). *Mem. Inst. Butantan, 46*:207-218, 1982.

863. VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D. & PELLEGRINI FILHO, A. Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée por le venin de *Micrurus frontalis*. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:221-240, 1976/77.

GENÉTICA

864. CARNEIRO, S. M. Observations on the germ ceil ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus (Amphibia: Anura)*. *Mem. Inst. Butantan, 39*:135-148, 1975.

821. DENARO, L.; MACHADO, J. C. & MARTINS, Y. R. Changes in chromosome structure observed in patient with concomitant Hodgkin's disease and measles. *Mem. Inst. Butantan, 39*:225-231, 1975.

865. GARCIA RUIZ, I. R. & BEÇAK, W. G — and C — bands in human chromosomes treated with snake venom. *Mem. Inst. Butantan, 39*:123-133, 1975.

HISTÓRIA

866. BRYGOO, E. R. La découverte de la sórotherapie antivenimeuse em 1894. Phisalix, Bertrand ou Calmette? *Mem. Inst. Butantan, 46*:59-77, 1982.

867. SOERENSEN, B. A erradicação da varíola no mundo. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:11-20, 1978/79.

IMUNOLOGIA

868. CALAZANS, S. C. & FURLANETTO, R. Aperfeiçoamento do processo de hiperimunização antitetânica visando à obtenção de antitoxina de alta dosagem. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:325-334, 1980/81.

869. FURUTA, J. A.; LIBERMAN, C.; ROLIM ROSA, R.; OLIVEIRA, E. P. T.; LEINZ, F. F. & IIZUKA, H. Relações entre o emprego de anatoxina diftérica bruta e o teste de Schick em cavalos hiperimunizados. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:335-341, 1980/81.

870. SOERENSEN, B.; YARID, M. J. F.; ZEZZA NETO, L. & MACHADO, J. C. Pseudotuberculose em camundongos. Isolamento de *Corynebacterium Kutscheri* da cavidade oral e da pele de animais doentes e aparentemente sãos. *Mem. Inst. Butantan, 39*:233-238, 1975.

IMUNOLOGIA
SOROS

871. BIASI, P. de; HYAKUTAKE, S.; BELLUOMINI, H. E. & SANTA ROSA, C. A. Contribuição ao estudo epidemiológico das leptospiroses em serpentes do Brasil: I — Levantamento sorológico em *Bothrops pradoi* Hoge, 1948. (Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:173-180, 1976/77.

866. BRYGOO, E. R. La découverte de la sérotherapie antivenimeuse en 1894. Phisalix, Bertrand ou Calmette? *Mem. Inst. Butantan, 46*:59-77, 1982.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

---

872. HIGASHI, H. G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E. P. T. & SILVA, M. A. da. Preparação do soro antibotulínico tipo B, pela hiperimunização de cavalos, no Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:77-85, 1978/79.

873. OLIVEIRA, E. P. T.; IIZUKA, H.; HIGASHI, H. G.; SILVA, M. A. & ROLIM ROSA, R. Emprego simultâneo de antígenos botulínicos tipos A e B, em um mesmo animal, para obtenção de antitoxina bivalente. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:307-315, 1980/81.

874. ROLIM ROSA, R.; BELLUOMINI, H. E.; SILES VILLARROEL, M. & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:245-251, 1980/81.

875. ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M.; VIEIRA, E. G. J.; IIZUKA, H. & NAVAS, J. Produção de soro antiaracnídeo polivalente mediante inoculações simultâneas de venenos em um mesmo animal. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:253-258, 1980/81.

876. ROLIM ROSA, R.; VIEIRA, E. G. J.; SILES VILLARROEL, M.; SIRACUSA, Y. Q. & IIZUKA, H. Análise comparativa entre os diferentes esquemas de hiperimunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957-1979). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:259-270, 1980/81.

877. SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R. S.; ZELANTE, F. & ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. III. Análise dos componentes antigênicos comuns através da dupla difusão em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:241-250, 1976/77.

858. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H. M. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:271-279, 1980/81.

878. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & FURLANETTO, R. S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:325-336, 1978/79.

859. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & GUIDOLIM, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:337-344, 1978/79.

860. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & VIEIRA, E. G. J. Perspectivas de padronização das titulações de venenos e antivenenos elapídicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:289-297, 1980/81.

829. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R. S. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *B. Jararaca. Mem. Inst. Butantan, 42/43*:345-355, 1978/79.

862. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & DE LORENZO, J. L. Possibilidade da determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:281-288, 1980/81.

867. SOERENSEN, B. A erradicação da varíola no mundo. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:11-20, 1978/79.

856. VIEIRA, E. G. J.; SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ÁVILA, S. C. & ROLIM ROSA, R. Emprego de camundongos na titulação de venenos e antivenenos escorpiônicos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:299-306, 1980/81.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

INSTITUTO BUTANTAN — HISTÓRIA

879. MACHADO, J. C. 1981. Ano do 80.º aniversário do Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:3-10, 1980/81.

880. OLIVEIRA, J. L. Cronologia do Instituto Butantan (1888-1981) 1.ª parte: 1888-1945. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:11-79, 1980/81.

INVERTEBRADOS MARINHOS BRASILEIROS

881. KELECOM, A. & CAVA, A. M. S. Studies of Brazilian marine invertebrates. IX. Comparative study of Zoanthid sterols. I. The Genus *Zoanthus*. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:451-462, 1980/81.

MAMÍFEROS
RESGATE DE FAUNA

882. BELLUOMINI, H. E. & AUTUORI, M. P. Methodology applied in the elaboration of faunal savage in the region of "Agua Vermelha" hydro-electric power plant. Centrais Energéticas de São Paulo — CESP. *Mem. Inst. Butantan, 46*:119-138, 1982.

883. BELLUOMINI, H. E.; CEMBRANELLI, E. L. & AUTUORI, M. P. Wildlife rescue, capture of snakes and establishment of antiophidic stations in flooded areas destined for Brazilian hydroelectric power plants. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:129-154, 1976/77.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

884. BRUNNER Jr., A.; COIRO, J. R. R.; MITSUTANI, C. Y.; SANTOS, M. A. S. C. & MENEZES, H. Ultrastructural aspects of mature. *Cyprinus carpio erythrocytes. Mem. Inst. Butantan, 39*:157-168, 1975.

885. COIRO, J. R. R. Comparative study on the structure of the elements of the avian and mammalian erythrocytes series. Correlation with hemoglobin biosynthesis. *Mem. Inst. Butantan, 39*:169-206, 1975.

886. COIRO, J. R. R. & BRUNNER Jr., A. Chromatin extrusion mechanism in avian erythrocytes *(Gallus gallus)* and its possible significance. *Mem. Inst. Butantan, 39*:149-155, 1975.

OBITUÁRIO

887. HOMENAGEM, Linda Nahas. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:1-2, 1980/81.

888. MACHADO, J. C. Homenagem póstuma: Alphonse Richard Hoge (1912-1982). *Mem. Inst. Butantan, 46*:1-12, 1982.

889. Mina Fichman. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:9, 1978/79.

890. Mitsuko Akashi Hanashiro. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:10, 1978/79.

OFÍDIOS
BIOLOGIA

882. BELLUOMINI, H. E. & AUTUORI, M. P. Methodology applied in the elaboration of faunal savage in the region of "Agua Vermelha" hydro-electric power plant. Centrais Energéticas de São Paulo — CESP. *Mem. Inst. Butantan, 46*:119-138, 1982.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

---

891. BELLUOMINI, H. E.; BIASI, P. de; PUORTO, G. & BORELLI, V. Bicefalia em *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). Serpentes, Viperidae, Crotalinae. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:117-121, 1976/77.

883. BELLUOMINI, H. E.; CEMBRANELLI, E. L. & AUTUORI, M. P. Wildlife rescue, capture of snakes and establishment of antiophidic stations in flooded areas destined for Brazilian hydroelectric power plants. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:129-154, 1976/77.

819. BELLUOMINI, H. E.; SALIBA, A. M. & ABE, A. S. Inquérito anátomo-patológico em serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:123-128, 1976/77.

892. BELLUOMINI, H. E.; VEINERT, T.; DISSMANN, F.; HOGE, A. R. & PENHA, A. M. Notas biológicas a respeito do gênero *Eunectes* Wagler, 1830 "sucuris". (Serpentes, Boinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:79-115, 1976/77.

893. CHISZAR, D.; SMITH, H. M. & HOGE, A. R. Post — strike trailing behavior in rattlesnakes. *Mem. Inst. Butantan, 46*:195-206, 1982.

894. FEDERSONI Jr., P. A. Casos teratogênicos em *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:49-64, 1978/79.

895. FEDERSONI Jr., P. A. Criação e manutenção de serpentes da espécie *Bothrops atrox* nascidas em cativeiro (Serpentes — Viperidae — Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:159-169, 1978/79.

896. HOGE, A. R. & FEDERSONI Jr., P. A. Observações sobre uma ninhada de *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:19-36, 1976/77.

897. HOGE, A. R.; LAPORTA, I. L. & ROMANO HOGE, S.A.R. Notes on *Sibynomorphus mikanii* Schlegel, 1837. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*: 175-178, 1978/79.

898. LANCINI V., A. R. Serpientes de Venezuela. Distribución geografica y altitudinal de generos de serpientes en Venezuela. *Mem. Inst. Butantan, 46*:95-103, 1982.

874. ROLIM ROSA, R.; BELLUOMINI, H. E.; SILES VILLARROEL, M. & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:245-251, 1980/81.

899. ROZE, J. A. New world coral snakes (Elapidae); a taxonomic and biological summary. *Mem. Inst. Butantan, 46*:305-338, 1982.

900. VEINERT, T. & BELLUOMINI, H. E. Observações do comportamento e da cópula heteróloga de sucuris em cativeiro — *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes Notaeus* Cope, 1862. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*: 391-402, 1980/81.

OFÍDIOS
RESGATE DE FAUNA

882. BELLUOMINI, H. E. & AUTUORI, M. P. Methodology applied in the elaboration of faunal savage in the region of "Agua Vermelha" hydroelectric power plant. Centrais Energéticas de São Paulo — CESP. *Mem. Inst. Butantan, 46*:119-138, 1982.

883. BELLUOMINI, H. E.; CEMBRANELLI, E. L. & AUTUORI, M. P. Wildlife rescue, capture of snakes and establishmet of antiophidic stations in flooded areas destined for Brazilian hydroelectric power plants. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:129-154, 1976/77.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

OFÍDIOS
SISTEMÁTICA

901. AMARAL, A. do. Complexidades nomenclaturais em Biologia. Gênero de nomes genéricos terminados em OPS.Z.N.(S) 1572. *Mem. Inst. Butantan, 39*:27-36, 1975.

902. BOLAÑOS, R. Serpientes venenosas de Centro America; distribuição, características y patrones cariológicos. *Mem. Inst. Butantan, 46*:275-291, 1982.

903. BRYGOO, E. R. Animaux venimeux de Madagascar. *Mem. Inst. Butantan, 46*:15-17, 1982.

904. BRYGOO, E. R. Les ophidiens de Madagascar. *Mem. Inst. Butantan, 46*: 19-58, 1982.

905. CADLE, J. E. Problems and approaches in the interpretations of the evolutionary history of venomous snakes. *Mem. Inst. Butantan, 46*:255-274, 1982.

906. CEKALOVIC, K. T. Estado actual de la coleccion herpetologica del Museo de Zoologia de la Universidad de Concepción (M.Z.U.C.) en la parte serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 46*:183-186, 1982.

907. CORREA, A. A. S. & ARTIGAS, P. de T. *Catadiscus rochai* n.sp. (Trematoda; Paramphistomidae) parasito de *Dromicus typhlus* (L.) (Ophidia; Colubridae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:145-149, 1978/79.

908. CUNHA, O. R. & NASCIMENTO, F. P. Ofídios da Amazônia. XV — As espécies de *Chironius* da Amazônia oriental (Pará, Amapá e Maranhão). (Ophidia: Colubridae). *Mem. Inst. Butantan, 46*:139-172, 1982.

895. FEDERSONI Jr., P. A. Criação e manutenção de serpentes da espécie *(Bothrops atrox)* nascidas em cativeiro. (Serpentes — Viperidae — Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:159-169, 1978/79.

909. HARRIS Jr., H. S. & SIMONS, R. S. A new subspecies of *Crotalus durissus* (Serpentes: Crotalidae) from the Rupununi Savana of southwestern Guyana. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:305-311, 1976/77.

910. HOGE, A. R.; BELLUOMINI, H. E. & FERNANDES, W. Variação do número de placas ventrais de *Bothrops jararaca* em função dos climas (Viperidae, Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:11-17, 1976/77.

911. HOGE, A. R.; CORDEIRO, C. L. & ROMANO, S. A. L. Posição taxonômica de *Lystrophis nattereri (Steindachner)* (Serpentes, *Colubridae*). *Mem. Inst. Butantan, 39*:37-50, 1975.

912. HOGE, A. R.; CORDEIRO, C. L. & ROMANO, S. A. R. W. D. L. Redescription of *Micrurus donosoi* Hoge, Cordeiro et Romano. (Serpentes, *Elapinae*). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:71-73, 1976/77.

896. HOGE, A. R. & FEDERSONI Jr., P. A. Observações sobre uma ninhada de *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758). (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:19-36, 1976/77.

897. HOGE, A. R.; LAPORTA, I. L. & ROMANO HOGE, S. A. R. Notes on *Sibynomorphus mikanii* Schlegel, 1837. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:175-178, 1978/79.

913. HOGE, A. R. & ROMANO, S. A. R. W. L. Description of a new subsp. of *Oxyrhopus* Wagler. (Serpentes, *Colubridae*). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*: 55-62, 1976/77.

914. HOGE, A. R. & ROMANO, S. A. R. W. D. L. *Lachesis muta rhombeata.* (Serpentes, *Viperidae, Crotalinae*). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:53-54, 1976/77.

915. HOGE, A. R. & ROMANO, S. A. L. A new subspecies of *dipsas indica* from Brazil. (Serpentes, *Colubridae, Dipsadinae*). *Mem. Inst. Butantan, 39*: 51-60, 1975.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

---

916. HOGE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhaustschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:81-118, 1980/81.

917. HOGE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the pit — vipers (Viperoidea, Viperidae, Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:179-310, 1978/79.

918. HOGE, A. R. & ROMANO, S. A. R. W. D. L. Redescription and range of *Sordellina punctata.* (Peters). (Serpentes, *Colubridae*). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:63-70, 1976/77.

919. HOGE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. 2.ed. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:373-496, 1978/79.

920. HOGE, A. R.; ROMANO, S. A. R. W. D. L.; CORDEIRO, C. L. Contribuição ao conhecimento das serpentes do Maranhão, Brasil. (Serpentes, *Boidae, Colubridae* e *Viperidae*). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:37-52, 1976/77.

921. HOGE, A. R.; ROMANO, S. A. R. W. L. & CORDEIRO, C. L. Posição nomenclatural de *Leimadophis poecilogyrus amazonicus* Amaral. (Serpentes, *Colubridae*). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:75-78, 1976/77.

922. HOGE, A. R.; RUSSO, C. R.; SANTOS, M. C. & FURTADO, M. F. D. Snakes collected by "Projeto Rondon XXII" to Piauí, Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:87-94, 1978/79.

923. HOOGMOED, M. S. Snakes of the Guianan region. *Mem. Inst. Butantan, 46*:219-254, 1982.

924. KARDONG, K. V. The evolution the venom apparatus in snakes from colubrids to viperideos & elapids. *Mem. Inst. Butantan, 46*:105-118, 1982.

898. LANCINI V., A. R. Serpientes de Venezuela. Distribución geografica y altitudinal de generos de serpientes en Venezuela. *Mem. Inst. Butantan, 46*:95-103, 1982.

925. LEMA, T. Fauna de serpentes da província pampeana e inter-relações com as províncias limítrofes. *Mem. Inst. Butantan, 46*:173-182, 1982.

926. PÉREZ BRAVO, G. Segundo hallazgo de *Helicops hogei* Lancini, 1964 (Serpentes: Colubridae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:313-315, 1976/77.

927. REGO, A. A. Sobre a identificação das espécies de *Porocephalus* (Pentastomida) que ocorrem em ofídios da América Tropical. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:219-231, 1980/81.

928. ROUX-ESTEVE, R. Les spécimes types du genre *Micrurus* (Elapidae) conservés au Muséum National D'Histoire Naturelle de Paris. *Mem. Inst. Butantan, 46*:79-94, 1982.

899. ROZE, J. A. New world coral snakes (Elapidae); a taxonomic and biological summary. *Mem. Inst. Butantan, 46*:305-338, 1982.

929. SANDNER MONTILLA, F. Serpientes Crotalinae de Venezuela. *Mem. Inst. Butantan, 46*:193-194, 1982.

PARASITOLOGIA

930. ARAUJO, P. Uma nova espécie do gênero *Neyraplectana* (Nematoda: Subuluroidea: Cosmocercidae) encontrada em ofídios. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:259-264, 1976/77.

931. ARAUJO, P. Um novo oxiurídes, *Gynaecometra bahiensis* n.gen., n.sp. (Nematoda: Oxyuroidea: Oxyuridae), founded in lacertilian. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:251-257, 1976/77.

COMISSÃO EDITORIAL. Lista remissiva dos trabalhos publicados nas Memórias do Instituto Butantan, 39-46, 1975/82.

---

932. ARAUJO, P. & ARTIGAS, P. de T. *Gyrinicola chabaudi* n.sp. (Nematoda, Pharyngodonidae), oxiurídeo encontrado em girinos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:383-390, 1980/81.

933. ARTIGAS, P. de T. & CAMPOS, M. S. de. Considerações sobre *Plagiorchis luehei* Travassos, 1927 (= *Microderma lühei* Mehra, 1931). *(Trematoda, Plagiorchüdae)*, parasito de *Hydrodynastes gigas* Dum. et Brib. *(Reptilia, Colubridae)*. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:265-279, 1976/77.

934. BIASI, P.; PESSÔA, S. B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *trypanosoma* de serpentes em meio de cultura. *Mem. Inst. Butantan, 39*:85-101, 1975.

935. CORDEIRO, N. da S. Verificação do parasitismo do *Polychrus acutirostris*, Spix, 1821 (Sauria: Iguanidae), novo hospedeiro natural do *Plasmodium (Carinamoeba)* minasense Carini & Rudolph, 1912. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:299-304, 1976/77.

907. CORREA, A. A. S. & ARTIGAS, P. de T. *Catadiscus rochai* n.sp. (Trematoda; Paramphistomidae) parasito de *Dromicus typhlus* (L.) (Ophidia; Colubridae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:145-149, 1978/79.

936. FERNANDES, M. P. M. & ARTIGAS, P. de T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861. *(Nematoda, Diaphanocephalidae)*. Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas. *Mem. Inst. Butantan, 39*:103-121, 1975.

937. FERNANDES, M. P. M. & ARTIGAS, P. de T. *Kalicephalus inermis* Molin, 1861. (Nematoda; Diaphanocephalidae). Redescrição e confirmação desta espécie; informações de natureza biológica e crítica do grupo "*inermis*" proposto por Schad. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:281-297, 1976/77.

938. PESSÔA, S. B. & BIASI, P. Sobre uma hemogregarina e um tripanosomo de peixe de mar de São Paulo (Brasil). *Mem. Inst. Butantan, 39*:79-83, 1975.

939. REGO, A. A. Encontro de plerocercos de Trypanorhyncha (Cestoda) em ofídio de rio da América do Sul. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:239-243, 1980/81.

940. REGO, A. A. Notas sobre alguns pentastomídeos de répteis. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:233-238, 1980/81.

927. REGO, A. A. Sobre a identificação das espécies de *Porocephalus* (Pentastomida) que ocorrem em ofídios da América Tropical. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:219-231, 1980/81.

941. VEIGA, R. M. O.; BORBA, H. L.; TRAVASSOS F.º, L. P. & DOBBIN Jr., J. E. Contribuição para o conhecimento dos Triatominae — Hemiptera, Reduviidae. I. — *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:355-365, 1980/81.

PATOLOGIA

942. LANGLADA, F. G.; DENARO, L. & REIS, M. C. A. Contribuição à técnica operatória de serpentes. VIII — Timectomia em serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:363-365, 1978/79.

854. MARCHIORI, P. E.; SCAFF, M.; NÓBREGA, J. P. S.; ROSENBERG, S. & ASSIS, J. L. Acute necrotic myelopatia after spider bite. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:213-218, 1980/81.

QUÍMICA

943. FREITAS, J. C. Produtos naturais biologicamente ativos de animais marinhos. Comunicação química e aspectos farmacológicos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:191-211, 1980/81.

944. LAVIE, D. The withanoides as a model in plant genetics: chemistry, biosynthesis and biological activity. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:439-449, 1980/81.

945. LOPES, R. A.; COSTA, J. R. V.; CAMPOS, S. M. & CAMPOS, M. N. M. Estudo histoquímico de proteínas nas glândulas venenígeras e acessória de *Bothrops Jararaca*. (Ophidea, Viperidae). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*: 41-48, 1978/79.

946. LOPES, R. A.; COSTA, J. R. V.; PETENUSCI, S. O.; FAVARETTO, A. L. V. & CHAVES, P. H. F. Estudo morfológico e histoquímico das glândulas salivares de *Amphisbaena alba* (Amphisbaenidae, amphisbaenia). *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:33-39, 1978/79.

947. RABENHORST, E. & ZELNIK, R. As bases de Mannich de hidantoinas terpênicas. II. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:317-323, 1980/81.

948. ZELNIK, R.; MATIDA, A. K. & PANIZZA, S. Chemistry of the Brazilian Labiatae. The occurrence of ursolic acid in *Peltodon radicans Pohl. Mem. Inst. Butantan, 42/43*:357-361, 1978/79.

VENENOS ARACNÍDICOS

949. NEWLANDS, G. Preliminary report on the medical importance of *Sicarius* (Araneae: Sicariidae) and the action of its venom. *Mem. Inst. Butantan, 46*:293-304, 1982.

VENENOS OFÍDICOS

950. BIASI, P. de; BELLUOMINI, H. E. & FERNANDES, W. Quantidades de veneno obtidas na extração de serpentes *Bothrops pradoi* (Hoge, 1948). Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:155-166, 1976/77.

951. BIASI, P. de; BELLUOMINI, H. E.; HOGE, A. R. & PUORTO, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:167-172, 1976/77.

952. FEDERSONI Jr., P. A. Novo artefato para a extração de venenos de serpentes do gênero *Micrurus* Wagler. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:171-174, 1978/79.

953. ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, S. M. P.; SILES VILLARROEL, M. & BANCHER, W. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos. IV. Possibilidade de determinação da DL50 do veneno de *Bothrops alternatus. Mem. Inst. Butantan, 40/41*:181-185, 1976/77.

877. SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R. S.; ZELANTE, F. & ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. III. Análise dos componentes antigênicos comuns através da dupla difusão em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:241-250, 1976/77.

829. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R. S. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *B. Jararaca. Mem. Inst. Butantan, 42/43*:345-355, 1978/79.

Obs.: Os números das referências que aparecem repetidos indicam que esses trabalhos aparecem em mais de um assunto.

Mem. Inst. Butantan
47/48:217-218, 1983/84

íNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

ARTIGAS, P. T. : 61, 107
BELLUOMINI, H. E. : 189
BRAZIL, O. V. : 13, 95
BUONONATO, M. A. : 121
CANTER, H. M. : 113
CARDOSO, J. L. : 127
CARVALHO, J. P. P. : 81
CICARELLI, R. M. B. : 27, 33, 45, 55
CORDEIRO, N. S. : 61, 107
CRIVELLARO, O. : 33
EICKSTEDT, V. R. D. von : 133
FEDULLO, J. D. L. : 189
FONTANA, M. D. : 13
GIÓIA, I. : 61
GUIDOLIN, R. : 33
HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. : 157, 165, 175, 183
HIGASHI, H. G. : 113
HOFLING, M. A. C. : 95
IIZUKA, H. : 113, 189
KNYSAK, I. : 5
LEMA, T. : 71
LIMA, R. S. : 61
LIZASO, N. M. : 143
LUCAS, S. : 3, 5, 55, 127
MALUCELLI, M. I. C. : 81
MATIDA, A. K. : 139
MORAES, A. C. : 127
OBA, M. S. P. : 195
OLIVEIRA, E. P. T. : 113

RABENHORST, E. : 139
RIZZO, E. : 1
RODRIGUES-SIMIONI, L. : 95
ROLIM ROSA, R. : 27, 113
SCHUMAKER, T. T. S. : 195
SILES VILLARROEL, M. : 27, 33, 45, 55
SILVA, M. V. : 121
VEINERT, T. : 189
ZELANTE, F. : 45
ZELNIK, R. : 139
ZVEIBIL, L. : 5

Mem. Inst. Butantan
47/48:219-222, 1983/84

íNDICE DE ASSUNTOS

ÁCAROS
ectoparasitismo em serpentes : 143
Ácido ursólico, ocorrência
Citharexylum myrianthum : 139
Amblyomma rotundatum
ciclo evolutivo : 195
Antiveneno
aracnídico : 27, 45, 55
Apostolepis dimidiata
serpentes
nova combinação : 71
variação morfocefálica : 71
Apostolepis erythronota
serpentes
nova combinação : 71
variação morfocefálica : 71
Apostolepis ventrimaculata
serpentes
nova combinação : 71
variação morfocefálica : 71
Aranhas
antiveneno : 27, 45, 55
Loxosceles amazonica, acidente : 127
Loxosceles gaucho
veneno : 33
Lycosa erythrognatha
veneno : 33
Phoneutria nigriventer
veneno : 33

Rachias (Araneae, Ctenizidae) : 5
sistemática : 5
Boa constrictor constrictor
biotério : 113
cativeiro : 113
estomatite : 113
Bücherl, W., homenagem : 3
Citharexylum myrianthum
ácido ursólico, ocorrência : 139
Coqueluche
vacina : 81
Ectoparasitismo, serpentes : 143
Elapomojus dimidiatus
serpentes
nova combinação : 71
variação morfocefálica : 71
Escorpiões
sistemática : 133
Tityus stigmurus (Scorpiones, Buthidae) : 133
Eunectes notaeus
necrose : 189
Henneguya pisciforme : 61
Hyphessobrycon anisitsi : 61
Klossnema repentina : 107
Loxosceles amazonica
acidente : 127
Loxosceles gaucho
veneno : 33, 45
Loxoscelismo : 127
Lycosa erythrognatha
veneno : 33, 55
Micrurus corallinus
alterações ultra-estruturais na junção neuromuscular : 95
junção neuromuscular : 13
Mixosporídeo : 61
Necrose
Eunectes notaeus : 189

Passalídeos
nematóides : 107
Pertussis
vacina : 81
Philodryas olfersii
envenenamento : 121
Phoneutria nigriventer
veneno : 27, 33
Pimont, R. P., homenagem : 1
Rachias (Araneae, Ctenizidae) : 5
Rhodnius neglectus
ciclo evolutivo em laboratório : 183
Serpentes
Apostolepis dimidiata : 71
Apostolepis erythronota : 71
Apostolepis ventrimaculata : 71
Boa constrictor constrictor
biotério : 113
cativeiro : 113
estomatite : 113
coral, venenos : 95
Elapomojus dimidiatus : 71
Eunectes notaeus
necrose : 189
Micrurus corallinus
alterações ultra-estruturais na junção neuromuscular : 95
junção neuromuscular : 13
Philodryas olfersii, envenenamento : 121
Sistemática
aranhas
Rachias (Araneae, Ctenizidae) : 5
escorpiões
Tityus stigmurus (Scorpiones, Buthidae) : 133
Tityus stigmurus (Scorpiones, Buthidae) : 133
Triatoma brasiliensis
ciclo evolutivo em laboratório : 157, 175
Triatoma lenti
ciclo evolutivo em laboratório : 165, 175

Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) : 157, 165, 175, 183
Vacina
    Pertussis : 81
    coqueluche : 81
Venenos
    aranhas
        Loxosceles gaucho : 33, 45
        Lycosa erythrognatha : 33, 55
        Phoneutria nigriventer : 27, 33
    serpentes
        coral : 95

Mem. Inst. Butantan
47/48:223-226, 1983/84

SUBJECT INDEX

Acarid
    ectoparasitism in snakes : 143
Amblyomma rotundatum
    evolutionary cycle : 195
Antivenin
    spider : 27, 45, 55
Apostolepis dimidiata
    snakes
        new combination : 71
        morphocephalic variation : 71
Apostolepis erythronota
    snakes
        new combination : 71
        morphocephalic variation : 71
Apostolepis ventrimaculata
    snakes
        new combination : 71
        morphocephalic variation : 71
Boa constrictor constrictor
    captivity : 113
    stomatitis : 113
Bücherl, W., homage : 3
Citharexylum myrianthum
    ursolic acid, occurrence : 139
Ectoparasitism, snakes : 143
Elapomojus dimidiatus
    snakes
        new combination : 71
        morphocephalic variation : 71

Eunectes notaeus
necrotic : 189
Henneguya pisciforme : 61
Hyphessobrycon anisitsi : 61
Klossnema repentina : 107
Loxosceles amazonica
accident : 127
Loxosceles gaucho
venom : 33, 45
Loxoscelism : 127
Lycosa erythrognatha
venom : 33, 55
Micrurus corallinus
nerve terminal ultrastructure changes : 95
neuromuscular junction : 13
Myxosporea : 61
Necrotic
Eunectes notaeus : 189
Passalidae
nematoda : 107
Pertussis
vaccine : 81
Philodryas olfersii
poisoning : 121
Phoneutria nigriventer
venom : 27, 33
Pimont, R. P., homage : 1
Rachias (Araneae, Ctenizidae) : 5
Rhodnius neglectus
evolutive cycle in laboratory : 183
Scorpions
systematic : 133
Tityus stigmurus (Scorpiones, Buthidae) : 133
Snakes
Apostolepis dimidiata : 71
Apostolepis erythronota : 71
Apostolepis ventrimaculata : 71
Boa constrictor constrictor

captivity : 113
stomatitis : 113
coral, venoms : 95
Elapomojus dimidiatus : 71
Eunectes notaeus
necrotic : 189
Micrurus corallinus
nerve terminal ultrastructure changes : 95
neuromuscular junction : 13
Philodryas olfersii, poisoning : 121
Spiders
antivenin : 27, 45, 55
Loxosceles amazonica, accident : 127
Loxosceles gaucho
venom : 33
Lycosa erythrognatha
venom : 33
Phoneutria nigriventer
venom : 33
Rachias (Araneae, Ctenizidae) : 5
systematic : 5
Systematic
scorpions
Tityus stigmurus (Scorpiones, Buthidae) : 133
spiders
Rachias (Araneae, Ctenizidae) : 5
Tityus stigmurus (Scorpiones, Buthidae) : 133
Triatoma brasiliensis
evolutive cycle in laboratory : 157, 175
Triatoma lenti
evolutive cycle in laboratory : 165, 175
Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) : 157, 165, 175, 183
Ursolic acid, occurrence
Citharexylum myrianthum : 139
Vaccine
Pertussis : 81
Whooping cough : 81

Venoms
    snakes
        coral : 95
    spiders
        Loxosceles gaucho : 33, 45
        Lycosa erythrognatha : 33, 55
        Phoneutria nigriventer : 27, 33
Whooping cough
    vaccine : 81

COMPOSICÃO, FOTOLITO E IMPRESSÃO
IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
Rua da Mooca, 1921 — Fone: 291-3344
Caixa Postal: 8231 — São Paulo

ISSN 0073 – 9901

IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
SÃO PAULO – BRASIL
1986