

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS BATRACHIOS

PELOS DOUTORES

VITAL BRAZIL E J. VELLARD

INTRODUÇÃO

Entre os animais venenosos ou reputados taes, os batrachios, particularmente as salamandras e os sapos occuparam, em todos os tempos, em todos os paizes, lugar saliente. Desde a mais remota antiguidade e especialmente durante a idade média, estiveram sempre associados aos mysterios da magia, originando innumeraveis fabulas a seu respeito. Serviam principalmente ao preparo de philtros e de venenos subtis, não faltando, nunca, no caldeirão dos feiticieiros, o sapo, ao lado de outros ingredientes suspeitos. Mais tarde perdeu, em parte, este renome, continuando, entretanto, a gosar de um papel na therapeutica empirica de varios paizes, sendo recommendado no tratamento de differentes affecções, quer sob a forma de oleo de sapo ou de preparados semelhantes, quer sob a da applicação do animal vivo sobre as partes doentes.

Ha alguns annos que um bom numero de biologistas tem tratado do assumpto, para estabelecer a verdade sobre estes factos empiricos. Negada por alguns, a presença de secreção toxica foi reconhecida em um certo numero de *urodelos e anouros*, por quasi todos os autores que se occuparam d'estas pesquisas. Fóra, porém, da observação quasi unanime da toxicidade d'estas secreções, as opiniões estão longe de accordo, no que respeita a sua origem, acção physiologica, pharmacologica, propriedades physico-chimicas, etc. Muitas d'estas divergencias se explicam, pela diversidade dos methodos empregados para obtenção do veneno e pela multiplicidade das especies estudadas. E' assim que alguns autores tratam do "*veneno dos batrachios*" e de suas propriedades, sem mesmo distinguir os urodelos dos anouros, generalizando a todos os batrachios, conclusões applicaveis a uma só especie.

Rarissimos e incompletos os trabalhos que encontramos sobre especies brazileiras de sapo. Fomos por essa razão, conduzidos a fazer algumas experiencias sobre o veneno da especie mais commum

entre nós, o *Bufo marinus*, experiencias estas que tendo nos revelado factos extremamente interessantes, alguns dos quaes não registados anteriormente, nos decidiram a um estudo mais detalhado comprehendendo outras especies do genero *Bufo* e de outros batrachios.

Faremos, para maior clareza, preceder a exposição de nossas pesquisas, de uma primeira parte historica em que daremos uma synthese dos trabalhos anteriores.

PRIMEIRA PARTE

HISTORICO

Na antiguidade eram os sapos considerados como extremamente venenosos. Acreditava-se que pela bocca, pelo anus, pelos poros da pelle, segregavam um veneno dos mais violentos e que o bafo ou o simples contacto do seu corpo bastava para communicar ás plantas, sobre as quaes tocassem, propriedades tão venenosas, que absorvidas por homem ou animal determinariam a morte acompanhada de horribéis soffrimentos. Segundo *Fausto* (1) uma crença muito popular ao norte da Europa explica a existencia do veneno do sapo, pela faculdade d'estes animaes absorverem as substancias venenosas do solo ou dos vegetaes, donde o nome de "*Erd-magnete*", ou imans da terra, dado a estes animaes, em certas regiões da Allemanha, ou o de "*Reine des Champignons*", como lhes chamam os Bretões, comprehendendo-se igualmente a razão, pela qual são designados os cogumellos, entre os quaes se encontram especies eminentemente toxicas, por "*Chapéo de sól de sapo*", "*Paddenstohlen*", "*Toadstoals*", ou "*Krôtenstühle*".

Aristoteles e *Plinio* falam do sapo como de um animal extremamente venenoso. O Talmud classifica-o entre os seres impuros, cujo contacto obriga a purificações.

Na idade media a secreção do sapo era considerada como um dos elementos de numerosos venenos que podiam, segundo a sua composição, determinar a morte lenta ou rapida. O uso criminoso d'este veneno, levemente negado, na actualidade, era geralmente conhecido outróra. *Ambrosio Paré* (2) affirma que era empregado em seu tempo. No Brazil é conhecido, por tradição, o uso que certos escravos africanos, — os chamados feiticeiros, — faziam do sapo, para fins criminosos. E' assim que o naturalista *Marcgrave* (3) em sua historia natural do Brazil diz que nossos feiticeiros preparavam com o *sapo cururu* torrado, um pó, que misturado aos alimentos, determinava a morte no meio de violentas dores, acompanhadas de inflammação da garganta, de perturbações visuaes, dyspnéa, vomitos, diarrhéa, convulsões e delirio. Como remedios contra taes envenenamentos, aconselha *Marcgrave* vomitivos, purgativos, banhos quentes e applicação sobre a cabeça do doente de um sapo partido ao meio. Actualmente ainda o povo reputa o sapo perigoso, podendo, quando irritado, lançar a certa distancia um jato de veneno capaz de determinar a cegueira.

A pharmacopéa popular de diversos paizes utiliza o sapo. Assim é que na China é empregado em diversos preparados para combater a hydropisia. Entre nós, em certas localidades do interior, principalmente no Estado do Rio, segundo nos informaram varios medicos, é empregado, em fricções, um oleo, a que chamam oleo de sapo, o qual é preparado lançando-se em azeite, a ferver, um sapo vivo. Em outros lugares (Minas Geraes) aconselha-se, no tratamento da erysipela, eczemas rebeldes e outras affecções cutaneas, fricções com um sapo vivo. A mesma tradição parece existir na Argentina, pois *Novaro* (4) cita dois casos extremamente interessantes de tratamento de herpes pela applicação do sapo vivo sobre a parte affectada, tratamento este que determinou o envenenamento dos pacientes, em um dos quaes se verificou a morte em 32 horas.

ENVENENAMENTOS ACCIDENTAES:

Os sapos possuem apenas um veneno cutaneo, destinado a defenderem-se naturalmente contra os outros animaes, principalmente contra os que sejam tentados a mordel-os ou a engolil-os. Não dispõe de um aparelho inoculador de veneno, sendo consequentemente inoffensivos, para o homem, em condições naturaes.

A litteratura consigna, entretanto, factos de envenenamento accidentaes, quer pela applicação directa ou indirecta sobre as mucosas, principalmente sobre a mucosa ocular, quer pelo uso empirico d'este veneno.

Os medicos antigos attribuiam, a estes animaes, muitos accidentes, pelos quaes não eram, as mais das vezes, responsaveis. E' assim que *Ambrosio Paré*, cita o caso de dois negociantes, que pereceram, dentro de poucas horas, por haverem bebido vinho no qual se haviam deitado algumas folhas de um vegetal, onde se encontraram numerosos sapos. *Rondelet*, (5), na mesma epocha, affirma ter observado uma mulher que succumbira por haver comido hervas sobre as quaes passara um d'estes animaes. Dois seculos mais tarde, *Delamazière* (6) assignala um envenenamento no homem, o qual terminou por cura rapida.

Fora d'estes accidentes hypotheticos, sem outro interesse, senão o de mostrar como era generalisada a crença na acção venenosa do sapo, a litteratura moderna regista um certo numero de factos interessantes e bem verificados.

Um dos mais antigos é o consignado por *Laurentius* (7) que observou a morte, no meio de convulsões, de um lagarto que mordera um sapo.

Gemminger (8) tambem vio morrer, dentro de pouco tempo, um gavião, que dilacerara com o bico, um sapo que lhe fôra dado, como alimento. Descreveu, como unicos symptomas, viva agitação; violentos esforços para vomitar seguidos da morte quasi que immediata do passaro. *Lataste* (9) refere o caso de um rato que morrera, em consequencia de haver comido um sapo, com elle encerrado na mesma gaiola; este mesmo autor não observara, entretanto, accidente local algum, em consequencia da projecção do veneno sobre a mucosa. *Bringard* (10) cita o caso de um cão morto rapidamente por syncope, depois de ter mordido um sapo. *Von Mehely*, citado por *Boulen-*

ger⁽¹¹⁾, observou um outro cão que nas mesmas condições se restabelecera em dois dias, depois de violentas dores e de salivação intensa.

O Dr. A. *Fontes*—do Instituto Oswaldo Cruz, nos referio o caso de um cão que sucumbira, em poucas horas, por haver mordido um sapo. O Dr. *Franco da Rocha* também observou um outro cão que depois de haver atacado um sapo apresentara phenomenos de envenenamento, com abundante salivação, tendo sido salvo, entretanto, por meio de lavagens repetidas com leite.

No homem citam-se, também, casos de ophtalmias mais ou menos graves, devidas á acção do veneno transportado accidentalmente ao globo ocular, pelos dedos ou projectado no orgão visual, por pressão exercida sobre a glandula. *Staderini*,⁽¹²⁾ refere um exemplo d'estes accidentes, no caso de uma mulher que se restabeleceu em dois dias, depois de haver apresentado uma forte opalescencia e anesthesia quasi completa da cornea e paresia de todos os musculos oculares. *Novaro*,⁽¹³⁾ tendo recebido, no curso de uma experiencia um jacto de veneno de *Bufo arenarum*, sobre o globo ocular, teve uma sensação immediata de frio, acompanhada de ischemia, seguida de congestão conjunctival e de perisclerite persistente, durante dois mezes.

FACTOS EXPERIMENTAES:

Na Europa se encontram principalmente tres especies de sapos pertencentes ao genero *Bufo*: o *Bufo calamita*, o *Bufo vulgaris* do Norte da Europa e o *Bufo viridis* da Europa meridional.

A ingestão d'este veneno, no homem, segundo *Ambrosio Paré*,⁽²⁾ determina desfallecimento, caimbras, enfraquecimento do pulso, cyanose, ictericia, vomitos, sobrevindo a morte por syncope. *Laurentius*⁽⁷⁾ observou no cão vomitos violentos e salivação abundante, em consequencia de absorpção por via oral d'este veneno. *John Davy*⁽¹⁴⁾ não teve resultado algum positivo trabalhando, ao que parece, com a urina d'este animal. *Dumeril et Bibron*⁽¹⁵⁾ referem que rãs e salamandras, collocadas no mesmo recipiente com sapos, succumbiram. *Gemminger*⁽⁸⁾ conclue que os sapos podem, em certas circumstancias, secretar um veneno muito activo e de acção assaz semelhante a strychnina.

Gratiolet et Cloetz⁽¹⁶⁾ estudaram comparativamente a acção dos venenos cutaneos da salamandra terrestre e do sapo commum. Segundo estes autores, o veneno do sapo ao contrario do de salamandra não é convulsivante; inoculado em pequenos passaros, estes cambaleiam, abrem o bico, fecham os olhos e cahem mortos em 5 ou 6 minutos; pela necropsia, não se encontra senão uma apoplexia pericerebelosa consideravel e os canaes semi-circulares cheios de sangue. Uma pequena tartaruga (*Testudo mauritanica*) picada na pata com uma agulha molhada no veneno, apresentou uma paralyisia do membro, ainda persistente 8 mezes depois. Sobre a mucosa bucal do homem não observaram reacção alguma dolorosa. Concluíram, entretanto, que as crenças populares a respeito d'este veneno se justificam pela sua acção toxica energica experimentalmente verificada.

O primeiro trabalho experimental, verdadeiramente notavel sobre este assumpto foi o de *Vulpian* em 1854, ⁽¹⁷⁾ seguido de uma segunda memoria, em 1856 e de diversas notas posteriores. Por inoculação, *Vulpian* verificou que o veneno de sapo mata rapidamente o cão, o cobaio, com os seguintes symptomas: 1.º excitação (1.ª phase); 2.º depressão (2.ª phase); 3.º vomitos ou nauseas; 4.º longo periodo, em que se observam crises convulsivas, tremores espasmodicos e opisthotonus no cobaio e que falta no cão. O cobaio morre em 30 minutos, a rã em 45 minutos e o cão numa hora. Por via oral não conseguiu provocar symptomas no cão pela administração do veneno de mistura com uma pillula de carne; obrigando, entretanto, este animal a morder o sapo, observou vomitos quasi que immediatos, forte salivação com restabelecimento dentro de uma hora. Por esta via conseguiu determinar a morte lenta da rã.

A irritabilidade muscular, *post-mortem*, é mantida no cão e na rã. A acção sobre o coração é variavel segundo as especies: parada em diastole no momento da morte no cão; quasi imperceptivel no cobaio, depois da parada da respiração; para antes da respiração no pardal e na rã. Em todos os casos a parada do coração tem como causa o enfraquecimento da irritabilidade muscular de suas paredes.

Segundo *Vulpian* existe uma certa analogia physiologica entre este veneno e o curare, analogia que estaria confirmada pela maior resistencia do sapo a estas duas substancias.

Ao contrario dos autores precedentes, *Cuvier* ⁽¹⁸⁾ não reconhece a natureza toxica da secreção cutanea do sapo, affirmando que "não constitue um veneno senão para os animaes muito fracos". Do mesmo modo, *Rainey* ⁽¹⁹⁾ não obteve senão reacção local pela injecção do veneno, o que só se explica por haver trabalhado com um producto muito impuro. Para *Claude Bernard*, ⁽²⁰⁾ o veneno age sobre a fibra muscular, sendo os musculos voluntarios atacados em primeiro lugar; o coração não para senão em um periodo mais adeantado do envenenamento.

No homem *Lataste* ⁽⁹⁾ não notou effeito algum local consecutivo a applicação do veneno sobre as mucosas.

Fornara ⁽²¹⁾ que publicou uma serie de memorias sobre o veneno de sapo, utilisou-o sob a forma de extractos alcoolicos, a que deu o nome de phrynina. A acção d'este veneno, seria segundo este autor, muito semelhante a da digitalina, mas as nauseas mais violentas do que as determinadas por este alcaloide. Um coelho morre em 5 horas por ingestão de 90 milligrammas de phrynina. A injecção subcutanea determina gangrena. Os symptomas observados nos animaes consistem em viva agitação, a principio, acompanhada ou não de augmento da sensibilidade e dos reflexos, vem depois a salivação, os vomitos, a polypnéa e violentas convulsões no coelho e por vezes na rã. Os passaros são menos sensiveis do que os outros animaes.

Fornara pensa que o veneno possui uma forte acção sobre o systema nervoso central. *Staderini* ⁽¹²⁾ tendo observado um caso de ophtalmia consecutiva a projecção de veneno no globo ocular, realisou as interessantes experiencias que se seguem. A instillação

de uma solução de veneno a 2 ‰, provoca nos animaes a anesthesia das palpebras e da cornea, a começar de cinco minutos depois da applicação da solução e durando de 4 a 5 horas, acompanhada de hyperhemia conjunctival e de opacidade da cornea, que desaparecem ao fim de 24 horas. Uma solução a 1 ‰ sem provocar irritação local produz ainda anesthesia total, sem immobilisar, contudo o globo occular. A tenotomia operada n'estas condições é indolor.

Em 15 minutos a conjunctiva e a cornea humana são anestesiadas nas mesmas condições, por muitas horas; mas a diminuição da sensibilidade é ainda notavel depois de 24 horas. A pressão ocular interna é igualmente diminuida, mas a pupilla e accomodação não são atacadas. Pequenas doses de veneno collocadas na mucosa buccal do homem ou injectadas no cão, exercem a mesma acção anesthesica; mas a injeccção de fortes doses determina ulceração local. A contractilidade dos musculos da ran mergulhados em uma solução de veneno é rapidamente abolida. O veneno secco e redissolvido é tão activo como o veneno fresco.

Por experiencias *in vitro*, *Pugliese* (22) notou que o veneno transforma a hemoglobina em methemoglobina; não pode, entretanto, verificar *in vivo* estes resultados.

Phisalix et Bertrand (23) estudando a acção do veneno do *B. vulgaris* sobre a ran que se mostrou muito sensivel, observaram, como principaes symptomas, a paralysisa posterior a principio, a myosis e retardamente nos batimentos do coração que para em systole. A acção do veneno é attribuida por estes autores a dois principios chimicos differentes—a bufotalina, veneno cardiaco e a bufotenina veneno paralysante.

Fausto, (1) em 1902, publicou um importante trabalho sobre o veneno dos sapos da Europa. Em suas pesquisas utilisou não o veneno natural, mas duas substancias obtidas por maceração alcoolica da pelle e purificações successivas—a bufotalina e a bufonina, corpo mal definido, differindo do precedente, principalmente por sua solubilidade menor e por sua acção mais fraca. Physiologicamente, a bufotalina se comporta como a digitalina, provocando diminuição do numero de batimentos cardiacos, a elevação da pressão e reforço da systole ventricular, podendo chegar até ao peristalthismo cardiaco, interrompido por silencios systolicos. Todos os outros symptomas observados são consequencias das perturbações circulatorias que produzem secundariamente diminuição funcional do systema nervoso, podendo chegar até a paralysisa. As demonstrações foram feitas sobre o coração da *Rana temporaria* mas nenhuma acção directa pode ser demonstrada sobre os systemas nervoso ou muscular. Sobre os animaes de sangue quente, *Fausto* ensaiou a acção da bufotalina por via gastrica e parental, notando que no primeiro caso a dose lethal era 10 vezes maior de que no segundo: depois de um periodo de agitação sobrevem nauseas, vomitos, crises espasmodicas de suffocação; os movimentos respiratorios, diminuidos de frequencia são mais profundos, lembrando, por vezes, o Cheyne Stokes; o pulso é irregular, ora lento, ora rapido, algumas vezes dicoto; fraco com bruscas contracções a respiração para afinal, morrendo o animal com algumas convulsões. No coelho a dyspnéa é mais accentuada do que no cão ou no gato.

Heuser (24) e depois d'elle *Krakow* (25) confirmaram a semelhança do veneno total com a digitalina, sendo que este ultimo autor observou igualmente a acção anesthesica assignalada por *Staderini*. Para *Kobert* (26) igualmente a acção d'este veneno assemelha-se a da digitalina e é devida a duas substancias, a bufotalina e a bufonina isoladas por *Fausto*, mas acredita que a phrynolisina isolada por *Pröscher* (27) da pelle do *Bombinator igneus* e assignalada posteriormente no *Bufo vulgaris* é de natureza muito differente. *Pierrotti* (28) notou que o veneno não se altera pelo tempo, pelo calor, pela putrefacção, pelos alcalis ou pelos acidos fracos, nem pela filtração. Segundo este autor a ran, o coelho, o cobaio, o rato, o gato, o cão e o pombo são muito sensiveis, especialmente estes trez ultimos animaes. Os symptomas são analagos aos que foram descriptos pelos autores anteriores. *Fühner* (29) occupou-se da acção comparada do veneno total, obtido por maceração da pelle em liquido de *Ringer*, sobre o coração do proprio animal, sobre o da *Rana temporaria* e o da *Rana esculenta*, tendo verificado uma menor sensibilidade para o sapo. As curvas obtidas nestas especies de animaes são qualitativamente semelhantes e não haveria senão uma simples differença na amplitude da reacção.

Hermann Wieland (30) criticou o trabalho de *Fühner*, por haver este empregado veneno muito impuro, tendo utilizado, em suas experiencias, a bufotalina preparada pelo methodo de *Fausto*. Para elle a acção d'este producto é muito semelhante á da digitalina; notou algumas differenças ligeiras entre as curvas por elle obtidas e as de *Fühner*. Suas conclusões geraes são, entretanto, as mesmas.

Em 1910 *Dehaut* (31) publicou um estudo sobre o veneno dos batrachios sem trazer factos algum original sobre o dos sapos.

Mme. *Physalix* (32) falla longamente a respeito dos sapos em seu livro sobre os animaes venenosos e os venenos. Parece não ter realisado pesquisas pessoas sobre o assumpto, limitando-se a resumir os trabalhos anteriores, particularmente os de *Physalix*, *Bertrand* e os de *Pierrotti*.

Trabalhos, sobre o veneno das especies sul americanas de sapo, são muito raros, referindo-se as duas especies mais communs do genero *Bufo*—o *B. Marinus* L. (Syn. *B. aqua Seba*) e o *B. Arenarum* *Hensel*.

O Dr. *J. Baptista de Lacerda* (33) foi o primeiro que no Brazil se occupou com o veneno de sapo, estudando o do *B. Marinus*, que elle chamou *Bufo ictericus*, tratando-se mui provavelmente do macho d'aquella especie. Os resultados a que chegou são assaz curiosos, alguns dos quaes não alcançaram confirmação posterior.

Segundo este investigador o veneno estudado era menos activo do que os dos *Bufos* europeus e de acção differente, tanto do ponto de vista chimico, como do ponto de vista physiologico.

Em 1912, *Abel e Macht* (34) publicaram um interessante trabalho sobre o veneno d'esta especie (*B. marinus*), pelo qual se verifica haverem isolado dois principios, um dos quaes identificaram a adrenalina na proporção de 6,72 ‰, e outro de acção toxico-cardiaca e diuretica analogo a digitalina.

Acrisio Bezerra (35) em sua these apresentada a Faculdade de

Medicina da Bahia, occupou-se do veneno de sapo, fazendo trabalho de simples compilação.

Novaro (4 e 13), na Argentina escreveu duas notas muito interessantes sobre o veneno do *B. arenarum*. Foi, este autor, levado a occupar-se experimentalmente do assumpto pela observação de accidentes determinados por esta especie, aos quaes já tivemos occasião de nos referir anteriormente. Depois de haver determinado a minima mortal para as differentes especies animaes de laboratorio, verificou que o *Bufo arenarum* resiste, por injeccão subcutanea, e intraperitoneal ao seu proprio veneno até a dose de 500 mg.

Do ponto de vista physiologico estabeleceu *Novaro*, a semelhança de acção d'este veneno com a da adrenalina, observando tachicardia, com elevação de pressão, seguida quasi sempre de brachycardia mais accentuada do que com a adrenalina, vaso constricção e a morte por syncope. A coagulabilidade do sangue não lhe pareceu modificada. A acção local era intensa, caracterisada por forte congestão e tumefação, quando depositada sobre uma ferida. Sobre o globo ocular notou sensação de frio, ischemia, seguida de congestão conjunctival, podendo se acompanhar de perisclerite, persistente de 1 a 2 mezes. Ao contrario do que se dá com a adrenalina, observou que este veneno provoca a contractura generalisada do intestino isolado do coelho, dilata o globo ocular enucleado da ran e produz a glycemia no coelho.

SECREÇÃO MUCOSA OU VENENO MUCOSO DOS BATRACHIOS.

Além do veneno propriamente dito, denominado veneno granuloso ou dorsal, segragado pelas paratoides e pelos agglomerados de glandulas da face dorsal, assignalou-se nos batrachios uma secreção fornecida por pequenas glandulas redondas de Leydig ou glandulas mucosas, existindo sobre toda a superficie tegumentaria, no meio das glandulas de veneno e mesmo sobre as paratoides. Todavia, na face ventral, estas glandulas mucosas se apresentam isoladas.

Em diversas especies de batrachios têm sido assignaladas propriedades toxicas d'esta secreção, a despeito da enorme difficuldade de obter-se este producto em estado de pureza.

Eis, segundo *Physalix* e *Mme. Physalix*, as propriedades geraes da secreção mucosa dos batrachios; é um liquido incolor, viscoso, neutro, espumando com facilidade, insipido, de odor penetrante, variavel segundo as especies, parcialmente soluvel no sôro physiologico e coagulando pelo alcool. Do coaculo alcoolico pode ser retirada pela agua a substancia toxica. As soluções perdem rapidamente a actividade, do mesmo modo a dissecação diminue muito a toxidade, isto, porém, nenhuma relação tem com a evaporação de productos volateis, porquanto o mucus inodoro das larvas é, entretanto, toxico. O calor attenua-o geralmente. Certos mucus, porém, guardam sua toxicidade completa ou parcialmente.

Sobre o mucus das especies de *Bufo* Sul Americanas não existem pesquisas. Das especies europeas *Dehaut*, *Mme. Physalix* e *Physalix* se occuparam, tendo este ultimo autor verificado a sua pequena actividade, ainda que tenha conseguido matar, por injeccão de for-

tes doses, rans nas quaes observou paralysisia e a parada do coração em diastole.

PROPRIEDADES PHYSICO-CHIMICAS DO VENENO GRANULOSO:

Todos os autores que se tem occupado com o estudo d'este veneno descrevem-n'o como uma substancia leitosa ou cremosa, de consistencia variavel, de côr branca ou amarellada, de gosto amargo e cheiro *sui generis*, em estado fresco. Dissecado transforma-se em uma massa amarella translucida, de aspecto corneo ou resinoide.

Fóra d'estes caracteres em que as opiniões são accordes, a maior diversidade se verifica no modo de interpretar a natureza e as propriedades d'este veneno, como veremos pela exposição que se segue.

Em 1817 *Pelletier* ⁽³⁶⁾ achou-lhe um gosto amargo, picante e caustico. Este veneno seria formado de trez elementos differentes: uma materia graxa muito amarga, uma substancia muito semelhante a gelatina e um acido em parte livre e em parte combinado a uma base; dá emulsões com a agua e envermelhece o papel de tournesol.

Segundo *Dumeril e Bibron*, ⁽¹⁵⁾ seu cheiro se approxima muito do de almiscar e sua reacção é muito acida. *Davy* ⁽³⁸⁾ affirma que elle é parcialmente soluvel no alcool e dá com o acido azotico uma coloração vermelha.

Gratiolet e Cloetz ⁽¹⁶⁾ verificaram primeiro que o veneno dissecado conserva toda a actividade. Depois procuraram separar seu principio activo pelo tratamento successivo pelo ether sulfurico e pelo alcool. Segundo estes autores a parte activa do veneno seria um alcaloide.

Claude Bernard ⁽²⁰⁾ estabeleceu, muito claramente, a differença entre os venenos de batrachios e os venenos ophidicos, sendo os primeiros soluveis no alcool e thermoresistentes, e os segundos se precipitando, ao contrario pelo alcool e thermo-labeis.

Casali ⁽³⁸⁾ de collaboração com *Fornara*, retirou, do veneno do *Bufo viridis*, uma substancia que pensa ser um alcaloide a bufidina, de acção analoga ao veneno total, pouco soluvel na agua, mais facilmente soluvel no chloroformio, no ether, no alcool, dando com o acido chlorhydrico uma bella coloração verde, que seria semelhante a obtida com a digitalina. A analyse da bufidina não pode ser feita; ella daria entretanto, a maior parte das reacções de coloração dos alcaloides.

Fornara, ⁽²¹⁾ em 1877, tendo em vista pesquisas pharmacologicas e therapeuticas, obteve por maceração da pelle inteira, uma nova substancia, muito impura, de côr vermelho amarellada, de odor viroso, hygroskopica, a que chamou phrynina.

Em 1884, *Calmels*, ⁽³⁹⁾ achou que o veneno de sapo contem uma pequena quantidade de methylcarbylamina, $C=N=CH^3$ a qual elle deve em parte o seu cheiro e sua toxicidade e principalmente o acido methylcarbylamino o isocyanetico $C=N, CH^2-(O\ OH)$, que pode ser reproduzido por synthese, tratando a glycocolla pelo acido formico. E' a esta reacção que no organismo do sapo, seria devida a formação da parte activa do veneno, visto o sangue d'este animal conter acido formico em pequena quantidade, como já haviam assignalado *Casali e Fornara* ⁽³⁸⁾. Este acido artificialmente preparado

se transforma em contacto com o ar em uma substancia deliquescente em que se separam gotticulas oleosas e pequenos crystaes, como se observa com o acido retirado do veneno natural. *Bufo* (⁴⁰) assignalou as propriedades reductoras do veneno de sapo que daria a diazo-reacção.

Segundo *Hewlet*, (⁴¹) o principio activo do veneno seria um alcaloide, possuindo todos os caracteres da digitalina. De uma especie de batrachio o *Bombinator igneus*, *Próscher* (²⁷) retirou, por maceração da pelle, uma substancia hemolytica, que se altera na temperatura de 56.°, sob a acção do alcool e dos acidos a qual denominou phrynolisina.

Fausto (¹) em um interessante trabalho já citado anteriormente (1902) analysa do ponto de vista chimico este veneno, tendo extrahido, por maceração de pelles de sapo no alcool, duas substancias,—a bufonina e a bufotalina. A primeira é um corpo crystalisavel em agulhas ou em prismas; seu ponto de fusão é 152, sua formula elementar $C^{34} H^{54} O^2$, C=82, 5 e H=10, 93, donde o peso molecular=494. Muito soluvel no benzol, no chloroformio, no alcool quente, pouco soluvel no ether, quasi insoluvel no alcool frio, insoluvel nos alcalis e nos acidos; sua reacção é neutra. Dissolvida no chloroformio, dá, pela addição de acido sulfurico, um anel vermelho escuro; pela agitação, o chloroformio toma a côr vermelha, enquanto que o acido torna-se fluorescente. Evaporada em uma capsula com acido chlorhydrico e um traço de perchlorureto de ferro, não dá a reacção da cholesterina.

A *bufotalina* de formula elementar $C^{34} H^{46} O^{10}$, corresponde a C=66, 45 % e H=7, 49 %, com peso molecular=614. Muito soluvel no chloroformio, no alcool, no acido acetico, na acetona, nos alcalis, insoluvel no ether de petroleo, pouco soluvel no benzol e na agua; tem reacção acida e dá com as bases saes, cujos solutos são alcalinos, ligeiramente opalescentes e muito amargos; precipitam pelo chloreto de Ba ou de Ca, pelos saes de cobre, e pelos oxydos de prata e de chumbo. Ao contrario da bufonina, a bufotalina não parece possuir o grupo hydroxila; aquecida em uma capsula com acido sulfurico, dá com o bromureto de Cal. uma coloração pardo avermelhada; precipita com o tanino; aquecida com o acido chlorhydrico, não dá coloração alguma.

A bufotalina, de acção physiologica semelhante a digitalina, deriva, segundo *Fausto*, da bufonina, por oxydação. A propria bufonina seria um derivado da cholesterina.

Este trabalho tem sido, com justa razão, criticado, principalmente, por haver preferido, este chimico notavel, trabalhar com a pelle do animal ao em vez de empregar o veneno natural, colhido directamente das glandulas, como seria mais logico e mais facil. Constitue, entretanto, notavel contribuição ao estudo da questão, permitindo orientar futuras pesquisas sobre a natureza e propriedades chemicas do veneno dos batrachios.

Bertrand, (⁴²) que repetiu a technica de *Fausto*, para obtenção das suas duas substancias, pensa que a bufonina não é um principio elementar novo, mas simplesmente cholesterina ordinaria, impurificada por substancias extranhas e pela bufotalina, que lhe dá uma fraca acção sobre o coração. Em collaboração com *Phisalix*, (²³)

este mesmo autor retirou do veneno de sapo, duas substancias. Uma seria a bufotalina semelhante a de Fausto, se bem que com formula differente— $C^{119} H^{111} O^{35}$ —de aspecto resinoide, incolor, da reacção neutra, muito soluvel no alcool, no chloroformio, na acetona e no acido acetico; pouco soluvel no ether e na agua distillada. Seria um veneno cardiaco. A outra substancia seria a bufotenina, muito soluvel na agua distillada e no alcool, de composição chimica desconhecida. Seria um veneno paralyzante.

Kobert, (26) confirma os resultados de Fausto. Para elle a bufotalina não é, nem glycoside, nem alcaloide, mas um acido. Tanto a bufotalina, como a bufonina seriam derivadas da cholesterina, modo este de ver que teria confirmação no facto de haver Fausto extrahido, de calculos biliares humanos, um derivado de cholesterina, possuindo acção analoga a da digitalina.

Pierotti, (28) pensa que o veneno deve sua actividade a um alcaloide e assignalou que o calor, a putrefacção, a dialyse, o alcool, o ether e outros agentes destruidores dos albuminoides, nenhuma acção tem sobre elle.

Lacerda, (33) em trabalho citado anteriormente, se occupou mui ligeiramente das propriedades physico-chimicas do veneno do nosso *Bufo-marinus* (*B. ictericus*), achando-o differente do das especies europeas, com aspecto cremoso, amarellado, inodoro, muito caustico, insoluvel no alcool a frio ou a quente, e na agua, com os quaes formaria apenas suspensões. Soluvel na acido chlorhydrico (sem coloração) no acido azotico (coloração violeta); e no acido sulfurico (coloração verde); com a potassa e a ammonia daria uma coloração rosea; insoluvel no acido acetico, na essencia de terebenthina, no ether, no chloroformio; enegreceria pelo acido chromico. De reacção fracamente acida. Ao microscopio apresenta-se sob a forma de granulações, que diminuem sob a influencia do acido acetico.

Segundo *Abel e Macht*, (34) o veneno do *B. marinus* conteria dois principios activos crystalisaveis, dos quaes um seria a *bufagina*, de formula $C^{18} H^{24} O^4$, alcaloide de acção semelhante a da digitalina e o outro a adrenalina, que entra na composição do veneno na proporção de 6, 72 % . E' a este ultimo corpo que seria devida a coloração azul esverdeada que tomam os instrumentos de aço ao contacto do veneno.

Shipley e Wislocki, (48) citado por *Swale Vincent*, (64) pensam que a adrenalina se forma, na glandula, a custa da tyrosina ou de um corpo visinho, por perda de CO^2 .

Novaro (13) assignalou que a secreção do *B. arenarum*, obtida por pressão das paratoides e dissecada, fornece cerca de 34 a 38 % de veneno secco no qual se encontra de 1 a 3, 5 por 100 de adrenalina, com as principaes reacções: perchloreto de ferro, acido iodico, etc.

IMMUNIDADE NATURAL OU ADQUIRIDA CONTRA O VENENO DOS BATRACHIOS:

Os conhecimentos sobre a resistencia natural ou adquirida de diversos animaes e do proprio sapo ao veneno, são confusos e contraditorios. Assim é que certos autores sustentam que o sapo é

completamente immune ao seu proprio veneno, emquanto que outros lhe teriam assignalado uma sensibilidade mais ou menos accentuada.

Vulpian (17) acreditava que o sapo era completamente refractario ao proprio veneno, sendo sensivel, entretanto, ao veneno do tritão e da salamandra. Mais tarde reconheceu, com *Claude Bernard*, (20) que esta resistencia do sapo ao proprio veneno, embora muito maior do que a dos outros animaes, não era comtudo absoluta. *Claude Bernard*, explica esta resistencia relativa por uma sensibilidade mais fraca das fibras musculares d'este animal.

Fornara, (21) consigna do mesmo modo a maior resistencia do sapo ao proprio veneno.

Physalix e Bertrand, (22) tendo registado a toxicidade do sangue do sapo, explicam a immunidade relativa d'este animal ao seu veneno, ao qual seria 500 vezes menos sensivel do que a ran (experiencia com a bufotalina) por uma secreção interna continua do veneno, trazendo como consequencia a tolerancia do individuo. Esta resistencia dos batrachios não se estabeleceria senão depois do desenvolvimento das glandulas e as larvas seriam muito sensiveis ao veneno da propria especie (experiencias com a salamandra); a semelhança physiologica do veneno e da digitalina explicaria igualmente a pouca sensibilidade do sapo a este toxico.

O. Heuser, (24) que estudou as diversas hypotheses admissiveis para explicar a resistencia do sapo aos venenos cardiacos, focalisa, por eliminação a da não receptibilidade do musculo cardiaco a estes venenos (immunidade local ou dos tecidos), ainda que não tenha conseguido demonstrar o facto, por falta de uma boa preparação. Esta resistencia se estende, além da digitalina, a physostigmina, a muscarina, a strophantina, a helleborina, a scyllipicrina e ao alcool; mas não ao baryum ao qual o sapo seria tão sensivel como a ran, por injeção subcutanea.

Fühner, (25) mostrou que a acção do veneno de sapo sobre o coração isolado do sapo e da ran é a mesma.

Hermann Wieland, (26) com o mesmo fim, servio-se da bufotalina preparada segundo o methodo de Fausto. Este trabalho sobre a importancia do calcium para a fraca sensibilidade do sapo aos venenos cardiacos, contem factos interessantes, entre os quaes, destaca-se o da medida da sensibilidade d'este animal ao seu proprio veneno. Dos factos expostos, pode se deduzir, embora não fosse esse o pensamento do autor, que o sapo, comquanto mais resistente do que a ran, ao seu veneno, está longe de possuir uma verdadeira immunidade, facto que as nossas pesquisas confirmaram, como adeante veremos.

IMMUNIDADE NATURAL DE OUTRAS ESPECIES DE ANIMAES AO VENENO DE SAPO:

Certos autores teriam observado a resistencia natural de certos animaes a este veneno, o que lhes permitiria fazer do sapo alimento habitual. Segundo *Vulpian*, (17) por exemplo as colubrideas podem engulir-o impunemente, assim como os patos e os ra-

tos commem-n'o, sem sentirem phenomenos de envenamento, emquanto que as rans, recebendo um pequeno jacto de veneno sobre o dorso, succumbem em poucas horas.

Mme. Physalix, (32) pretende que certos passaros e numerosas serpentes, particularmente a *Tropidonotus natrix*, digerem impunemente volumosos sapos, contendo em sua pelle uma dose de veneno capaz de matar muitos cães ou muitos gatos por via gastrica.

Affirma ainda que as rans e os batrachios visinhos, comquanto sensiveis ao veneno do sapo, o são comtudo muito menos, do que os vertebrados superiores. As nossas experiencias, como adeante veremos, não confirmaram em absoluto estes resultados.

IMMUNIDADE ADQUIRIDA CONTRA O VENENO DE SAPO:

Poucas tentativas de immunisação tem sido feitas, com o veneno natural, com extractos artificialmente obtidos e com outras secreções cutaneas, não tendo sido concludentes os resultados alcansados.

Prôscher, (27) teria obtido um sôro anti-hemolitico com as injeções repetidas de phrynolisina; mas este facto tantas vezes citado não nos leva ao conhecimento das propriedades antigenicas de verdadeiro veneno, pois aquella substancia é um producto artificial absolutamente differente do veneno granuloso.

M. e Mme. Physalix, affirmam ter immunisado diversos animaes com o veneno mucoso de varias especies de batrachios, sem contudo, em suas experiencias, indicarem, em detalhe, o methodo seguido, nem registrarem os respectivos protocollos, podendo acontecer que não se trate de immunidade contra o verdadeiro veneno e sim contra substancias toxicas, de natureza proteica, possuindo função antigenica, as quaes, como impurezas, podem acompanhar, em certas circumstancias, quer o veneno mucoso, quer o veneno granuloso. E' o que verificamos em uma especie de *Cystignathidae*, indigena, o *Pyxicephalus cultripes*. Com relação a immunisação contra o veneno granuloso de especies do genero *Bufo*, passam, em silencio, os autores, sem registarem resultados positivos ou quaesquer tentativas a respeito.

EXISTENCIA DE OUTRAS SUBSTANCIAS TOXICAS NOS SAPOS:

Além dos venenos granulosos ou mucosos tem procurado certos autores a toxicidade de outros humores ou tecidos do sapo.

Reza a tradição popular que este animal, quando irritado, póde projectar, a certa distancia, um jacto de veneno, tomando por este, a urina limpida emittida n'estas circumstancias. Antigos experimentadores, taes como *Rainey*, (19) *Davy*, (37) *Hautz*, (44) referem experiencias sobre este assumpto, fazendo notar a acção irritante d'este liquido, sem acção alguma geral. Entretanto, *Physalix* (23) pensa ter achado, na urina, uma parte do veneno, que passando das glandulas na circulação, a maneira de secreção interna, se elimina assim parcialmente, baseando-se na observação que fizera, da urina do sapo injectada no peritoneo, haver determinado a morte da ran, com symptomas semelhantes aos determinados pelo veneno granu-

loso. Para este autor, não só a urina, como o sangue, o sorô e a lymphá do sapo e de alguns outros batrachios, são toxicos pela existencia do veneno que pode parcialmente passar para a circulação.

OUTRAS ESPECIES DE BATRACHIOS ANOUROS RECONHECIDAS COMO VENENOSAS:

Fora do genero Bufo, tem-se reconhecido a existencia de secreções cutaneas venenosas em outras especies de anouros. Como os grupos estudados não pertencem, de modo geral, a nossa fauna, contentar-nos-emos em enumerar rapidamente as principaes especies estudadas com os caracteres geraes de seus venenos, sem entrar em maiores detalhes.

Mencionaremos, em primeiro lugar, o *Discoglossus pictus*, que tem a pelle quasi lisa como a ran ou apenas salpicada de finas granações. O veneno granuloso, d'esta especie, é de difficil obtenção e não foi estudado. O veneno mucoso, segundo *Dehaut e Mme. Physalix*, ⁽⁴⁵⁾ seria pouco irritante para as mucosas, mas muito toxico por via parental, determinando no começo convulsões e depois paralysisa. Seria claramente myotico e diastolico, mas sem acção coagulante ou hemolytica. O sôro d'esta especie seria igualmente toxico.

Alytes obstetricans, pequeno batrachio com a pelle completamente coberta de granações, tem, segundo *Physalix*, o veneno muito irritante e muito toxico, de acção paralysante e diastolica. O extracto de ovos de alytes seria toxico para a ran, para equenos passaros e seria dotado de forte acção necrosante local. O veneno granuloso d'esta especie não foi estudado.

O veneno mucoso de *Pelobates cultripes*, seria, segundo *Mme. Physalix e Dehaut*, ⁽⁴⁶⁾ pouco toxico, determinando lentamente a morte do rato e da ran.

O *Pelobates fuscus*, foi estudado por *Sauvage*, ⁽⁴⁷⁾ que verificou a actividade toxica e irritante da secreção mucosa.

Gidon, ⁽⁴⁸⁾ fez varias experiencias, com a secreção cutanea da *Hyla arborea* (Europa) sobre a ran e o rato, tendo verificado a acção nauseante, paralysante sobre o coração, que pára em diastole.

Segundo *Camis*, ⁽⁴⁹⁾ o *Leptodactylus ocellatus* é completamente refractario a acção do curare. *Houssay e Hug*, ⁽⁵⁰⁾ attribuem este resultado ao emprego de um curare impuro, tendo verificado, entretanto, que este batrachio, sem ser inteiramente refractario, é muito mais resistente a acção do curare, do que a ran europea e do que o *Bufo marinus*. Observaram, além disso que a minima curarisante corresponde a dose minima mortal, de sorte que o animal curarisado morre fatalmente dentro de algum tempo, ao envez de se restabelecer, como acontece com a *Rana esculenta* ou com o *Bufo marinus*.

O Dr. *Lutz*, ⁽⁵¹⁾ assignalou a acção irritante do mucus da *Leptodactylus pentadactylus*.

P. Bert, ⁽⁵²⁾ foi o primeiro experimentador, que consignou o producto da raspagem da pelle da *Rana esculenta* como toxico para os passaros e muito irritante, quando applicado sobre as mucosas.

A. Dutartre, ⁽⁵³⁾ confirmou estes resultados, emquanto que

Gidon, (48) teria observado que o mucus d'esta especie exerce acção diastolica. *Kobert*, (26) duvida do valor d'estes resultados.

Dehaut, (31) affirma que a *Rana temporaria* é desprovida de secreção toxica; mas *Mme. Physalix* cita trabalhos de *Leroy*, (54) segundo os quaes, o extracto alcoolico da pelle d'esta especie, conteria uma substancia de propriedades analogas ás da bufotalina.

A *Dendrobates tinctorius*, pequeno batrachio arboricola, posue segundo o testemunho de varios autores e viajantes uma secreção cutanea das mais activas, utilizada pelos indios do chaco columbiano, como veneno para suas flexas. *Saffray*, citado por *Alexandre Pagenstecher*, (55) diz que os indios apanham, por meio de uma folha, as *Dendrobates*, para evitar o contacto caustico de sua secreção cutanea e depois de as haverem espetado em um pedaço de madeira, aproximam-n'as do fogo. Os animaes, sob a acção do calor, cobrem-se de abundante secreção, que é colhida para ser applicada ás pontas das flexas. Um pequeno veado ferido por uma d'estas flexas morre em poucos minutos; o mesmo acontece ao tigre.

Escobar, (56) publicou em 1869 uma nota sobre este veneno, mas o trabalho de *Posada Arango*, (57) escripto um anno antes, é muito mais completo. Tratando o veneno pelo alcool, este ultimo autor obteve uma substancia alcaloidica, dotada das mesmas propriedades do veneno total, tendo verificado igualmente que ambos eram destituídos de acção por via gastrica.

Baseando-se sobre a opinião de varios autores, *Kobert*, (26) pensa que a acção d'este veneno é muito semelhante á do curare.

SEGUNDA PARTE

PESQUIZAS

Daremos aqui o relatório de nossas pesquisas sobre as quatro principaes especies do genero Bufo, que se encontram no Brazil, e sobre alguns outros batrachios que tivemos a oportunidade de examinar.

Em muitos pontos, differem os nossos resultados dos que foram registados, pelos experimentadores europeus, o que pode ser attribuido a diversidade das especies estudadas e, em alguns casos, aos methodos artificiosos para obtenção dos venenos ou as substancias d'elle derivadas.

O genero Bufo tem representantes em todas as partes do mundo, com excepção unica de algumas ilhas do oceano Pacifico. Segundo *Nieden*, ⁽⁵⁸⁾ encontram-se no Brazil sete especies de Bufo a saber: *B. marinus*, L.; *B. typhonius*, L.; *B. missionum* Blg.; *B. arenarum*, Hensel; *B. d'Orbigny*, D. e B.; *B. crucifer*, Wied; *B. granulatus*, Spix.

A estas é necessario juntar mais duas especies recentemente descriptas pelo Dr. Lutz: ⁽⁵¹⁾—O *B. paracnemis* e o *B. rufescens*.

As especies, d'este genero que estudamos foram: o *B. marinus*, o *B. paracnemis*, o *B. arenarum* e o *B. crucifer*.

B. marinus, tambem designado por *B. aqua*, Seba ou *B. ictericus* Spix, é uma especie de grande tamanho e muito commum no Brazil. Temos exemplares de differentes pontos do Estado de S. Paulo, do Paraná, de Santa Catharina, do Rio Grande do Sul, de Minas Geraes e do Rio de Janeiro. O dimorphismo sexual, n'esta especie é muito accentuado.

Femea: Comp. 16^c; patas post. 20^c; patas ant. 11^c,5; cabeça 5^c; paratoides 4^c. A cabeça é bem desenvolvida, as paratoides ovaes. A côr geral é cinza amarellada, com numerosas manchas negras, formando um desenho irregular sobre o dorso e uma faixa mediana dorsal clara. A face ventral é de um branco sujo com manchas escuras assaz numerosas. O colorido e o desenho variam muito n'esta especie; alguns exemplares são extremamente escuros, com faixa mediana clara e faixa semelhante sobre as faces lateraes.

Macho: Menor do que a femea, medindo:—comp. 13^c; patas post. 13^c, 5; patas ant. 7^c; cabeça 4^c; paratoide 3^c. A cor geral é amarello esverdeada. Toda a face dorsal é coberta de pequenas papillas.

A face ventral é amarello claro com manchas pardas mais ou menos visiveis.

B. arenarum. Especie menor do que a precedente, assaz semelhante no colorido e muito menos commum do que ella.

B. paracnemis, Lutz. Esta especie fôra até aqui confundida com o *B. marinus*, do qual se destingue, entretanto, por caracteres bem salientes. Attinge a um tamanho maior do que o do *B. marinus*, apresenta um dimorphismo sexual muito menos accusado; o aspecto geral é mais volumoso, a cabeça mais curta, as paratoides menos salientes si bem que do mesmo comprimento, terminadas em ponta posteriormente; as patas relativamente menos longas. A côr geral é de um cinza-esverdeado, com algumas manchas escuras no dorso, que não formam um desenho como na especie com a qual o comparamos. A face ventral é de um cinza esbranquiçado, salpicado de pequeninas manchas escuras. O macho e a femea têm grandes papillas dorsaes, largas principalmente numerosas na parte mediana do dorso. O macho não se distingue da femea senão por papillas da mesma natureza, mas um pouco mais abundantes e principalmente pela presença de um sacco vocal, muito desenvolvido e cujos tegumentos são mais pigmentados do que o resto do ventre.

Femea: comp. 20^c; patas post. 19^c; patas ant. 11^c; cabeça 4^c,7; paratoides 6^c.

Macho: comp. 18^c,5; patas post. 18^c,5; patas ant. 9^c,5; cabeça 4^c,8; paratoides 5^c.

Esta especie é muito commum em todo o Estado de S. Paulo e Sul de Minas Geraes.

B. crucifer. Especie muito facil de se distinguir da precedente, por seu tamanho muito menor, suas paratoides muito reduzidas e uma linha escura, de bordos claros, situada no dorso, no sentido longitudinal. A côr geral da femea é de um cinzento pardo; a do macho amarello esverdeado. O ventre é cinza claro, salpicado de pontilhados escuros. A pelle da femea é coberta de finas granulações e a do macho de glandulas um pouco mais desenvolvidas.

Macho: comp. 6^c,5; patas post. 9^c,2; patas ant. 4^c; cabeça 2^c,2; paratoides 0^c,8.

Femea: comp. 10^c; patas post. 11^c,5; patas ant. 3^c,5; cabeça 3^c; paratoides 1^c,3.

E' uma especie commum no Estado de S. Paulo e nos Estados visinhos.

CAPITULO I

LOCALISAÇÃO DO VENENO. — ESTRUCTURA DAS GLANDULAS:

A secreção de veneno dos batrachios, elemento de defesa puramente passivo, é elaborada por formações glandulares dessiminadas por toda a superficie tegumentaria ou reunidas sobre certos pontos em saliencias mais ou menos volumosas.

No genero Bufo, estas glandulas são, de ordinario, extremamente numerosas, contribuindo para dar a estes animaes seu aspecto aspero e repugnante. O numero, a distribuição e a forma d'estas glandulas são extremamente variaveis, segundo a especie, o sexo e algumas vezes segundo os individuos. Nos machos do *B. marinus* e do *B. arenarum*, toda a superficie dorsal é coberta por granulações ou papillas muito numerosas e pequenas; nas femeas estas granulações são maiores e mais juntas.

Em todas as especies de Bufo, porém, observam-se em certos pontos da pelle, conglomerados de glandulas particularmente desenvolvidas. O mais importante d'estes, situado atraz da membrana do tympano, obliquo de dentro para fora, recebeu o nome muito improprio de parotidas ou melhor de paratoides (Boulenger), ainda que não tenha relação alguma com o aparelho digestivo. As paratoides são particularmente volumosas no *B. Marinus*, menos desenvolvidas no *B. paracnemis* e muito reduzidas no *B. crucifer*.

Além d'este grupo de glandulas, certas especies apresentam outros igualmente notaveis, como o tibial posterior, situado ao longo da tibia das patas posteriores e muito desenvolvido na femea do *B. marinus* e do *B. paracnemis*.

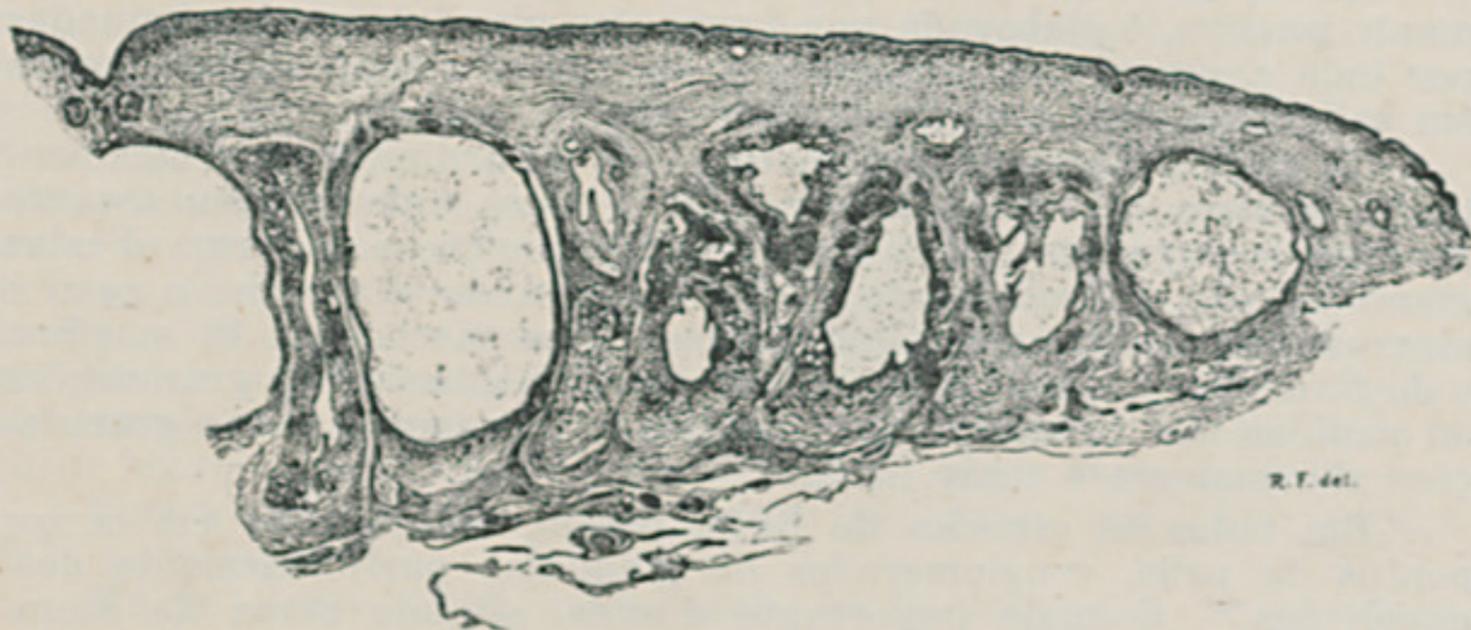
Todas estas verrugosidades têm a sua superficie crivada de pequenos orificios ou poros, que representam o papel de canaes excretores do veneno. Uma pressão exercida sobre estas glandulas faz saltar pequenas gottas ou jactos de uma substancia cremosa ou leitosa (veneno) que, em certas circumstancias, podem ser projectadas com força a mais de 40^c de distancia.

Leydig, (⁵⁹) que foi o primeiro a fazer um estudo detalhado sobre a estrutura comparada dos tegumentos d'estes animaes, distingue, além das glandulas de veneno propriamente ditas, trez typos de glandulas, das quaes sómente duas se encontram nos batrachios do genero Bufo: pequenissimas glandulas redondas, muito numerosas, principalmente na superficie do animal mesmo sobre as paratoides, mas isoladas na face ventral; são as glandulas mucosas d'*Engelmann*, assim chamadas, por este autor, para as distinguir das glandulas de veneno ou granuladas;—finalmente, glandulas, formando nos dedos dos machos de muitos batrachios, e por vezes em outras partes do corpo, excrescencias corneas, de existencia transitoria, as excrescencias ou escovas nupciaes.

Nem todos os herpetologistas se acham de accordo em admittir estes diversos typos de glandulas. Assim *Calmels*, (⁶⁰) as filia a

um mesmo typo, cujo epithelio se differencia posteriormente, para o desempenho de funcções especiaes.

Um corte macroscopico de uma paratoide de *B. marinus*, revela uma massa eliptica de contorno superior irregular, bosselada, limitada pela epiderme, cavada de largas cavernas ovaes ou elipticas, perpendiculares a superficie da paratoide, e podendo attingir a 2—2,5 m. m. ou mais de diametro; são os accinos glandulares. A um



Corte de paratoide de *Bufo marinus*.

Augmento 6 X

fraco augmento estes accinos apparecem alojados na espessura do derma; alguns dentre elles são bem desenvolvidos, outros de formas irregulares, murchos, com as paredes em parte destruidas, deixando entre os tecidos visinhos, soluções de continuidade, onde se vêm numerosos leucocytos e hematias; são os accinos tendo já expulso o respectivo veneno e em via de destruição. Os accinos não alterados possuem membrana de natureza muscular lisa, sobre a qual repousam numerosos nucleos, sem que exista verdadeira camada epithelial continua; o interior dos accinos é occupado por uma secreção finamente granulosa, o veneno já elaborado. *Rainey* (19) foi o primeiro a assinalar a formação do veneno por fusão dos nucleos cellulares, o que permite classificar estas glandulas no grupo das *holocrinas*. O acino é cercado de fibras musculares lisas, parallelas a suas paredes, se espessando em seu polo superior, onde formam um verdadeiro esphincter, descripto pela primeira vez por *Schultz*, (66) o qual se oppõe a sahida do veneno, explicando a projecção violenta d'este, quando se faz pressão sobre as paratoides; tambem, no estado de repouso, o canal excretor, em sua parte inferior, intradermica, é difficilmente reconhecivel; em sua parte superior, intra epidermica é constituido por uma penetração das cellulas da epiderme, sem indicação de revestimento proprio. O acino é cercado de uma riquissima rêde de capillares sanguineos e tambem segundo *Ranvier* (61) de lymphaticos e de nervos.

Na parte superior do derma, existem numerosas glandulas, pequenas, arredondadas, providas de um canal excretor muito distin-

cto: são as glandulas mucosas; são formadas de membrana propria, forrada de um epithelio cylindrico, cujas cellulas inferiores são muito altas e diminuem de altura para o polo da glandula; seu conteudo é hyalino, sempre desprovido de granulações.

A origem e o renovamento das glandulas têm sido muito discutidos. Segundo a maior parte dos autores, *O. Seeck*, ⁽⁶⁷⁾ *Maurer*, ⁽⁶⁸⁾ *Ancel*, etc. ⁽⁶⁹⁾ as glandulas mucosas e granulosas, teriam origem no ectoderma e desenvolver-se-iam independentemente. Segundo *Mme. Physalix* ⁽³²⁾, sua origem seria antes a folha superior do mesoderma. Para alguns autores, as glandulas granulosas derivam das glandulas mucosas, das quaes são typos diferenciados. Alguns histologistas, entre os quaes recentemente *Shiplely* e *Wisloki* ⁽⁴³⁾ pensam que depois de haver expulso o seu conteudo, o acino granuloso se reabsorve pouco a pouco, sendo substituido por um novo acino formado a custa dos bulbos situados na base do antigo sacco. Outros autores não acreditam no desaparecimento das antigas glandulas, admittindo antes que ellas sejam capazes de reformar o seu conteudo. Não sendo nossa intenção fazer o estudo histologico e embryologico das glandulas, para o que nos falta certamente a competencia de especialista, limitar-nos-emos a ligeira exposição que ahi fica, documentada por cortes de paratoides de *B. arenarum*, que a nosso pedido, fez o Dr. *Dorival de Camargo Penteado*.

Uma questão importante do ponto de vista pratico, é o mechanismo da expulsão do veneno. Dada a disposição das fibras musculares lisas em torno dos acinos das glandulas, a expulsão do veneno não se subordina a vontade do animal; de sorte que o sapo não pode, nas condições ordinarias, lançar a distancia seu veneno; com a pressão exercida sobre as glandulas, a resistencia das fibras musculares vencida, surge o veneno do poro excretor. Tratando-se de um conglomerado volumoso de glandulas, como nas paratoides, em que as fibras musculares são abundantes, offerecendo consequentemente maior resistencia, uma forte pressão exigida para esta ser vencida, projectará com violencia o veneno a certa distancia do animal. E' o que acontece quando se colhe o veneno das paratoides por pressão sobre estas; o veneno é muitas vezes projectado a mais de 50^c podendo alcançar os olhos do operador. O mesmo resultado pode-se produzir, quando se toma o corpo de um sapo em extensão forçada; a pressão é exercida, n'este caso, sobre as paratoides pela forte tensão da pelle circumvisinha a localização das glandulas.

Certas excitações chimicas, podem, por acção reflexa, provocar a excreção do veneno, que n'estas condições, vem sempre acompanhado por maior dose de secreção mucosa.

Ekhard, ⁽⁵²⁾ demonstrou que a excitação electrica dos nervos produz uma abundante secreção de veneno, emquanto que *Weiss*, ⁽⁵³⁾ notou que a secção dos nervos impede mesmo a sua formação. *Physalix* ⁽²³⁾ de collocação com *Contrejean* ⁽¹³⁾ obteve igualmente uma forte secreção de veneno e de mucos por excitação electrica dos lobos, opticos, mas a injeccão de pilocarpina, não produzia, segundo este autor, senão a secreção mucosa.

Segundo *Kobert*, (26) existiriam, na medulla, outros centros de excitação da secreção glandular. O chloreto de baryo produzia uma secreção generalizada do veneno, emquanto que o curare a paralyzaria. A atropina seria inactiva.

O interesse d'estas pesquisas é puramente theorico, pois o melhor meio de obter-se o veneno, é o que empregamos, pela compressão das paratoides ou dos conglumerados das glandulas tibias posteriores.

CAPITULO II

PROPRIEDADES PHYSICO-CHIMICAS DO VENENO

Extrahido das paratoides, o veneno se apresenta sob o aspecto de um liquido muito espesso, leitoso ou cremoso, de côr branco puro (*Bufo marinus*) ou amarello carregado, (*Bufo paracnemis*) de cheiro fortemente aliaceo no *B. crucifer*, e quasi inodoro nas outras especies estudadas.

A variação de consistencia, que se observa de um para outro individuo, ou até no mesmo exemplar, nas differentes extracções, parece subordinada ao gráo de elaboração da secreção, notando-se que ella se apresenta, de ordinario, muito mais fluida depois de numerosas extracções, podendo mesmo reduzir-se a um liquido opalescente, quasi desprovido de toxicidade.

Em contacto com o ar, secca-se rapidamente transformando-se em uma massa dura translucida, de aspecto corneo ou resinoide. Na estufa a 37° essa seccação se faz rapidamente, reduzindo-se a 1/3 do peso do veneno fresco.

A reacção dos solutos em agua distillada, ou sôro physiologico, é fracamente acida ao tournesol; nas soluções feitas em agua de cal é neutra.

Recentemente extrahido das glandulas, dissolve-se lenta, mas completamente em agua distillada. E' menos soluvel no sôro physiologico ou nas soluções salinas fracas, incompletamente soluvel no alcool absoluto, no ether, no chloroformio, na acetona, no oleo de oliva e na glycerina.

O veneno secco se dissolve com muito mais difficuldade.

Bufo marinus—As soluções em agua distillada, são de aspecto gommoso, opalescente, tomando, depois de algum tempo, um bellissimo tom roseo, que se transforma em côr pardacenta pelo envelhecimento. Esta mudança de côr que se opera lentamente, na temperatura Normal, dá-se rapidamente pelo aquecimento em temperatura elevada ou pela esterilisação a 120°.

As soluções aquosas filtram em papel com certa difficuldade, perdendo sua opalescencia pela simples addição de um pouco de alcool ou de ether.

Na agua de cal, o veneno se dissolve com muito mais difficuldade, tomando mais rapidamente, depois de filtradas as suas soluções, a côr pardacento escura, com separação de um precipitado escuro.

Afim de determinar o gráo de solubilidade no alcool absoluto, no ether, no chloroformio e na acetona, realisamos numerosas experiencias, tanto com o veneno fresco como com o veneno secco. No intuito, porém, de eliminar a causa de erro attribuível á agua do proprio veneno, mencionaremos apenas a mais rigorosa d'estas experiencias, realisada com o veneno cuidadosamente seccado:

—5 de Maio de 1925.—Em uma serie de frascos, põe-se em contacto 100 c. c. de cada um destes dissolventes com 1 gramma de veneno secco; a 15 de Maio, depois de 14 dias de contacto, filtra-se o conteudo de cada um dos frascos, evaporando-se-o separadamente. O residuo secco e pesado para cada dissolvente foi o seguinte:

Alcool absoluto: (rigorosamente deshydratado). Em 2 dias de contacto, o alcool toma uma côr amarella que escurece progressivamente; o residuo secco, apresenta-se sob o aspecto de laminas pardas avermelhadas, pesando 142,5 mg.

Ether: Mudança alguma na côr do dissolvente; residuo de aspecto oleoso, amarellado, pesando 30 mg.

Chloroformio: Residuo de aspecto oleoso, pesando 15 mg.

Acetona: Residuo oleoso, amarello, pesando 12 mg.

O veneno dissolvido e retomado respectivamente por novas e iguaes porções dos dissolventes, renovados de 15 em 15 dias. A 21 de Novembro a quantidade global de veneno, dissolvido pelo alcool, era de 250 mgs. e um anno depois, a contar do começo da experiencia, se elevava a 290 milligs.

As soluções aquosas de veneno, não coagulam, nem pelo calor, nem pelo reactivo de Esbach, nem pelos outros precipitantes da albumina; dão, entretanto com alguns agentes chimicos reacções coloridas que vamos registrar:

Com o acido azotico fumegante em excesso, as soluções aquosas diluidas a 2 ‰ dão uma coloração violeta clara; com soluções concentradas a 1 ‰, uma coloração vermelha intensa, que desaparece dentro de algumas horas a frio, mais rapidamente a quente. Esta reacção permite revelar a presença de quantidades minimas de veneno.

1 c. c. de HAZO	+	mais 1 milligr. de veneno	—	coloração violeta carregado	em 1 min.					
»	»	»	»	0,5	»	»	»	claro	»	»
»	»	»	»	0,15	»	»	»	muito claro	»	»
»	»	»	»	0,1	»	»	»	fraco	»	»
»	»	»	»	0,05	»	»	»	clara em 5 minutos		
»	»	»	»	0,01	»	»	»	ligeira coloração violeta em 30	»	»

Com o acido sulfurico concentrado e solução fraca de veneno a 2 ‰, coloração violeta esverdeado claro; com a solução forte a 1 ‰ annel amarello, depois verde claro, verde carregado e roxo; por agitação todo o liquido, torna-se roxo. Estas reacções são estaveis.

Fausto e Kobert indicaram para o veneno do sapo da Europa, a reacção que Salkowski descobriu para cholesterina. Em consequência da fraca solubilidade do veneno das nossas especies, no chloroformio, não obtivemos senão um anel amarello no limite do chloroformio com o acido sulfurico e uma coloração amarella mais ou menos accentuada do acido. Moodificamos então do modo seguinte esta reacção; o veneno fresco é collocado em uma capsula com o chloroformio; depois de haver rejeitado o excesso d'este liquido, ajuntam-se algumas gottas de acido sulfurico; produz-se então coloração amarella-esverdeada, depois verde mais carregado no acido, emquanto que o veneno se tinge em azul esverdeado. Nas mesmas condições a cholesterina se tinge de vermelho vivo e o acido torna-se verde-fluorescente.

Uma outra reacção muito mais sensível do que a precedente é a que se obtem com o sulfato de ferro. Com um traço d'este reactivo, as soluções de veneno apresentam uma bella coloração violeta sombria, que desaparece lentamente a frio e rapidamente a quente. Um ligeiro excesso de reactivo produz apenas um precipitado amarello esverdeado, mais ou menos abundante. Esta reacção permite revelar traços de veneno inferiores a 0,01 mg. E', porém, muito delicada em manejar, podendo ser embaraçada ou impedida por impureza, mesmo em quantidades infimas.

Com uma solução de molybdato de ammoneo, obtem-se uma coloração amarella; si a esta mistura junta-se um pouco de acido sulfurico concentrado, obtem-se rapidamente um anel azul escuro; pela agitação, todo o liquido torna-se azul intenso. Esta reacção é das mais sensiveis.

Com o acido chlorhydrico, e acido acetico a frio ou a quente, não ha reacção.

Com a solução normal de soda ou com ammoniaco, as soluções de veneno perdem a opalescencia e tomam uma coloração amarellada.

O nitrato de prata em contacto com a solução de veneno reduz-se rapidamente, com a formação de prata colloidal. Com a tintura de iodo a frio, abundante precipitado, solúvel a quente, tornando-se a solução de côr vinhosa; pelo resfriamento reaparece o precipitado. Com o sulfato de cobre coloração verde.

Algumas gottas de solução de acido chromico provocam um abundante precipitado amarello. Com o perchlorureto de ferro precipitado solúvel em um excesso de reactivo. Não precipita com o acetato de chumbo, nem com o hyposulfito de sodio. O veneno possui propriedades reductoras muito energicas. A solução de permanganato de potassio a 1 ‰ é rapidamente descorada.

1 c c. de sol. de veneno a	1/1000	mais 5 gottas de	MnO ⁴ K a	1/1000-	Descoloração imme.
» » » » »	1/10000	» » » » »	» » » » »	» » » » »	» » » » »
» » » » »	1/100000	» » » » »	» » » » »	» » » » »	» em 30 min.
» » » » »	1/1000000	» » » » »	» » » » »	» » » » »	» em 1 hora e 30 miinutos

Bufo paracnemis.—O veneno, in natura, é amarello alaranjado; as soluções ligeiramente coloridas de amarello. As proprie-

dades geraes de solubilidade, mudança de côr sob a influencia do tempo, do calor,, etc., são identicas as do *B. marinus*; algumas reacções são, entretanto, differentes: A solução fraca de veneno a 2 ‰, dá com acido azotico, coloração violeta pallido, quasi roseo; a solução forte a 1 ‰ com o mesmo reactivo dá coloração vermelho intensa semelhante a do *B. Marinus*, desapparecendo igualmente, em algumas horas, a frio e mais rapidamente a quente. Com o acido sulfurico concentrado, a solução fraca a 2 ‰ dá uma bella coloração verde claro; com a solução, forte a 1 ‰, annel amarello, depois vermelho de mais a mais intenso, communicando-se a todo o liquido; estas côres são estaveis. Na reacção de Salkowsky, modificada, como já o indicamos, o veneno toma a côr rosea, passando ao vermelho, emquanto que o acido se torna verde amarellado e depois verde carregado. Com o molybdato de ammonio e o acido sulfurico, dá coloração verde claro, reacção esta extremamente sensivel.

Bufo arenarum e *Bufo crucifer*.—As reacções com o veneno d'estas duas especies, não foram estudadas em detalhe. Verificamos, entretanto, que as principaes reacções são identicas ás do veneno do *B. marinus*.

CAPITULO III

ACÇÃO PHYSIOLOGICA

Emquanto que os venenos das serpentes, das aranhas e dos escorpiões, de natureza albuminoide, agem exclusivamente por via parental, o veneno do sapo é dotado da propriedade de penetração rapida através de todas as mucosas, podendo determinar por essa via, em quasi todas as especies animaes, a morte, com a mesma energia de acção que a determinada por injeções subcutanea ou endo-venosa.

O modo particular de acção d'este veneno, sua differenciação das outras peçonhas, tanto por sua natureza chimica, como por sua resistencia aos agentes physico-chimicos, imprimem-lhe uma característica especial, da qual resulta, como nota principal, a sua adaptação aos fins da defeza do animal contra os seus inimigos naturaes. De facto não foi para ser injectado que a secreção toxica do sapo foi creada; foi especialmente para actuar sobre as mucosas, no momento do animal ser atacado, que a natureza lhe deu esse potente aparelho protector representado pelo conjuncto de glandulas disseminadas pela superficie cutanea.

Foi procurando nos aproximar das condições naturaes de acção do veneno, que mais attenção prestamos ao estudo d'este, por via mucosa, o que nos permittio assignalar factos extremamente interessantes.

Assim, depois de indicar as propriedades physiologicas d'este veneno e de estudar rapidamente sua acção por via parental, determos-emos mais especialmente em relatar as nossas pesquisas sobre a sua acção atravez das mucosas.

PROPRIEDADES GERAES DO VENENO:

E' um veneno essencialmente neuro-toxico, provocando a principio, uma phase curta de agitação, seguida de depressão, depois de paralytia, no começo posterior, quando o veneno é introduzido na circulação geral, de violentas convulsões tonicas e de morte por parada da respiração.

Uma forte tachycardia inicial e aceleração consideravel dos movimentos respiratorios constituem a regra; mas o coração é o ultimo órgão paralytado, só parando depois da cessão completa dos movimentos respiratorios. Observa-se sempre forte hypersecreção salivar, lacrymal e nasal, nauseas, vomitos nos animaes susceptiveis d'este reflexo, diarrhéa, myosis muito accusada das pupillas, hyperthermia de 1 a 2 grãos, seguida de hypothermia tardia, morrendo o animal em quasi estado de algidez.

As injeções hypodermica ou intramuscular determinam sempre forte edema hemorrhagico, acompanhado de vasta necrose local.

A dose minima mortal, para uma especie dada, por via endovenosa, differe pouco da minima mortal por via intramuscular; mas a morte é ordinariamente muito mais lenta no segundo caso. Com uma dose elevada de veneno a morte pode ser fulminante, sem que haja tempo de observar os symptomas habituaes. Com uma dose um pouco inferior a minima mortal, os animaes se restabelecem depois de apresentar phenomenos graves, entre os quaes o de paralytia quasi completa.

A acção physiologica do veneno, das quatro especies estudadas, é sensivelmente a mesma, e comquanto as nossas experiencias tenham sido realisadas principalmente com o de *B. marinus* e o de *B. paracnemis*, temos verificado os pontos mais importantes de nossas pesquisas com o veneno de *B. arenarum* e *B. crucifer*.

EXPERIENCIAS POR VIA PARENTAL NOS PRINCIPAES ANIMAES DE LABORATORIO:

Pombo:—por injeção endovenosa, no pombo, observa-se uma phase curta de estupor, depois o animal vacilla, deita-se e tomado de uma violenta crise de convulsões tetaniformes, com opisthotonus, rola muitas vezes sobre si mesmo e succumbe em alguns minutos. Si a dose é inferior a minima mortal, consegue ainda voar, ou pou-sar, entretanto, cambaleia, deita-se, é tomado de violentos accessos de tosse e de esforços para vomitar; depois, melhora aos poucos para se restabelecer em seguida.

Veneno fresco dissolvido em agua distillada completado o volume de 2 c. c. por sôro physiologico:

Pombo 89—Recebe 2,5 mg. em 2 c. c. por via venosa. Morte em 1 minuto.

Pombo 140—Recebe 1,25 mg. em 2 c. c. por via venosa. Vacilla e cahe quasi que immediatamente, nauseas, vomitos; começa a melhorar ao fim de 10 minutos, restabelecendo-se no fim de duas horas.

Pombo 27—Recebe por via intramuscular 2,5 mg.; não se observam symptomas immediatos; no dia seguinte apresenta forte edema hemorragico, fetido na região circumvisinha ao ponto de inoculação; morte em menos de 24 horas.

Com veneno secco, dissolvido em sôro physiologico, os resultados são perfeitamente comparaveis aos precedentes:

Pombo 99—Recebe 0,5 mg. em 2 c. c. na veia; violentas crises tetanicas, morre em convulsões em dois minutos.

Pombo 136—Recebe 0,3 de mg. em 2 c. c. na veia; logo depois cambaleia e deita-se; vomitos repetidos. Restabelece-se no dia seguinte.

Pombo 157—Recebe, 0,2 de mg. em 2 c. c. na veia; logo após a injeção deita-se, vomita restabelecendo-se no dia seguinte.

Pombo 102—Recebe 0,5 mg. em 2 c. c. por injeção intramuscular; nenhum symptoma immediato; na manhã seguinte grande edema local hemorragico; morte.

Coelho—O coelho é igualmente muito sensivel a este veneno; os symptomas são muito semelhantes aos observados no pombo; depois de uma phase de estupor começa uma serie de violentas convulsões e crises tetaniformes, em que o animal deitado de lado, pode apresentar o corpo violentamente dobrado em arco de circulo; depois da emissão de gritos agudos, morre o animal.

Veneno fresco dissolvido em agua distillada:

Coelho 28—peso 1000 grs.—Recebe 2,5 mg. em 2 c. c., na veia. A principio triste e immovel; depois forte periodo de excitação, normalizando-se ao fim de duas horas.

Coelho 21—peso 1050 grs.—Recebe 5 mg. em 2 c. c. na veia; morte em 3 minutos.

Coelho 11—peso 950 grs.—Recebe 1,5 mg. na veia; morte em 1 ½ minuto; forte constricção pupillar.

Veneno secco dissolvido em sôro physiologico:

Coelho 6—peso 1200 grs.—Recebe 2 mg. em 2 c. c. por injeção endovenosa. Convulsões muito violentas, morte em 2 minutos.

Coelho 88—peso 1000 grs.—Recebe 1 mg. em 2 c. c. na veia; paralytico, dyspneico, cahe sobre o flanco. Uma hora depois procura levantar-se; tres horas depois apenas paresia posterior; completamente restabelecido na manhã seguinte.

Coelho 52—peso 1800 grs.—Recebe 1,5 mg. na veia, em 2 c. c.; paralyisia quasi que immediata; na manhã seguinte ligeira paresia posterior; normal em 48 horas.

Cobaio:—Animal assaz sensivel; depois da injeção intramuscular, dôr mais ou menos intensa, segundo a dose, dôr que o animal manifesta por gritos e por agitação; depois sobrevem edema consideravel, morrendo o animal em 24 horas com doses visinhas das m. mortaes.

Veneno fresco dissolvido em agua distillada:

Cobaio 9—peso 350 grs.—Recebe 2,5 mg. em 2 c. c. por injeção intramuscular na coxa, dôr intensa 5 minutos depois da injeção, acalmando-se lenta e progressivamente. O animal sobrevive, sem outro symptoma, além de um ligeiro edema local, sem ulceração.

Cobaio 15—peso 370 grs.—Recebe na coxa, por injeção intramuscular, 5 mg. em 2 c. c. Dôr seguida de ligeira asthenia. Encontrado morto na manhã seguinte, com um edema volumoso no lugar da injeção.

Veneno secco dissolvido em sôro physiologico:

Cobaio 27, peso 310 grs.—Recebe 1 mg. na coxa; gritos, forte agitação; na manhã seguinte edema notavel, reabsorvendo-se, sem ulceração.

Cobaio 121, peso 340 grs.—Recebe 2 mg. na coxa; edema muito forte, durante 48 horas curando-se sem necrose.

Ratos brancos e camondongos:—Os symptomas são semelhantes aos observados no cobaio: dôr forte, seguida de asthenia, edema consideravel e morte lenta.

Rato branco 3—peso 60 grs.—Recebe 0,5 mg. de veneno secco dissolvido em 2 c. c. de sôro physiologico, por injeção intramuscular; agitação immediata e pequeno edema local, sem necrose. Sobreviveu.

Rato branco 5—peso 54 grs.—Recebe 2 mg. de veneno secco em 2 c. c. de sôro physiologico, por injeção intramuscular; forte edema começando de 4 a 5 horas depois de injeção; morte em 48 horas.

Camondongo, peso 25 grs.—Recebe 0,5 mg. em 1 c. c. de sôro physiologico por injeção intramuscular; dyspnéa, paresia, e depois paralysisia; normal na manhã seguinte. (1).

Os animaes de sangue frio; são igualmente sensiveis a este veneno por via intramuscular. Mencionaremos apenas duas experiencias feitas com a cascavel—*Crotalus terrificus*.

Crotalus terrificus de 40 c. de comprimento.—Recebe 2 mgs. de veneno, em 1 c. c. por injeção intramuscular; ligeira phase de excitação, paresia; 3 minutos depois da injeção convulsões violentas. O animal permanece todo contorcido, rigido, com a bocca aberta; o relaxamento muscular se produz; o coração bate ainda durante alguns instantes, parando definitivamente em 4 minutos.

C. terrificus de 40 c. de comprimento.—Recebe 1 mg. em 1 c. c. por injeção intramuscular; ligeira phase de excitação, fica calma, durante 5 minutos; paralysisia a principio posterior; convulsões tonicis violentas em 15 minutos depois da injeção; relaxamento muscular; o coração pára em 26 minutos.

ACÇÃO SOBRE AS MUCOSAS:

Ao contrario dos venenos ophidicos e arachnidicos, o dos batrachios é como dissemos, dotado de uma facilidade extrema de penetra-

(1) Na nota previa sobre o veneno dos batrachios (Brazil Medico 26-9-925), deve-se corrigir a minima mortal para o camondogo que por erro typographico sahio um pouco superior a 5 mg. ao envez de um pouco superior a 0,5 mg.

ção através de todas as mucosas, penetração comparavel a do acido cyanhydrico e seus derivados pela rapidez e energia com que produz a morte nos animaes em experiencia.

Esta rapidez de acção despertou desde logo nosso interesse, nos levando a fazer muitas series de experiencias, visando as differentes mucosas—buccal; gastro-intestinal, occular, nasal, em toda a serie zoologica.

Os factos, assim assignalados são muito interessantes, sendo para admirar, que não tenham sido, anteriormente, objecto de estudos mais aprofundados.

Encontra-se na litteratura a indicação, muitas vezes repetida, de que o veneno, de sapo e o de salamandra podem determinar a morte, por via digestiva, em algumas especies animaes, como o co-baio, o lagarto, o coelho, o cão e certos passaros, occasionando igualmente accidentes mais ou menos graves em alguns outros; que depositado sobre a cornea provoca uma ophtalmia mais ou menos duravel; isto, porém, sem que os experimentadores tenham prestado uma attenção especial ao assumpto, emprehendendo pesquisas na altura da importancia dos factos observados.

Os symptoms observados são assaz variaveis, segundo a mucosa em que se faz a applicação do veneno; pode-se, entretanto, afirmar que, em todos os casos dominam os phenomenos nervosos, como acontece nos envenenamentos determinados por via parental; excitação inicial, seguida de paralysisa e de violentas convulsões tonicas; a estes symptoms, se vem juntar outros, quer de natureza reflexa ou devidos a acção directa sobre os centros nervosos, como nauseas, vomitos, tosse, salivação intensa, quer provocados pela vaso constricção local, ou a simples acção irritante do veneno, como ischemia, conjunctivite, keratite, edemas, etc. O facto, porem, mais impressionante é a rapidez de penetração do veneno e a exiguidade das doses capazes de fulminar os animaes. Assim, um coelho, que recebe por via oral de 80 a 90 milligrammas de veneno fresco, dissolvidos em 3 c. c. de agua distillada, morre em alguns segundos, muitas vezes, mesmo, antes de haver recebido as ultimas porções do toxico.

Uma tal rapidez de acção só nos parece comprehensivel, por uma grande affinidade de veneno para os elementos nervosos. Parece que depositado sobre a mucosa, o veneno, em consequencia de sua affinidade, se fixa immediatamente sobre os filetes nervosos através dos quaes alcança os centros nervosos, determinando os phenomenos graves e fulminantes que observamos.

A seguinte experiencia falla a favor d'esta explicação: sobre o globo ocular de um coelho, deposita-se uma certa quantidade de veneno fresco *in natura*; rapidamente o animal apresenta-se paretico, hemiplegico do lado correspondente ao globo ocular em que se depositou o veneno; e a paralysisa se completa, morrendo o animal em convulsões tetaniformes em 30 ou 40 minutos.

Além desta, fizemos outras experiencias, em que ficou demonstrada a fixação do veneno sobre o tecido nervoso.

Dois cerebros de cobaio, pesando 6,275 grs, foram triturados com 12,50 mgs de veneno de *Bufo marinus*; proporção de veneno para o tecido nervoso 2 mgs. por gramma.

Durante 3 horas ficam, em contacto, veneno e substancia nervosa, depois do que junta-se 12 c. c. d'agua distillada e filtra-se. 1 c. c. do filtrado corresponde a 1 mg. de veneno. Com elle fizemos a seguinte experiencia:

Pequena *Lachesis lanceolatus* recebe 0, c. c. 2 por via gastrica. Não apresentou symptomas de envenamento. Pequena *lachesis lanceolatus* recebe 1 c. c. Não apresentou symptomas.

Testemunha.—Pequena *Lachesis lanceolatus*, recebe por via gastrica, 1 mg. do mesmo veneno, sem ter estado em contacto com o tecido nervoso. Convulsões dentro de 1 minuto, vomitos e morte em 50 minutos. . .

Pequena *Lachesis lanceolatus* recebe, por via gastrica uma pequena porção da substancia cerebral, que estivera em contacto com o veneno e fora separada do liquido por centrifugação.—Convulsões em 1 minuto e morte em uma hora.

Repetimos esta experiencia com cerebro de coelho, empregando veneno na proporção de 5 mgs. por gramma de tecido nervoso. N'esta proporção verificou-se que só em parte foi fixado o veneno.

Todos os animaes, tanto os de sangue quente, como os de sangue frio, em que temos experimentado o veneno sobre as mucosas, mostraram-se extremamente sensiveis: mesmo os ophidios, assignalados por Mme. Physalix, como particularmente resistentes, capazes de engolir impunemente volumosos sapos, revelaram-se, ao contrario, de uma tal sensibilidade, que chegamos a tomar certas especies de serpentes venenosas (pequenos *Crotalus* e *Lachesis*) muito abundantes nos nossos serpentarios, como reactivos vivos nas pesquisas que empreendemos sobre este veneno.

MUCOSA DIGESTIVA. Nas primeiras experiencias que realisamos, por via digestiva empregamos o veneno, *in natura*, não tardando em verificar, o inconveniente do methodo que nos proporcionava resultados variaveis, segundo a consistencia muito variavel do producto de secreção.

Com os solutos de veneno, quer em agua distillada, quer em sôro physiologico, os resultados são muito regulares, tendo-se o cuidado de trabalhar com animaes em jejum. Com o estomago cheio, uma parte do veneno é absorvido pelo bolo alimentar, difficultando o contacto sobre a mucosa, falseando, consequentemente os resultados.

Na maior parte das experiencias, empregamos o veneno dissolvido em agua distillada, de modo que a dose a administrar estivesse contida em 2 a 3 c. c. de vehiculo depositando gotta a gotta o soluto na lingua do animal, em ordem a facilitar-lhe os movimentos de deglutição. Nos reptis e batrachios a solução de veneno era directamente levada, por meio de uma pipeta ao estomago do animal. A fixação ou absorpção do veneno, se faz naturalmente atravez de todas as mucosas com que entra em contacto, da bocca, pharynge e estomago.

Os symptomas começam muito rapidamente, mesmo com as doses muito visinhas da minima mortal; salivação abundante, tosse, secreção nasal, grande máo estar por espasmos localisados na gar-

ganta, que os animaes em experiencia denunciavam, pelos esforços que empregam em retirar d'ahi um obstaculo imaginario; excitação violenta, dores muito fortes, manifestadas, segundo os meios peculiares a cada especie; depois nauseas, vomitos nas especies suceptiveis, vertigens, perturbações respiratorias e circulatorias, depressão extrema, parestesia, crises convulsivas espasmodicas, com periodos de remissão durante os quaes o animal pode levantar-se e andar, finalmente paralytia e morte.

Eis alguns de nossos protocollos:

Cão—Especie muito sensivel.

Cão n.º 2—de 1 kilo, de 3 mezes de idade, recebe 200 mgs. de veneno pastoso; immediatamente começa a babar abundantemente; baba espessa e espumosa; vomitos, completamente paralytico em 4 minutos; crises convulsivas tetaniformes, opisthotonos, uivos inteiramente inerte 8 minutos depois da ingestão do veneno, com raros movimentos respiratorios; o coração, em 12 minutos a contar do inicio da experiencia, pára.

Gato—animal extremamente sensivel.

Gato n.º 1—peso 350 grs. com 6 semanas, recebe 20 mgs. de veneno em 2 c. c. d'agua distillada; baba abundante, vomitos repetidos; 10 minutos depois da ingestão do veneno começa uma serie de violentas convulsões tonicas, acompanhadas de opisthotonos e de tremores com intervallos de repouso, durante os quaes pode o animal levantar-se e andar; estas crises tornam-se cada vez mais frequentes morrendo o animal em uma d'ellas em duas horas e 15 minutos.

Gato n.º 2—peso 340 grs. com 6 semanas, recebe 10 mgs em 1 c. c. de agua distillada; mesmos symptomas que o precedente; 5 horas depois, as crises convulsivas começam a se espaçar e o animal se restabelece no dia seguinte.

Cobaio—Muito menos sensivel do que o cão e o gato. . .

Cobaio 210—peso 350 grs.—Recebe 150 mgs. de veneno pastoso; 5 minutos após accesso de tosse continua; paralytico 10 minutos depois; violentas convulsões ao fim de 1/4 de hora; completamente paralytico dentro de uma hora; morte em 6 horas.

Cobaio 140—peso 170 grs.—Recebe 100 mgs. de veneno pastoso, paraplegico em 40 minutos, paralytico em 1 hora e meia; morte durante a noite.

Cobaio 25—peso 360 grs.—Recebe 50 mgs. de veneno pastoso; forte parestesia; completamente restabelecido no dia seguinte.

Cobaio 285—peso 320 grs.—Recebe 40 mgs. de veneno em 4 c. c. de agua distillada; 10 minutos mais tarde parestesia, tremores violentos; paralytico em 20 minutos; uma hora depois recebe mais 20 mgs.; tremores cada vez mais violentos, sem convulsões; restabelecido no dia seguinte.

Cobaio 271—peso 390 grs.—Recebe 80 mgs. de veneno em 4 c. c. de agua distillada; violenta agitação immediata, dores, gritos, tremores, depressão; paralytico dentro de uma hora, morte 6 horas depois.

Coelho—Sensibilidade comparavel á do cobaio.

Coelho 6—peso 1350 grs.—Recebe 90 mgs. de veneno pastoso; paretico em 10 minutos, paralytico em 25 minutos, com fortes tremores espasmodicos;

dentro de hora e meia opisthotonos, seguido de crises tetaniformes; na manhã seguinte, paresia sem tremores; restabelece-se em 48 horas.

Coelho 24—peso 1500 grs.—Recebe 90 mgs. de veneno em 4,5 c. c. de agua distillada; violentas crises tetaniformes e morte em 2 minutos em opisthotonus.

Coelho 33—peso 1230 grs.—Recebe 90 mgs. em 4,5 c. c. de agua distillada; symptomas immediatos de paresia, depois de paralyssia posterior e quadriplegia em 2 minutos; morte em sete minutos.

Coelho 434—peso 1200 grs.—Recebe 60 mgs. em 3 c. c. de agua distillada; 5 minutos depois forte agitação, paralytico em 30 minutos; restabelecido no dia seguinte.

Coelho 327—peso 1300 grs.—Recebe 50 mgs. em 2,5 c. c. de agua distillada; paresia passageira; parece normal depois de 16 horas; recebe então 30 mgs. em 1,5 c. c.; morte em 2 minutos.

Pombo—Muito sensivel ao veneno.

Pombo 12—Recebe 10 mgs. em 1 c. c. de agua distillada; agitação seguida de convulsões, de paralyssia, de rigidez tetanica no prazo de 5 minutos; morte em 17 minutos.

Pombo 16—Recebe 5 mgs. em 1 c. c. de agua distillada; 12 minutos depois vomitos repetidos, opisthotonus; convulsões e paralyssia em 30 minutos; morte em uma hora.

Pombo 176—Recebe 5 mgs. de veneno em 1 c. c. de agua distillada; cahe em seguida paralytico; vomitos violentos em 12 minutos; regeitando todo o veneno, depois de que se restabelece rapidamente.

O camondongo branco é muito sensivel.

Camondongo de 24 grs.—Recebe 1 mg. em 0,2 c. c. de agua distillada; convulsões, opisthotonus, morte em 1 minuto.

Morcego—sp.—Recebe 2 mgs. em 0,4 c. c. de agua distillada; morte immedita em convulsões.

VIA RECTAL:

A administração do veneno por via rectal é muito menos severa do que o por via oral, provavelmente em consequencia das evacuações frequentes e não por uma sensibilidade menos pronunciada da mucosa rectal; os symptomas geraes são os mesmos que se observam nos envenenamentos determinados por outras vias; os symptomas locais consistem em irritação intensa e prolapso do recto, tenesmos e dejecções diarrheicas.

Gato n.º 3—peso 391 grs.—Recebe por via rectal 10 mgs. em 1 c. c. de agua distillada; 10 minutos mais tarde, vomitos, diarrhea; uma hora mais tarde, recebe mais 10 mgs.; ligeira crise convulsiva tetaniforme, tremores, vomitos, diarrhea abundante, prolapso do recto. Restabelecido na manhã seguinte, recebe mais 10 mgs. de veneno; mesmos symptomas, restabelecendo-se em 24 horas; as fezes diarrheicas, porém, persistem durante dois dias.

MUCOSA OCULAR:

Com as soluções fracas de veneno facilmente eliminadas ou atenuadas pela secreção lacrimal, observam-se tão sómente phenomenos locais, ischemia e irritação mais ou menos pronunciada da mucosa. Um pouco de veneno, *in natura*, collocado sobre o globo ocular determina rapidamente accidentes locais e geraes, e morte.

Coelho 20—Recebe ás 9 horas e 50 minutos uma gotta de solução fraca de veneno no globo ocular direito; abundante secreção lacrimal immediata, seguida de ischemia da mucosa e de congestão da iris; a pupilla é retrahida, immovel e insensivel a luz; a cornea opaca, secca e despolida; 15 minutos depois da applicação do veneno, o animal está cego do lado direito. A's 10 horas e 5' nova applicação de uma gotta de veneno sobre o olho esquerdo; os mesmos symptomas; mas o animal fica immovel e paretico. A's 12 horas e 45', a pupilla não está mais em myosis tão pronunciada. O animal restabelece-se lentamente, sem accidente local.

Coelho 40—peso 1235 grs.—Recebe, ás 10 horas, cerca de 100 mgs. de veneno pastoso sobre o globo ocular esquerdo; ás 10 horas e 45', elevação thermica (39° 4), pupilla muito contrahida, ligeira paresia, dyspnéa; ás 11 horas, hemiplegia esquerda completa, o animal procurando levantar-se sobre as patas oppostas cahe sempre sobre o lado paralytico; ás 12 horas paralyisia generalisada, abundante salivação, emissão de urina; na manhã seguinte o estado geral está um pouco modificado para melhor, nota-se forte edema subconjunctival do olho esquerdo; a cornea está despolida e opaca; esta reacção accentua-se no dia seguinte, desenvolvendo-se uma kerato-conjunctivite intensa, que determinou a cegueira definitiva, do animal, do lado esquerdo. O olho do lado opposto não apresenta cousa alguma de anormal. No quinto dia de experiencia o animal succumbe subitamente, sem que o seu estado geral fizesse prever esse desenlace.

Coelho 275—peso 1115 grs.—Recebe sobre o globo ocular direito 160 mgr. de veneno pastoso, paresia do lado direito, seguida de hemiplegia (15 minutos), de quadriplegia (25 minutos) e de morte em 45 minutos.

Coelho 210—peso 1360 grs.—Recebe sobre o globo ocular cerca de 150 mgrs. de veneno pastoso; mesmos symptomas; morte em 50 minutos.

Coelho 176—Recebe, sobre o globo ocular esquerdo, uma pequena quantidade de veneno *in natura*; paresia, seguida de hemiplegia esquerda, paralyisia geral e morte em uma hora e 30'. — *Experiencia realisada perante a Sociedade de Biologia e Hygiene de S. Paulo, em sessão de 8 de Maio de 1925.*

MUCOSA NASAL—A applicação do veneno sobre a mucosa nasal determina symptomas perfeitamente comparaveis aos observados pela applicação na mucosa ocular. Com as soluções muito diluidas, acção irritante local, espirros repetidõs; hypersecreção; o mesmo effeito se produz por finas particulas em suspensão no ar, quando se tritura o veneno secco. A applicação de 100 a 150 mgr. de veneno pastoso determina no coelho symptomas geraes, paresia, hemiplegia, quadriplegia e morte rapida.

Coelho 282—Recebe cerca de 20 mgs. de veneno pastoso sobre a mucosa nasal; secreção local, movimentos repetidos de deglutição, espirros. Nenhum symptoma geral.

Coelho 59—peso 1000 grs.—Recebe cerca de 100 mgs. de veneno *in natura* na mucosa nasal; hemiplegia 35 minutos depois; paralytico em 45 minutos, com edema da mucosa nasal do lado da applicação; morte em uma hora e 15 minutos.

ABSORPÇÃO PELA PELLE—A pelle humana, bem como a pelle dos mammiferos, offerece solida resistencia a absorpção d'este veneno. Não conseguimos determinar symptomas geraes por fricções repetidas, muitos dias em seguida, feitas sobre a pelle, previamente epilada de diversos animaes. O mais que conseguimos foi uma ligeira reacção local.

Cão 10—Fricção sobre a pelle do ventre com 100 mgs. de veneno emulsionado em oleo de oliva. Nenhum resultado.

Coelho 156—Fricção com 200 mgs. de veneno pastoso sobre o dorso epilado 48 horas antes; ligeira reacção inflammatoria local no dia seguinte.

Do mesmo modo a injecção intradermica na orelha do coelho de pequenas doses de 1 a 2 mgs. não provoca senão uma fraca reacção local, sem necrose.

A pelle de alguns bacrachios absorve facilmente o veneno, observando-se a morte tão rapida por esta applicação, como a que se verifica pela deposição do toxico sobre as mucosas.

Paludicola signifera (Rã).—Duas *P. signifera* são collocadas em um tubo, a que se adicionam 4 gottas de um soluto de veneno, dose essa correspondente a 2 mgr.; paralytia immediata, convulsões e morte em 6 minutos.

Paludicola signifera; recebe sobre o dorso uma gotta do soluto de veneno (0,5 mg.) paralytia a principio posterior, completa em 5 minutos; restabelece-se em uma hora.

Hyla sp. (Pereréca).—Recebe uma gotta do soluto de veneno no dorso (0,5 mg.); paralytia no começo posterior, completa em 5 minutos; restabelece-se n'uma hora.

A concentração das soluções de veneno tem grande importancia sobre a actividade por via cutanea. Assim duas *Paludicolas*, depois de contacto, durante 15 minutos, com uma solução de veneno a 1^o/₁₀₀ não apresentavam senão paralytia passageira.

ACCUMULAÇÃO DO VENENO NO ORGANISMO:

Uma das propriedades mais dignas de nota, do veneno dos bacrachios, pela qual se differencia de outros de origem animal, é a de se accumular no organismo. Assim, quando se administra por via parental ou por via gastrica, a um animal qualquer, em experiencia, uma dose de veneno inferior a minima mortal, observam-se phenomenos mais ou menos graves, que desaparecem em curto prazo; si a este mesmo animal depois de um intervallo mais ou menos longo, dá-se uma segunda dose de veneno, que represente a differença entre a primeira e a minima mortal, o animal apresenta symptomas e succumbe, como se tivesse recebido de uma só vez a minima mortal. Si ao em vez de fraccionarmos, em duas doses, a minima mortal, o fizermos em cinco ou dez doses, o resultado final será o

mesmo; a ultima dose será sempre a gotta d'agua, que faz transbordar o calice, determinando a morte.

Como consequencia logica da propriedade, que acabamos de expôr, apresenta-se a incapacidade de determinar a formação de anticorpos ou de produzir a immuniidade. Não conseguimos, de facto, por mais variados que fossem os methodos empregados, immunisar qualquer especie de animal, contra o veneno de sapo. Não encontramos, tambem, especie alguma, que possuisse immuniidade natural contra esse veneno. O proprio sapo, o *B. marinus* succumbe a acção do seu veneno, mostrando-se sensivel a uma dose infinitamente menor do que a de que elle dispõe, em uma só das suas paratoides.

Eis o protocollo de algumas das experiencias que documentam os factos acima mencionados:

Gato n.º 2—Recebe por via gastrica 10 mg. de veneno, em 1 c. c. de agua distillada, symptomas graves; completo restabelecimento no dia seguinte; 24 horas mais tarde, recebe, pela mesma via 5 mg.; baba espessa, vomitos, paralysis, convulsões e morte em uma hora e 50 minutos.

Tentativas de immunisação:

Coelho 28, peso 1500 grs.—Recebe a 3-4-25, por via gastrica 40 mg.—forte paresia, elevação thermica, phenomenos estes que desapparecem.
 " " " " " " Recebe a 5-4-25, pela mesma via mais 20 mg.—mesmos symptomas.
 " " " " " " Recebe a 7-4-25, pela mesma via, mais 20 mg.—mesmos symptomas mais accentuados.
 " " " " " " Recebe a 9-4-25, pela mesma via, mais 20 mg.—morte em 1 minuto.

Total de veneno em doses accumuladas = 100 mgs.

Pela necropsia observamos forte congestão de todos os orgãos; espessamento da parede estomacal; congestão do peritoneo, com abundante exudato peritoneal, ligeiramente hemolitico.

Coelho 159, peso 1400 grs.—Recebe por via gastrica a 14-4-25, 80 mgs.—Symptomas graves.—Normal no dia seguinte.

" " " " " " Recebe pela mesma via a 18-4-25, mais 10 mgs. Symptomas graves, paralytico e morte no dia 19-4-25.

Total do veneno administrado em duas doses = 90 mgs.

Com uma só dose de 90 mgs. por via gastrica, mata-se o coelho de igual peso em 10 minutos.

As doses accumulativas podem ser administradas por vias diferentes, com os mesmos resultados:

Coelho 9—peso 1300 grs.—Recebe:
 a 14-4-25—30 mgs. por via gastrica; nenhum symptoma.
 a 18-4-25—30 mgs. pela mesma via; paresia passageira.
 a 22-4-25—10 mgs. por via intramuscular; forte paresia, que desapparece no dia seguinte.
 a 25-4-25—10 mgs. por via intramuscular; paralytico, durante 36 horas; diarrhéa forte.

a 29-4-25—10 mgs. por intramuscular, ás 11 horas da manhã, paralytico ás 14 horas; diarrhéa muito abundante; morre a noite.

Doses accumuladas:

Por via gastrica, em 2 doses—60 mgs.

Por via intramuscular, 3 doses—30 mgs.

Total 90 mgs.

Pela necropsia, verificamos congestão de todo o tubo digestivo, principalmente do estomago, em cujas paredes encontramos largas placas em via de necrose. Fígado com zonas de degeneração.

Com o cobaio tivemos resultado identico. Voltaremos ao assumpto a proposito das tentativas de immunisação, por meio de fricções sobre a pelle.

Como demonstração da sensibilidade do sapo ao seu proprio veneno registaremos algumas das nossas experiencias, cujos resultados vem infirmar a opinião de alguns autores, que o suppõe, ao contrario, muito resistente.

Bufo marinus pesando 70 grs.—Recebe por via oral 2 ½ grs. de veneno, *in natura*, que lhe fôra extrahido momentos antes; paresia posterior em uma hora; morte em 2 ½ horas.

Bufo marinus pesando 80 grs. — Recebe por via oral, 1 gr. de veneno *in natura*, paralytico em duas horas e morto em 4 horas.

Bufo marinus pesando 85 grs.—Recebe por via oral, 100 mgs. de veneno, dissolvido em 2 c. c. de agua distillada, tendo sido regeitada, a maior parte da dose, pelo que foi administrada, duas horas depois, pela mesma via, mais 100 mgs.; ligeira paresia posterior, que desaparece no dia seguinte, em o qual recebe do mesmo modo mais 100 mgs. de veneno; morte 4 horas depois da ultima ingestão.

A minima mortal, para um *Bufo marinus* de 100 grs. parece ficar entre 250 a 300 mgs. de veneno por via oral.

O *Bufo crucifer* e o *B. arenarum* são igualmente sensiveis ao proprio veneno e ao das especies visinhas:

B. crucifer, adulto de 45 grs.—Recebe por via oral 180 mgs. de veneno de *B. marinus*; paretico uma hora depois da ingestão; paralytico no dia seguinte, com a mucosa buccal muito congestionada e hemorrhagica; morte em cerca de 36 horas.

B. arenarum, adulto, recebe por via oral 100 mgs. de veneno de *Bufo arenarum*, morto na manhã seguinte.

ACÇÃO DO VENENO DE BUFO SOBRE OUTRAS ESPECIES DE BATRACHIOS:

As outras especies de batrachios são, em geral, dotadas de grande sensibilidade a este veneno, succumbindo a doses muito fracas, quer por via cutanea, como já vimos, quer por via hypodermica ou por via oral. A grande *Leptodactylus pentadactylus*, cujo tamanho pode

atingir o dos maiores Bufo, é de uma sensibilidade comparavel a destes ultimos. Os symptomas começam logo após a applicação do veneno, por phenomenos de excitação que se traduzem por saltos desordenados, até que apresente-se a paresia, a que succede paralyeia posterior, seguida de contracções tonicas locais, mais ou menos intensas, as quaes se generalisam posteriormente, sem comtudo transformarem-se em verdadeiras convulsões, depois do que o animal fica completamente paralytico e succumbe, em um prazo, mais ou menos longo.

Paludicola signifera, recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 2 minutos.

Paludicola signifera, recebe 0,1 mg. por via gastrica; paralytica em 5 minutos, restabelecida em 1 hora.

Paludicola signifera, recebe 1 mg. de veneno sobre o dorso, (2 gottas da solução), morta em 10 minutos.

Paludicola signifera, recebe 0,5 mg. veneno sobre o dorso, (uma gotta da solução, paralytica em 5 minutos, restabelecida em 1 hora.

Hyla sp?, recebe 0,5 mg. por via gastrica; morte em 3 minutos.

Elesia nasus, recebe 1 mg. por via gastrica; morte em 3 minutos.

Cyoloramphus eleutherodactylus, recebe 1 mg. por via gastrica; morte em 3 minutos.

Leptodactylus ocellatus, recebe 1 mg. por via gastrica; nenhum symptoma.

Leptodactylus ocellatus, recebe 10 mgs. por via gastrica; morte em 20 minutos.

Leptodactylus fragilis, peso 50 grs., recebe 4 mgs. por via gastrica, paralytica em 1 hora, restabelecida no dia seguinte; de novo recebe 4 mgs., morte em 4 horas.

Leptodactylus fragilis, peso 40 grs., recebe 2 mgs., sob a mucosa buccal, paretica em 10 minutos; paralytica em 1 hora; morte em 36 horas.

Leptodactylus pentadactylus, peso 120 grs. recebe 40 mgs., por via gastrica, nenhum symptoma.

Leptodactylus pentadactylus, recebe por via gastrica, 55 mgs.; nenhum symptoma.

Leptodactylus pentadactylus, recebe por via gastrica, 200 mgs., morte em 6 horas.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE OS OPHIDIOS:

Já assignalamos, em outra parte d'este trabalho, a grande sensibilidade dos ophidios a etse veneno, em opposição ao que affirmaram alguns experimentadores. Passaremos agora a documentar, com o relatorio de algumas das experienciás que realisamos, esse modo de ver.

Devemos porém, consignar em primeiro lugar que, n'este, como em outros grupos zoologicos, a sensibilidade é variavel com as especies. As *Crotalinae*, tanto as do genero *Crotalus*, como as do genero *Lachesis*, são as mais sensiveis. Nos outros generos encon-

tram-se diferenças notáveis; não encontramos, porém, uma só espécie refractaria a acção do veneno. Nossas experiencias foram realizadas, quer fazendo morder, directamente, o sapo, pela serpente, quer por injecção intramuscular ou por introdução do veneno no estomago ou na trachêa por meio de uma pipetta afilada. As doses minimas mortaes, por via intramuscular, mostraram-se, ao contrario, do que se poderia suppôr, notavelmente superiores as registadas para as duas outras vias de introdução do veneno. Por via oral ou tracheal, a morte é extremamente rapida e as minimas mortaes identicas na maior parte das especies; as *Xenedon*, entretanto, principalmente a *X. merremi* e a *X. Guntheri*, fazem excepção a esta regra como adiante veremos.

Os symptomas são identicos, qualquer que seja o modo de introdução do veneno; viva agitação immediata; o animal procura fugir, abrindo constantemente a bocca, sob acção, ao que parece, de fortes dores; sobrevem os vomitos, paresia, paralysisa, a principio posterior; emfim violentas convulsões, depois das quaes o animal fica contorcido sobre si proprio; o relaxamento muscular se produz em seguida e o coração para por ultimo. Com doses proximas a minima mortal, as convulsões podem faltar ou não se apresentarem senão tardiamente; com doses mais elevadas são, ao contrario, muito violentas e precoces.

Experiencias directas:

Lachesis lanceolatus, exemplar adulto, de 95 c. de comprimento, é forçada a morder um *B. marinus*, sobre as paratoides; a mordedura não durou senão alguns segundos; apparecem immediatamente os primeiros symptomas,—paresia, convulsões fracas, paralysisa; morte em 1 hora e 10'. O sapo não apresentou symptoma algum de intoxicação.

Esta experiencia foi repetida, com identicos resultados, perante a Sociedade de Biologia e Hygiene de S. Paulo.

Crotalus terrificus, de 45 c. de comprimento, obrigada a morder um *Bufo marinus*, sobre as paratoides; paralytica em 5 minutos, morte em 8 minutos. O sapo nada soffreu.

Via parental, gastrica e tracheal:

Especies particularmente sensiveis:

Crotalus terrificus, de 40 c., recebe por injecção intramuscular, 2 mgs. de veneno, convulsões em 3' e 30", morte em 4'.

Crotalus terrificus, de 45 c., recebe 1 mg. por injecção intramuscular, convulsões em 5', morte em 26'.

Crotalus terrificus, de 30 c., recebe por via tracheal, 1 mg., convulsões em 1' e 30", morte em 2'.

Crotalus terrificus, de 40 c., recebe 0,5 mgs. por via tracheal, convulsões em 2 minutos, morte em 3 minutos.

Crotalus terrificus, de 45 c., recebe 0,1 mg. por via tracheal, paralytica em 20', restabelecida em 2 horas.

Crotalus terrificus, de 35 c., recebe 1 mg. por via gastrica, convulsões em 4' e morte em 5'.

Crotalus terrificus, 40 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5'.

Crotalus terrificus, 40 c., recebe 0,2 mg. por via gastrica, morte em 7'.

Crotalus terrificus, 40 c., recebe por via gastrica, 0,1 mg. convulsões fracas em 5', restabelecida em duas horas.

Lachesis lanceolatus, 45 c., recebe por via tracheal, 0,5 mg. convulsões imediatas; morte em 1 minuto.

Lachesis lanceolatus, 45 c., recebe por via tracheal, 0,5 mg.; convulsões em 1' e morte em 2 minutos.

Lachesis lanceolatus, de 35 c., recebe por via gastrica, 0,5 mg.; convulsões em '3, morte em 2 horas.

Lachesis atrox, de 35 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 2 minutos.

Lachesis alternatus, de 40 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 4 minutos.

Lachesis cotiara, de 35 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5'.

Lachesis newwiedii, de 25 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5'.

Lachesis jararacuçu, de 35 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 4' e 30".

Drymobius bifossatus, de 1,ª 75 de comprimento pesando 720 grs., recebe 5 mg. por via tracheal; paralytica em 5' e morta em 55'.

Epicrates crassus, de 45 c. de comprimento, recebe 2 mgs. por via gastrica morte em 9 minutos.

Simophis rhinostoma, de 35 c. de comprimento, recebe 2,5 mg. por via gastrica, convulsões imediatas; morte em 2 minutos.

Elapomorphus nasutus, adulto, recebe 2 mgs. por via gastrica, paralytico em 10' e morte em 1 hora.

Especies sensiveis:

Elaps corallinus, de 80 c. de comprimento, recebe por via gastrica 10 mgs.; convulsões em 9' e morte em 15'.

Herpetodryas carinatus, de 1,ª 30, recebe 5 mgs. por via gastrica, convulsões em 4' e morte em 7'.

Herpetodryas sex-carinatus de 1 metro, recebe 5 mgs. por via gastrica, convulsões em 1' e morte em 5'.

Thamnodynastes natteri, recebe 5 mgs. por via gastrica, morte em 25 minutos.

Spilotes pullatus, de 2,ª 10 pesando 950 grs. recebe 20 mgs. por via gastrico, convulsões em 15' e morte em 45'.

Oxyrhopus haasi, de 50 c., recebe 5 mgs. por via gastrica, convulsões imediatas, se restabelece em 10 horas.

Oxyrhopus trigeminus, de 75 c., recebe 10 mgs. por via gastrica, morte em 4 horas e 50 minutos.

Philodryas estivus, recebe 15 mgs. por via gastrica, morte em uma hora e 15 minutos.

Philodryas serra de 40 c., recebe por via gastrica 1 mg., paralytica ao cabo de 1 hora, morte a noite.

Rhadinea merremii, adulta recebe 5 mgs. por via gastrica, morte em 2 horas.

Leptognathus turgidus, adulta, recebe 2 mgs, paralytica, morte em 1 hora.

Especies pouco sensiveis:

Constrictor constrictor, de 1,^m 60, pesando 2 kilos 150 grs.; recebe por via gastrica 30 mgs., paresia forte, perde a aggressibilidade; ½ hora depois recebe mais 20 mgs.; paralytia posterior, abre constantemente a bocca, convulsões da parte anterior do corpo; na manhã seguinte recebe mais 40 mgs., fracas convulsões, vomitos e morte durante a noite. Recebeu ao todo 90 mgs. de veneno.

Liophis reginae, adulto, recebe por via gastrica, 10 mgs.; nenhum symptoma até a tarde; paralytica na manhã seguinte, morte em 24 horas.

Liophis poecilogyrus, adulto de 25 c., recebe por via gastrica 2 mgs. Apresentou apenas ligeiros symptomas.

Tomodon dorsatus, recebe 5 mgs. por via gastrica; convulsões fracas, paralytia. Restabelece-se.

Xenodon merremii.—Esta especie apresenta uma resistencia particular ao veneno granuloso por via gastrica, resistencia muito maior do que a do proprio sapo. Não se trata, entretanto, de uma verdadeira immunidadé ao veneno e sim de uma condição especial da mucosa gastrica, que impede a absorpção d'este. Tanto esse modo de ver corresponde a verdade, que vencemos facilmente esta resistencia, empregando outra via de administração do veneno, a tracheal por exemplo, conseguindo matar facilmente a *Xenodon* com fracas doses. Ainda em favor d'esta interpretação depõe o facto de não possuir o sôro d'esta especie anti-corpo algum capaz de neutralisar o veneno, ainda mesmo depois de prolongado contacto.

Xenodon merremii, adulto, recebe 400 mgs. por gastrica; paralytia passageira.

Xenodon merremii, adulto recebe 1000 mgs. por via gastrica; paralytica em 4 horas; restabelece-se em 48 horas.

Xenodon merremii, adulto, por deglutição forcada, um pequeno *Bufo crucifer*, que é levado até ao estomago. Depois de duas horas este animal é regeitado. Introduzido de novo no estomago da *Xenodon*, é vomitado outra vez, ao fim de 5 minutos. Nota-se simplesmente paresia accentuada que desaparece rapidamente.

Xenodon merremii, recebe, por via tracheal, 20 milligrs. de veneno; morte em 15 minutos.

O sôro da *Xenodon merremii*, não neutralisa o veneno granuloso:

Lachesis lanceolatus, de 40 c. recebe por via gastrica 1 mg. de veneno mais 0, c. 5 de sôro de X. merremii, depois de contacto in vitro, durante 1 hora, morte em 4 minutos.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE OUTROS ANIMAES DE SANGUE FRIO:

Saurios.—*Lygosoma*, sp. (lagartixa).—Recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5 minutos.

Amphysbena alba.—Recebe 2,5 mg. por via gastrica; espuma abundante pela bocca, paresia, convulsões, paralytia e morte em 1 hora e 35 minutos.

Cheloneo.—Um jabuty, mostrou-se assaz resistente, restabelecendo-se depois de ter estado paralytico, em consequencia de administração por via gastrica de 10 mgs. de veneno.

OS INSECTOS SÃO MUITO RESISTENTES A ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO:

Diversos coleopteros (Cerambycides e Lamellicornes) ou suas larvas, mergulhados em uma solução a 10 % de veneno, durante 1/4 de hora, ou não apresentaram signal algum de intoxicação ou apenas muito fracos symptomas. Do mesmo modo larvas de moscas, de Sphyngidae e um Hymenoptero, supportaram perfeitamente este tratamento.

Larva de *Cerambycidae*.—10 minutos na solução do veneno.—Nenhum symptoma.

Cerambycidae adulto, 10 minutos na solução de veneno.—Paralytico 20 minutos depois de ter sido retirado da solução.—Restabelecido em 2 horas.

Larva de *Sphyngidae*.—10 minutos na solução de veneno.—Nenhum symptoma.

Hymenoptero (*Mutilla sp*)—10 minutos na solução do veneno.—Nenhum symptoma.

Larvas de moscas, 24 horas na solução; nenhum symptoma.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE AS BACTERIAS E A ACÇÃO D'ESTAS SOBRE O VENENO:

Observamos desde logo que as soluções aquosas de veneno granuloso, conservaram-se bem, por muitos dias, sem esterilisação prévia, e sem cuidado algum particular, sugerindo-nos a ideia de verificar si o veneno teria alguma acção bactericida ou impiedente do desenvolvimento das bacterias, ou se consistiria apenas um meio improprio ao desenvolvimento de germens, por falta dos elementos nutritivos. Uma outra questão que, com esta, se irmanava, era saber-se si o desenvolvimento de bacterias, em meio propicio, em presença do veneno, determinaria a alteração ou a attenuação d'este.

Visando a verificação d'estas duas questões realisamos a seguinte experiencia:

Em uma serie de tubos contendo doses decrescentes de um soluto de veneno a 1 %, addiciona-se quantidades crescentes de caldo commum semeando-se em seguida com *B. coli* e levando-se a serie de tubos a estufa a 37°.

Tubo n.º 1.—10 c. c. de soluto de veneno.	
Tubo n.º 2.— 7 c. c. de soluto de veneno, mais	3 c. c. de caldo
Tubo n.º 3.— 6 c. c. de soluto de veneno, mais	4 c. c. de caldo
Tubo n.º 4.— 5 c. c. de soluto de veneno, mais	5 c. c. de caldo
Tubo n.º 5.— 4 c. c. de soluto de veneno, mais	6 c. c. de caldo
Tubo n.º 6.— 3 c. c. de soluto de veneno, mais	7 c. c. de caldo
Tubo n.º 7.— 2 c. c. de soluto de veneno, mais	8 c. c. de caldo
Tubo n.º 8.— 1 c. c. de soluto de veneno, mais	9 c. c. de caldo
Tubo n.º 9.— 0 c. c. de soluto de veneno, mais	10 c. c. de caldo.

Semeados com
B. coli.

Depois de 48 horas na estufa a 37°, verifica-se que a cultura é progressivamente mais abundante do tubo n.º 2 ao do numero 9, sendo nulla no tubo n.º 1, exactamente em que se encontrava exclusivamente o soluto de veneno. De sorte que a conclusão foi facilima a tirar-se quanto a primeira parte da questão: o veneno não tem acção alguma bactericida ou mesmo impediante sobre o desenvolvimento do *B. coli*; as suas soluções não se prestam, entretanto, á cultura d'esse germen.

A toxicidade do soluto de veneno, a despeito do desenvolvimento abundante do *B. coli* nos tubos, em que se encontravam de mistura, veneno e caldo inoculado, conserva-se inalterada como podemos verificar, matando os germens pela ebulição da mistura e administrando, por via gastrica, a uma pequena jararaca (*L. lanceolatus*) uma dose da mesma correspondente a 0,5 mg. de veneno. A morte verificou-se, como sempre, dentro de alguns minutos.

Tivemos além d'isso o cuidado de verificar que a cultura do *B. coli* nenhuma acção tem sobre a *L. lanceolatus*, quando administrada por via gastrica.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE OS INFUSORIOS:

Os infusorios não são tão insensíveis como as bacterias a acção do veneno de sapo. Desenvolvem-se mal e morrem, em alguns dias nas infusões a que se adicionem algumas gottas de veneno. Logo após a addição do veneno nota-se ao microscopio, viva agitação dos infusorios; 20 minutos mais tarde mostram-se pouco activos; 24 horas depois certas formas desaparecem; outras permanecem activas. A toxicidade tambem n'este caso não é alterada, como provamos por experiencias em animaes sensíveis.

A TOXICIDADE DO SORO DE SAPO:

Physalix e Bertrand que admittem o sapo, como muito resistente ao proprio veneno, verificaram, no sangue e nos tecidos d'este animal, propriedades toxicas, que attribuiam a passagem na corrente circulatoria, de elementos constituintes do veneno elaborados pelas glandulas. Nas primeiras experiencias que fizemos sobre este assumpto, os resultados foram completamente negativos, como consta da nossa nota previa, revelando-se o sangue ou o sôro d'este animal, completamente desprovido de acção toxica, pois, nos foi possivel injectar sem observar symptoma algum de envenenamento, até 1 c. c. de sôro de sapo na veia do pombo. Experiencias posteriores, vieram, entretanto, modificar sensivelmente estes resultados, pois, examinando, sob este ponto de vista, um maior numero de sapos, achamos que em alguns d'elles encontrava-se realmente o sangue com propriedades toxicas, e o que é mais, apresentando um gráo de toxicidade variavel de um para outro exemplar, o que nos levou a acreditar na passagem accidental, do veneno da glandula, para circulação, por uma condição, cujo mecanismo nos escapa, podendo-se, entretanto, logicamente, admittir-se a absorpção consecutiva a pequenas lesões vasculares, occorridas no tecido periglandular.

Verificamos, além disso, que a toxicidade do sangue, n'estas condições, corria por conta da presença n'elle de pequenas quantidades do veneno granuloso, facto este testemunhado por duas de suas principaes propriedades:—acção por via-gastrica e resistencia a ebulição.

Não se trata de uma secreção interna normal e continua, pois, não só pode faltar em absoluto, na circulação, como, quando existe, é em quantidades infinitamente pequenas e variaveis.

As experiencias do nosso collega Dr. Jayme Pereira, sobre a acção d'este veneno sobre o coração, e relatados n'este mesmo volume, demonstram que as fibras musculares lisas do sapo reagem de modo tão accentuado como a dos outros animaes, não podendo, consequentemente o veneno existir na circulação d'este animal senão em quantidades minimas e accidentaes.

Eis algumas de nossas experiencias sobre a toxicidade do sôro de sapo, obtido do sangue colhido por punção da aorta e centrifugado depois da separação do coagulo:

Sôro de cinco *B. marinus*:

Pombo n.º 78—Recebe 0, c. c. 1 do sôro mais 0, c. c. 9 do sôro physiologico na veia; não apresentou symptoma algum.

Pombo n.º 50—Recebe 0, c. c. 5 do sôro mais 0, c. c. 5 do sôro physiologico na veia; não apresentou symptomas.

Pombo n.º 178—Recebe 1 c. c. do sôro na veia; não apresentou symptomas.

Sôro de 3 *B. marinus*, obtido por punção do bulbo arterial.

Cobaio, pesando 454 grs.—Recebe 4 c. c. do sôro por injeção subcutanea; forte edema 8 horas depois da injeção, paralytico em 24 horas e morte em 27 horas.

Sôro obtido de 4 *B. marinus*:

Lachesis lanceolatus, de 30 c. de comprimento, recebe por via gastrica 2 c. c. do sôro; agitação immediata, seguida de vomitos, paresia, convulsões, paralytia e morte em 7 minutos.

Lachesis lanceolatus, de 40 c. c., recebe por via gastrica, 0,5 c. do sôro; mesmos symptomas e morte em 50 minutos.

Sôro de um *Bufo marinus*:

Camondongo de 22 grs., recebe por via gastrica, 1 c. c. do sôro. Não apresentou symptomas.

Sôro de um *Bufo marinus*:

Lachesis lanceolatus de 40 c. c., recebe por via gastrica, 1 c. c. de sôro Não apresentou symptomas.

Lachesis neuwiedii, de 30 c., recebe 1 c. c. por via gastrica. Nenhum symptoma.

Sôro de um Bufo marinus:

Lachesis lanceolatus, recebe 1 c. c. do sôro por via gastrica. Não apresentou symptomas.

Sôro de um Bufo marinus:

Pombo n.º 31—Recebe na veia 1 c. c. do sôro. Apenas nauseas e vomitos.

Pombo n.º 25—Recebe na veia 2 c. c. do sôro. Apenas nauseas e vomitos.

Sôro de um Bufo marinus:

Lachesis lanceolatus, de 35 c., recebe 1 c. c. de sôro por via gastrica. Morte em 7 minutos.

Pombo n.º 22—Recebe na veia 2 c. c. do sôro. Morte em 30 minutos.

Camondogo de 25 grs.—Recebe por injeccão subcutanea, 1 c. c. do sôro. Não apresentou symptomas.

Coelho n.º 342—Recebe na veia 2 c. c. do sôro. Não apresentou symptomas.

Mesmo com o ultimo sôro, o mais toxico, que encontramos, só as serpentes e os pombos, animaes extremamente sensiveis, apresentaram phenomenos de envenenamento.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE O CORAÇÃO:

A administração d'este veneno, quer por via gastrica, quer por via parental, provoca notavel acceleração e reforço dos movimentos cardiacos. Tanto no cobaio, como nas serpentes, o coração é o ultimo órgão paralyzado, não parando, senão quando os musculos voluntarios tornam-se inertes e desaparecem completamente os movimentos respiratorios. Nos ophidios pode o coração continuar a bater até 40 ou 50 minutos, depois da cessação de outra qualquer manifestação de vida, parando sempre em systole ventricular.

Eis uma das nossas experiencias:

Em um cobaio, fixado em decubito dorsal, introduzimos uma pequena haste de aço, de modo a transfixar a pelle e a camada muscular do thorax, até attingir a parede ventricular do lado esquerdo. Contamos logo depois de terminada a operação 100 batimentos fracos por minutos.

A's 13 horas e 5', injeccão de 5 mgs. de veneno.

A's 13 horas e 6', 100 pulsações mais amplas por minuto.

A's 13 horas e 10' 120 pulsações forte por minuto.

A's 13 horas e 20', 110 pulsações fortes por minuto.

Estes resultados foram confirmados pelos traçados obtidos pelo Dr. Jayme Pereira e publicados no presente numero d'estas Memorias.

Uma só gotta de soluto d'este veneno, depositada directamente sobre o coração do Bufo ou de um *Leptodactylus*, provoca, immediatamente, violentas contracções do ventriculo, que se torna quasi exangue.

ACÇÃO SOBRE A SECREÇÃO URINARIA:

O veneno de sapo é, como vimos, em outra parte d'este trabalho, indicado, pelo empirismo, como possuidor de acção diuretica. Resolvemos por isso instituir algumas experiencias afim de verificar o que de verdade havia sob esse ponto de vista.

Operamos successivamente sobre varios coelhos e cobaios, que eram collocados, cada um isolado em gaiola, apropriada, sobre uma plataforma metalica, com declividade para um orificio central, ligado por meio de um tubo, com um vidro collocado na parte inferior, que servia de collector de toda urina emittida pelo animal. Estabelecemos uma ração alimentar conveniente, mixta, constando de couve e cenoura, a qual sendo a mesma para cada especie animal em experiencia era diariamente pesada. Começamos nossas observações pelo registo da quantidade de urina, em 24 horas, durante trez dias seguidos, afim de estabelecer a media para cada animal. Depois, durante trez dias seguintes, administravamos o veneno quer por meio de fricções oleosas, quer por injeções, continuando a medir diariamente a quantidade de urina, afim de determinar a respectiva media.

Os resultados, comquanto indicassem um ligeiro augmento de diurese, na primeira experiencia, não foram constantes, em ordem a nos autorisar a tirar uma conclusão definitiva. Em todo o caso, podemos affirmar que, si a acção diuretica existe, no veneno de sapo, é ella muito pouco pronunciada.

1.ª Experiencia: —

Coelho de 1600 grs. Media da urina emittida nos dias 27, 28, 29 de Agosto de 1925. = 270 grs.

A 29 de 8, fizemos a primeira fricção com 1 c. c. de solução oleosa de veneno, no dorso do animal epilado um dia antes.

A 30-8, fizemos a fricção com 2 c. c. do mesmo oleo; quantidade de urina emittida nas primeiras 24 horas depois da primeira fricção. = 325 grs.

A 31-8, fizemos a fricção com 4 c. c. de oleo; quantidade de urina emittida 24 horas depois da segunda fricção. = 420.

A 1.º de 9, quantidade de urina emittida 24 horas depois da 3.ª fricção. = 280 grs.

Resultado final:

Media da urina 3 dias antes da administração do veneno. = 280 grs.

Media dos 3 dias depois da administração. = 342 grs.

Na segunda experiencia, os resultados foram completamente discordantes dos primeiros:

Coelho de 1300 grs.—Media de urina emittida nos dias 3, 4, 5 de 9 de 1925. = 283 grs.

Nos dias 5, 6, 7, 8, de 9; fricção com 2 c. c. de oleo.

Urina emittida nos dias 6, 7, 8 e 9 = 300, 280, 225; 320 grs. o que dá uma media de 281 grs.

Media da urina emittida nos dias 10, 11, 12 = 273 grs.

3.ª experiencia: — Resultado igualmente pouco claro.

Coelho pesando 1500 grs.—Media da urina nos dias 21, 22, 23 de 9 = 308 grs.

A 23-9, recebe por via intramuscular 2 c. c. de oleo.

A' 24-9, urina = 310 grs.; nova injeção de 2 c. c. de oleo; completamente paralytico 2 horas depois da injeção.

A 25-9, restabelecido; urina 350 grs.

A 26-9, urina 260 grs.—Media de urina durante os trez dias 306 grs.

O veneno administrado, por via oral, tanto no coelho, como no cobaio, nos deu resultados identicos aos que ahi ficam registados.

ALGUMAS LESÕES ASSIGNALADAS PELAS NECROPSIAS DE ANIMAES MORTOS PELO VENENO DE SAPO:

Quando a morte é determinada, por injeccão de dose massiça na veia, não se observam lesões, pela necropsia, a não ser congestão mais ou menos intensa dos órgãos internos, principalmente do pulmão, em que se podem assignalar pontilhados hemorrhagicos. Por injeccão de doses proximas a minima mortal, observa-se congestão notavel das mucosas; os pulmões, fortemente congestos, apresentam com o figado e o baço numerosos fócios hemorrhagicos; nos rins notam-se grandes zonas de degeneração, quando a morte é consecutiva a um envenenamento prolongado ou determinado por doses repetidas ou progressivas.

A ingestão determina congestão intensa da mucosa gastrica, acompanhada de collecção sanguinea, mais ou menos importante e muitas vezes de necrose e perfuração da parede do estomago e por vezes do intestino delgado.

A injeccão intramuscular de solutos de veneno, mesmo esterilizados, provoca enorme edema hemorrhagico e fetido no ponto da inoculação.

A presença do veneno é facilmente denunciavel no caso dos envenenamentos, por via gastrica, pelas reacções já indicadas do sulfato de ferro e do acido azotico, feito no conteudo estomacal ou no extracto obtido pela coação das paredes do estomago. Nos envenenamentos chronicos, pode-se pesquisar, do mesmo modo, o veneno no encephalo e no figado.

ACÇÃO HEMOLYTICA:

O veneno de sapo é completamente destituído de acção hemolytica. Este resultado foi confirmado, por todas as experiencias realizadas, tanto com os globulos vermelhos do carneiro, como com os de coelho, mesmo depois de um contacto, por 24 horas, na estufa a 37°.

ACÇÃO COAGULANTE E PROTEOLYTICA:

O veneno granuloso não é dotado nem de acção coagulante, nem de acção proteolytica. Este facto, que já haviamos estabelecido por experiencias feitas com o plasma citratado a 2 °|° e com a gelatina a 20 °|°, foi plenamente confirmado a luz da nova technica, (1), que descrevemos a proposito de um estudo sobre a coagulação e proteolyse. Com a nova technica verificamos que o veneno do sapo, em doses altas, possuia acção anti-coagulante, revelada no retardamento da coagulação normal do plasma fluoretado, pelo sôro, quando á mistura adiciona-se veneno granuloso em proporção conveniente.

(1) Drs. Vital Brazil e J. Vellard. — Contribuição ao estudo da coagulação e da proteolyse.—(Brazil Medico n.º 18—1.º de Maio de 1926.

RESISTENCIA DO VENENO GRANULOSO:

Um dos caracteres, d'este veneno mais digno de nota, e sobre o qual ja chamamos a attenção, em outro ponto d'este estudo, é constituido pela sua resistencia aos agentes physico-chimicos mais energeticos, emprestando-lhe uma caracteristica inteiramente differente da de outros venenos de origem animal, taes como o das serpentes, o do escorpião e das aranhas, os quaes são facilmente destruidos ou alterados pelos agentes exteriores.

Assim é que este veneno resiste á luz, ao calor, aos reagentes chimicos mais energeticos, taes como os acidos fortes, o alcool, o ether, a acetona, o chloroformio. Os solutos concentrados ou diluidos, podem ser esterilizados a 120° na autoclave sem que soffram a minima diminuição de actividade. Os solutos em oleo de oliva resistem, sem modificação de actividade, á temperatura de ebulição d'este vehiculo a 160°. Sob a influencia da luz, os solutos aquosos, escurecem lentamente, tomando uma coloração pardacenta, sem que, entretanto, haja modificação das suas propriedades toxicas. A glicerina e a formalina não exercem influencia alguma sobre a sua toxicidade. Do mesmo modo são inactivas: a agua oxygenada, a tintura de iodo, o soluto de hyposulfito de sodio a 50 ‰, a solução deci-normal de soda, soluto de nitrato de prata, etc.

Com os solutos de perchlorureto de ferro, dá o veneno um precipitado abundante; tanto o filtrado, como o precipitado se conservam toxicos.

Com o acido chromico, observa-se igualmente um precipitado; o filtrado continua toxico, emquanto que o precipitado suspenso em agua distillada é inactivo.

As soluções de veneno tratadas pelo acido sulfurico concentrado, dão após a ebulição um abundante precipitado branco, que colhido em filtro e lavado, com agua distillada ou solução fraca de soda e retomado em suspensão em agua distillada, determina a morte de animaes sensiveis, quando administrado por via gastrica.

Com o acido chlorhydrico, o mesmo facto pode ser observado.

Com o acido azotico não ha precipitado.

Em contacto com o succo gastrico o veneno conserva toda a actividade. Verificamos esse facto pelo exame da toxicidade do veneno introduzido directamente, quer no estomago de ophidios quer no estomago de batrachios.

As soluções de permanganato de potassio, são promptamente reduzidas pelo veneno, exercendo uma acção attenuante de sua toxicidade.

Para verificação da alteração ou attenuação de toxicidade dos solutos de veneno, depois de sobre elles fazer actuar os agentes em ensaio, empregamos pequenas serpentes venenosas, Lachesis ou Crotalus, muito sensiveis ao veneno por via gastrica, prestando-se optimamente para este fim.

PRINCIPIOS ACTIVOS DO VENENO GRANULOSO:

Como vimos anteriormente, varios autores, que se occuparam com o estudo chimico d'este veneno, isolaram, d'elle, principios acti-

vos, a que attribuiram propriedades características, quer do ponto de vista chimico, quer do ponto de vista de sua acção physiologica.

Na impossibilidade de verificar todos estes trabalhos, tratamos de pesquisar si por meio do emprego de differentes dissolventes, seria possivel separar substancias com propriedades toxicas diversas.

1.^a *experiencia*: — Em uma primeira experiencia, tratamos 100 mgs. de veneno secco pelo alcool; 100 mgs. pelo ether; 100 mgs. pela acetona; 100 mgs. pelo chloroformio. Depois de 14 dias de contacto com os dissolventes, foram estes differentes solutos filtrados, separadamente e evaporados na estufa. O residuo de cada um d'elles, retomado por agua distillada, para ser ensaiado, por via gastrica em pequenas serpentes.

O residuo da parte soluvel em *alcool*, é escuro, resinoide sob a forma de laminas corneas, escuras. Reacção pelo acido azotico e pelo sulfato de ferro positivas. Acção toxicologica sobre os pequenas serpentes, perfeitamente comparavel a do veneno total.

O residuo, da parte soluvel no *ether*, é amarellado, de aspecto untoso e muito pouco soluvel em agua distillada. Reacção pelo acido azotico positiva, pelo sulfato de ferro negativo. Revelou-se igualmente activa sobre as serpentes.

O residuo da parte soluvel na *acetona* é amarellado, completamente soluvel n'agua distillada. Reacção positiva tanto com acido azotico, como com o sulfato de ferro. Igualmente activo sobre as serpentes.

O residuo da parte soluvel no chloroformio é pardacento, dissolvendo-se lenta mas completamente em agua distillada. Reacção positiva com o acido azotico e com o sulfato de ferro. Mesma actividade para os animaes.

2.^a *experiencia*: — 176 mgs. de veneno secco foram dissolvidos em agua distillada; soluto filtrado e evaporado; o residuo tratado successivamente pela acetona, pelo chloroformio, pelo ether, pelo alcool e pela agua distillada.

Examinada cada uma d'estas fracções sob o ponto de vista de sua toxicidade para as pequenas serpentes, verificamos em todas ellas a mesma acção do veneno total com a sua caracteristica symptomatologia, variando tão sómente dentro de certos limites a minima mortal.

3.^a *experiencia*: — Cincoenta mgs. de veneno secco são tratados por 100 c. c. de chloroformio; depois de um contacto de 15 dias, filtra-se; a parte soluvel, depois de evaporada, é retomada pela agua distillada e ensaiada ao mesmo tempo que a parte insolavel. Uma e outra mostraram-se igualmente activas para as pequenas serpentes, matando-as em poucos minutos. Do mesmo modo agimos, empregando a acetona como dissolvente. Tanto a parte soluvel, como a insolavel eram igualmente activas.

D'estas experiencias e de outras muitas que realisamos, com o mesmo fim, nos ficou a convicção de que, pelo methodo de dissolventes, era impossivel isolar-se o veneno no seu estado de pureza, ou os seus principios activos, na hypothese de ser elles de constituição multipla ou complexa como querem os já citados autores.

CAPITULO IV

VENENO MUCOSO OU VENENO ABDOMINAL DO BUFO MARINUS:

Já assignalamos, anteriormente, que certos autores sustentam que as glandulas cutaneas da pelle do abdomen do sapo elaboram uma secreção differente da das glandulas de veneno granuloso, localisadas principalmente no dorso e que esta secreção denominada mucus ou secreção mucosa é tambem toxica. *Physalix e Bertrand, Dehaut e M.me Physalix*, emprestam-lhe propriedades muito differentes das do veneno granuloso, affirmando que a mesma existe só, com exclusão da do veneno propriamente dito na face abdominal dos batrachios.

Estas conclusões estão em desacordo com os resultados de nossas experiencias feitas com o veneno abdominal do *Bufo marinus*. Assim é que verificamos que o extracto obtido da pelle abdominal, tanto por maceração em agua, como pelo tratamento de alcool-ether, possuia acção toxicologica analoga a do veneno granuloso, não diferenciando-se d'este senão por ser muito mais fraco, exigindo uma dose muito maior para produzir os mesmos effeitos. Quanto as propriedades principaes ou, por assim dizer, fundamentaes do veneno granuloso são as mesmas que caracterisam a secreção que estudamos: a mesma facilidade de penetração atravez da mucosa, a sua resistencia consideravel ao calor e a todos os agentes exteriores, as reacções coloridas com diversos agentes chronicos e a propriedade caracteristica de se accumular no organismo, matando por doses cumulativas.

As propriedades do veneno mucoso, que os autores assignalam para os batrachios bem como as que observamos para secreção mucosa de um *Cystignathidae*, o *Leptodactylus pentadactylus*, são completamente differentes das que encontramos na pelle abdominal do *Bufo marinus*, o que nos induz a crer que a toxicidade da secreção abdominal do Bufo seja devida a presença de um pouco de veneno granuloso secretado por glandulas rudimentares existentes na pelle do ventre. Assim se explica que o veneno de mistura com a secreção mucosa, consequentemente muito diluido ou impurificado, se apresente muito menos energico, do que o colhido directamente das paratoides.

TERCEIRA PARTE

VENENO DE ALGUMAS OUTRAS ESPECIES DE BATRACHIOS

Os outros batrachios, cujo veneno procuramos estudar, pertencem a um grupo completamente distincto dos Bufonidae, que primeiro nos chamou a attenção; subordinam-se ao dos *Cystignathidae*, caracterisado externamente pela presença de dentes no maxillar superior e ausencia de discos adhesivos nos dedos. Este grupo encerra numerosas especies, entre as quaes, o fallado *Intanha* ou *Sapo boi* e a grande ran, sul-americana, o *Leptodactylus pentadactylus*, ou *gia*. Segundo o genero a que pertencem, variam muito, os caracteres exteriores destes batrachios. Alguns tem a pelle completamente lisa, outros apresentam saliencias, ou asperezas glandulares mais ou menos desenvolvidas; outros finalmente tem a pelle tão granulosa, como a dos sapos, com numerosos e volumosos conglomerados de glandulas, analogas as paratoides dos Bufos.

Algumas d'estas especies possuem veneno bastante activo; outras, ao contrario são completamente desprovidas de secreção toxica.

CAPITULO I

CERATOPHRYS DORSATA. WIED.—INTANHA, SAPO BOI OU SAPO DE CHIFRE.

O sapo *Intanha*, animal bem conhecido dos sertanejos, entre os quaes gosa de uma reputação detestavel é um grande batrachio, de aspecto completamente caracteristico. Tem o corpo relativamente curto, muito largo, a cabeça muito desenvolvida, a bocca enorme, occupando cerca de um terço do comprimento do corpo; as patas anteriores são curtas, muito fortes; as posteriores um pouco mais desenvolvidas. A cabeça coberta de cristas osseas salientes; na parte dorsal anterior apresenta um escudo dermico ossificado, soldado anteriormente aos ossos do craneo. As palpebras superiores, apresentam, na sua parte mediana, um longo prolongamento membranoso em forma de ponta, que lhe dá apparencia de cornos, quando as pal-

pebras estão levantadas, originando-se d'este appendice os nomes vulgares de *sapo boi* ou *sapo de chifres*. Os tegumentos dorsaes, assim como os da face superior dos membros, são cobertos de dobras e excrescencias, duras, corneas, de formas variaveis. O desenho e o colorido variam muito de um a outro exemplar. O fundo dos tegumentos é de um pardo roxeado; a parte mediana dorsal é occupada por um largo desenho irregular, de tom variando do verde claro ao verde escuro, prolongado anteriormente por uma faixa da mesma côr até a ponta do focinho e dividindo-se posteriormente em um certo numero de ramos divergentes sem regularidade ou symetria, passando gradualmente do verde ao amarello; os lados são amarellos, raramente verdes; os membros são amarellos ou verdes na face superior com faixas transversaes da côr do fundo e com algumas manchas vermelhas; a face ventral é esbranquiçada.

Eis as dimensões de um exemplar femea, de tamanho medio (estampa I). Comp. do corpo 160 m. m.; comp. da cabeça 60 m. m.; largura maxima da cabeça 60 m. m.; patas ant. 102 m. m.; patas post. 195 m. m. Os machos são um pouco menores do que as femeas. Esta especie tem uma larga zona de distribuição, mas não é muito abundante. Temos recebido exemplares do Estado do Paraná, de Santa Catharina, de S. Paulo e do Rio de Janeiro.

Poucas informações colhemos sobre os seus habitos. *O sapo intanha* habita as florestas ou as plantações feitas em terrenos recentemente desbravados. E' essencialmente noturno; fica durante o dia enterrado na terra humida, deixando a descoberto, apenas a parte superior da cabeça. Exemplares conservados vivos, muitos mezes no Museo do Instituto, ficaram occultos assim durante todo o dia. Para enterrar-se no solo, faz, girando sobre si mesmo, um buraco de forma conica. A noite sahe para caçar. Gosta muito da agua, ficando de tempos a tempos muitas horas dentro d'agua, como tivemos occasião de observar. Sua voz, que se faz ouvir principalmente á noite ou de dia quando é irritado, é estridente e forte muito differente do coaxar de outros batrachios, podendo ser ouvida a grandes distancias. E' carnivoro, alimentando-se de toda a sorte de animaes, insectos, batrachios, pequenos mammiferos, etc. Em alguns paizes é accusado com *a gya*—*Leptodactylus pentadactylus*—de atacar os pintos. Aos nossos exemplares demos camondongos que foram mortos e engolidos com facilidade. A digestão, assaz lenta, levando de 4 a 7 dias se faz de modo completo, não poupando nem os ossos; só as substancias corneas resistem.

O sapo intanha tem muita força nas maxillas e quando, irritado, apresenta-se-lhe um pedaço de pau ou um objecto qualquer, elle morde-o com violencia, não abandonando facilmente a preza, podendo ser assim transportado a grande distancia, agarrado ao objecto em que mordera. Esta observação justifica a tradição popular que diz que este sapo quando morde, nem depois de morto abandona a victima.

Tentamos extrahir o veneno do intanha pelo mesmo processo, que empregamos para os bufos, fazendo pressão sobre as excrescencias corneas do dorso, onde nos pareciam estar localizadas glandulas cutaneas. Não conseguimos nenhuma gotta de liquido.

Procuramos, então, obter, por maceração da pelle dorsal, durante 10 dias, em uma mistura de alcool-ether, o veneno cutaneo, d'esta

especie. Pela evaporação do liquido de contacto com a pelle, obtivemos 65 mgs. de um residuo soluvel em agua distillada, completamente atoxico, mesmo na dose de 20 mgs. por via venosa no pombo ou por via gastrica nas pequenas serpentes muito sensiveis. Os mesmos resultados negativos foram registados para a pelle do abdomen, tratada pelo alcool, ether ou pela agua distillada.

Para verificar si a secreção abundante fornecida por toda mucosa buccal, muito rica em glandulas, possuia acção toxica, permitindo a este animal matar rapidamente as suas victimas, procuramos colhel-a quer directamente, depois da anesthesia chloroformica, quer fazendo o sapo morder um chumaço de algodão hydrophylo. Com o material colhido por um ou por outro d'estes processos, não conseguimos verificar nem acção toxica geral nem phenomenos locaes.

Fizemos, finalmente, o *intanha*, morder directamente diversos animaes sobre os membros, como ratos e cobaios, os quaes não apresentaram signal algum de intoxicação, si bem que os dentes do sapo tenham penetrado profundamente nos tecidos e que a mordedura tenha durado de 5 a 10 minutos.

CAPITULO II

PYXICEPHALUS CULTRIPES

O *Pyxicephalus cultripes*, é um pequeno batrachio cavador, de aspecto muito differente dos *Ceratophrys*, entre os quaes, entretanto, foi incluído por Boulenger e Nieden. Günther estabelecera anteriormente o genero *pyxicephalus*, baseado na presença de esporas nos tarsos posteriores, a lingua arredondada, a presença de paratoides, a ausencia de prolongamento das palpebras, etc., para uma unica especie, o *Pyxicephalus americanus* do qual separou-se posteriormente o *P. cultripes*.

Mais tarde *Espada* descreve o *P. leyboldi* do Chile e Berg o *Ceratophrys occidentalis* da Argentina, que pertencem ao mesmo grupo.

Em razão do aspecto do *Pyxicephalus*, bem differente do *Ceratophrys*, dos principaes caracteres discriminativos indicados por Günther e principalmente pela presença de numerosos grupos glandulares, fornecendo um veneno leitoso, preferimos voltar a antiga denominação, a reunir estas quatro especies ao *intanha* e aos outros *Ceratophrys* visinhos, que formam um grupo muito homogeneo.

O *P. cultripes*, se reconhece por seu corpo empelotado, curto, a cabeça pouco distincta do thorax, as patas anteriores muito curtas, as posteriores mais longas, fortes, tendo, ao longo do bordo interno do tarso, uma saliencia cornea, dura, servindo para cavar o solo, d'onde o seu nome *cultripes*; os dedos têm todos fortes granulações corneas; todos os tegumentos dorsaes são semeadores de glandulas mais ou menos desenvolvidas; atraz da cabeça existem dois grupos

maiores de glandulas, que pela forma e localização correspondem ás paratoides dos Bufos, cercados de 3 ou 4 grupos menores; o grupo tibial posterior é muito desenvolvido. A côr geral é de um preto esverdeado, com algumas manchas irregulares de tom amarello claro; apresenta as vezes uma faixa lateral e outra mediana, de côr amarellada, mais ou menos visiveis que podem faltar completamente; o ventre é negro marchetado de branco azulado.

Dimensões de uma femea adulta: com. total 63 m. m.; com. da cabeça 22 m. m.; largura 30 m. m.; pata ant. 42 m. m.; pata post. 79 m. m. Os machos são um pouco menores com um sacco vocal bem desenvolvido.

Não conhecemos quasi nada de sua biologia. E' uma especie cavadora, vivendo enterrada no solo. Os exemplares que recebemos estavam sempre cobertos de terra secca. Quando é agarrado ou tocado, encurva-se sobre si mesmo, empelotando-se de tal forma que chega a tomar a apparencia de uma bola. Não se defende, nem procura morder, como os *Ceratophrys*. Nunca ouvimos a sua voz.

A distribuição geographica d'esta especie é bastante extensa. Recebemos exemplares dos Estados de São Paulo, Paraná, Goyaz e Matto Grosso.

VENENO:

Obtem-se facilmente o veneno d'esta especie por pressão directa das glandulas. De côr branca azulada, inodor, de consistencia mucilagínosa, de reacção neutra ao tournesol, secca-se facilmente em contacto do ar. Um só exemplar de cultripes pode fornecer de 40 a 80 mgs. de veneno fresco. Este é muito lentamente soluvel na agua distillada, e ainda mais difficilmente soluvel nas soluções salinas fracas; parcialmente soluvel no alcool, no ether, no chloroformio e na acetona. O veneno secco na estufa a 37.º é tão activo como o recentemente colhido, abstracção feita da perda de peso. Não dá precipitado algum, nem coloração com o acido azotico, com o acido sulfurico e com o sulfato de ferro; com o acido chlorhidrico, dá um precipitado branco; finalmente tem uma acção reductora muito inferior a do veneno do bufo.

Distingue-se principalmente d'este ultimo veneno, pela presença de quantidade notavel de substancias albuminoides, que dão um precipitado abundante com o reactivo de Esbach e a reacção do biureto.

A existencia de uma parte albuminoide n'este veneno é ainda confirmada pela attenuação progressiva que o mesmo soffre, quando é submettido a acção de temperatura elevada e a menor actividade da parte soluvel no alcool-ether, quando comparado a do veneno total.

Parece tratar-se aqui de um veneno complexo, formado de duas partes activas,—uma albuminoide, thermo labil, outra não albuminoide, de natureza identica ao veneno do bufo, thermoresistente, soluvel no alcool e no ether.

Como o veneno de bufo, o de cultripes age por via parental e atravez das mucosas. E' pouco convulsivante e muito paralysante, exercendo sua acção primeiro sobre os musculos da vida de relação; o coração é ainda o ultimo orgão atacado. Determina forte reacção

local, por injeção subcutanea ou por applicação sobre a mucosa ocular.

Algumas experiencias com veneno fresco dissolvido em agua distillada:

Por via parental:

Pombo 81.—Recebe 1 mg. de veneno na veia; estupor, paresia, vomitos, morte durante a noite.

Pombo 10.—Recebe 2 mgs. na veia; abre o bico e morre em seguida, sem convulsões.

Cobaio 79.—Recebe 5 mgs. de veneno, por injeção intramuscular na coxa. Na manhã seguinte enorme edema hemorrhagico occupando todo o membro e a parte inferior do abdomem. No terceiro dia esphacelo dos tecidos, com eliminação de um liquido extremamente fetido e desnudamento dos ossos da pata. Morte no quarto dia depois da injeção.

Coelho 284.—Recebe 5 mgs. de veneno na veia. Paralysis passageira.

Coelho 6.—Recebe 7 mgs. de veneno na veia; forte paresia 1 minuto depois da injeção, paralysis, cahe sobre o flanco, debate um pouco e cahe inerte; o coração bate ainda durante 2 minutos; temperatura no momento da morte 39.º 7; dilatação pupillar muito accentuada.

As minimas mortaes são pois: cerca de 1 mg. para o pombo, e 5 mgs para o coelho de 1 kg. por via venosa; e 5 mgs., por via intramuscular, para o cobaio de 300-400 grs.

Por via gastrica: ..

Lachesis lanceolatus, de 30 c., recebe por via gastrica 5 mg.; forte paresia, seguida de paralysis e morte dentro de uma hora.

Lachesis lanceolatus, com 30 c., recebe 2 mgs. de veneno, por via gastrica, paresia accentuada; restabelecida na manhã seguinte.

Pombo 22.—Recebe por via gastrica, 5 mgs. de veneno; ligeiros vomitos, sem outros symptomas.

Por applicação na mucosa ocular:

Coelho 2.—Recebe um pouco de veneno fresco, *in natura*, sobre o globo ocular; 1/4 de hora depois, paretico, uma hora mais tarde, forte edema da palpebra, seguida de conjunctivite e de keratite, persistentes ainda cinco dias depois da applicação. No 2.º dia o estado geral era normal.

Resistencia ao calor:

a) *Veneno aquecido cinco minutos a 98º.*

Lachesis lanceolatus, de 30 c.—Recebe 2 mgs. de veneno aquecido; symptomas ligeiros; restabelecido na manhã seguinte.

Pombo 3.—Recebe 4 mgs. de veneno aquecido, por injeção endovenosa; morte immediata sem convulsões.

b) *Veneno aquecido, durante 20 minutos, a 120º.*

Lachesis lanceolatus de 30 c.—Recebe por via gastrica 4 mgs. de veneno aquecido; nenhum symptoma.

Pombo 84.—Recebe por injeção endovenosa, 2,5 mgs. de veneno aquecido; paresia fica deitado; mantem-se com difficuldade sobre as patas; curtos periodos de agitação; normal na manhã seguinte.

Pombo 40.—Recebe por via venosa 5 mgs. de veneno aquecido; forte agitação immediata; o animal parece embriagado, cambaleia sobre as patas; curva-se emfim paretico; normal na manhã seguinte.

Cobaio 4.—Recebe 5 mgs. de veneno aquecido, por injeção intramuscular; forte edema na manhã seguinte, mas muito menos accusado do que no animal testemunha, desapparecendo ao fim de 4 ou 5 dias. Nenhum outro symptoma foi observado.

Ha, pois, sensível attenuação do veneno a 98.º cuja toxicidade, entretanto, não é completamente abolida, rem a 120º.

Parte do veneno soluvel no alcool:—90 mgs. de veneno de cultripes são tratados por 200 c. c. de alcool absoluto, durante alguns mezes; depois de filtração e evaporação obtem-se cerca de 18 mgs. de um residuo escuro pulverulento, muito menos toxico do que o veneno total.

Pombo 72.—Recebe 6 mgs. por via venosa; nenhum symptoma.

Lachesis lanceolatus, de 30 c.—Recebe 6 mgs. d'este veneno por via gastrica; paralysisa em 5 minutos, ligeiras convulsões e morte em 20 minutos.

Tratamos igualmente 55 mgs. de veneno por 200 c. c. de ether, obtendo por evaporação do filtrado, 10 mgs. de uma substancia amarellada e de toxicidade comparavel a substancia soluvel no alcool absoluto.

Tentativa de immunisação: — A presença de substancias proteicas podia deixar crer na possibilidade de obter-se uma immuniidade solida contra este veneno. Os resultados de nossas tentativas, nesse sentido, foram, entretanto, contrarios a essa expectativa. Um animal tendo recebido em doses progressivamente crescentes sem accidentes, duas minimas mortaes do veneno total, sucumbe, entretanto, muito mais rapidamente do que o animal testemunha, não immunisado, ao receber a minima mortal do veneno aquecido a 120º. Houve, pois, immuniidade sómente contra a parte albuminoide do veneno, não se dando o mesmo com relação a parte thermoresistente, que longe de determinar a formação de anti-corpos, accumulou-se no organismo, determinando a morte rapida do animal, ao receber uma só minima mortal de veneno aquecido, consequentemente sem a parte albuminoide.

Eis o protocollo de uma das tentativas de immunisação, feitas no coelho, com solução de veneno fresco em agua distillada; injeções sub-cutaneas:

Coelho 121, peso 1820 grs.:

5-11-25—recebe	1,25 mg.	13-11-25—recebe	10 mgs.
6-11-25—recebe	2,50 mg.	14-11-25—recebe	11,25 mgs.
7-11-25—recebe	3,75 mg.	16-11-25—recebe	12,50 mgs.
8-11-25—recebe	5,0 mg.	17-11-25—recebe	13,25 mgs.
10-11-25—recebe	6,25 mg.	19-11-25—recebe	7,50 mgs.
11-11-25—recebe	7,50 mg.	21-11-25—recebe	15,0 mgs.
12-11-25—recebe	8,75 mg.	24-11-25—recebe	30,0 mgs.

Total do veneno recebido até 24-11-25, 134,50 mgs. Peso do coelho 1,780 grs.

Testemunha: Coelho 27, recebeu 15 mgs. do veneno total, por injeção subcutanea; morte em 20 horas.

Prova de immuniidade com o veneno aquecido durante 30 minutos a 120°.

1-12-25: —

Testemunha: — Coelho 32.—Recebe na veia 25 mg. de veneno secco dissolvido em agua distillada e esterilizada, durante 30 minutos a 120°, na autoclave; morte em 22 horas.

Coelho 121. — Immunizado, de accordo com plano anterior, tendo supportado na ultima injeccão duas minimas mortaes do veneno total.—Recebe 20 mgs. do veneno aquecido a 120°; morte em 14 minutos.

Secreção abdominal:—Por maceração aquosa ou alcoolica da pelle do abdomen do *P. cultripes*, filtração e evaporação obtivemos uma substancia soluvel em agua distillada completamente desprovida de acção toxica, tanto por via gastrica como por via parental, nos animaes sensiveis.

CAPITULO III

LEPTODACTYLUS PENTADACTYLUS

Laur.—Ran ou Gia.

O *Leptodactylus pentadactylus*, é uma das especies de batrachios que a maiores dimensões pode attingir, egualando ao tamanho dos grandes sapos (*Bufos*), com os quaes por vezes, é confundida, pelo vulgo, apezar de seus caracteres differenciaes perfeitamente distinctos.

Além de suas proporções avantajadas, ha a registrar, nesta especie, os seguintes caracteristicos: cabeça achatada, sem crista ossea, focinho alongado; presença de dentes no maxillar superior; membrana do tympano bem apparente; as palpebras não prolongadas em ponta como nos *Ceratophrys*; os braços e principalmente as coxas attingem um desenvolvimento extraordinario, notadamente nos machos; estes ultimos, no periodo de actividade sexual, apresentam fortes excrescencias corneas nas mãos e dois pontos peitoraes muito duros; a pelle é sempre humida, coberta de mucus de acção urente, quando penetra nas soluções de continuidade dos tegumentos; na face dorsal, sobre os membros existem pequenissimas granulações glandulares mais ou menos numerosas assim como em duas series de cada lado do dorso. Os exemplares velhos podem attingir a 17 centimetros de comprimento. Eis as dimensões do macho adulto: comp. 170 m. m.; comp. da cabeça 56 m. m.; largura maxima da base 64 m. m.; patas ant. 100 m. m.; patas post. 220 m. m.; espessura do braço 26 m. m.; espessura da coxa 46 m. m. *W*

A côr é variavel de um para outro individuo; o fundo da face dorsal é geralmente de um cinzento esverdeado, mais ou menos escuro, as vezes manchada de negro. Os membros são da côr do fun-

do, com faxas transversaes mais escuras; a face interna das coxas é vermelha, com um desenho negro; a face ventral é branca com um desenho negro mais ou menos carregado. Alguns exemplares são quasi negros no dorso, outros avermelhados.

E' uma especie aquatica, muito espalhada e muito commum em certas regiões.

Temos recebido exemplares de um grande numero de localidades do Estado de S. Paulo, de Santa Catharina, do Paraná, de Minas Geraes e de Goyaz. *Lutz* assignala o facto de não ser encontrada no Districto Federal.

Não tivemos oportunidade de fazer observações precisas sobre os seus habitos. *Lutz* diz que ella pode engulir facilmente outras rãs de regular tamanho e pintos. No interior gosa da reputação de atacar os pintos, conforme nos informou um correspondente ao nos enviar um exemplar, que classificou de "*sapo devorador de pintos*". Por nossa parte observamos, que um exemplar guardado, com um *Leptodactylus gracilis*, engoliu este ultimo.

As larvas e o desenvolvimento d'esta especie foram observadas por *Lutz*.

ESTUDO DO VENENO:

Não sendo possivel obter, directamente, o producto das secreções cutaneas d'esta especie, recorreremos ao processo de maceração tanto em agua distillada, como em alcool ou ether.

Extracção pelo alcool:—Pelles inteiras tratadas, pelo alcool absoluto, não abandonaram substancia alguma toxica; o residuo obtido, depois de filtração e evaporação do alcool, redissolvido em agua distillada, apresentava reacção fracamente acida ao tournesol; pela addição de acido chlorhydrico, de acido azotico, de ammoniaco, de sulfato de ferro, não dá precipitado algum ou mudança de coloração; com um grande excesso de acido sulfurico, coloração azul palido, tornando-se negro pela ebulição; a solução de permanganato de potassio a 1°¹⁰⁰ é rapidamente descorada.

A injeccção de 10 mgs. na veia do pombo ou no tecido subcutaneo do coelho ou a administração da mesma dose, por via gastrica a uma pequena *Lachesis lanceolatus*, não determina phenomeno algum de envenenamento, nem reacção local.

Extracção pela agua distillada:—Pelles inteiras, da parte abdominal, tratadas pela agua distillada, fornecem, ao contrario, uma substancia toxica de propriedades bem differentes das do veneno do Bufo. Para obtel-a basta deixar as pelles em contacto com agua distillada, durante duas ou trez horas, filtra-se, em seguida o producto d'esse macerado, obtendo-se um soluto opalescente, viscoso, neutro ao tornesol, com cheiro forte *suigeneris*, muito semelhante ao do animal vivo. Este soluto coagula pela addicção de alcool e dos acidos fortes. Não é toxico por via gastrica, nem mesmo para os mais sensiveis ophidios. Por via venosa mata o pombo rapidamente. Os solutos evaporados na estufa a 37° e retomados pela agua distillada, perdem a toxicidade.

1.º de Junho de 1926.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VENIN DES BATRACIENS

PAR LES DRS.

VITAL BRAZIL ET J. VELLARD.

1. — Les traditions de différents peuples attribuent aux crapauds des propriétés venimeuses et en de nombreuses régions ces animaux sont employés empiriquement dans la cure de diverses maladies.

De nos jours des accidents locaux ou généraux, parfois même mortels, ont été signalés par divers observateurs, tant chez les animaux, que chez l'homme à la suite de l'ingestion de ce venin ou d'application sur la peau ou les muqueuses.

2. — Les recherches expérimentales réalisées sur les diverses sécrétions des batraciens, principalement des crapauds, ont abouti à des conclusions très différentes les unes des autres soit sur leur origine, soit sur leur nature chimique, leur action physiologique ou leur degré de toxicité.

3. — Dans le travail actuel les Auteurs ont étudié les sécrétions cutanées de plusieurs batraciens du Brésil: *Bufo marinus*, L., *B. paracnemis*, Lutz, *B. arenarum*, Hensel, et *B. crucifer* Wied, de la famille des *Bufo* ou crapauds proprement dits; et du *Ceratophrys dorsata* Wied ou Intanha, du *Pyxicephalus cultripes*, Rhet et Ltk. et du *Leptodactylus pentadactylus*, Laur. grande grenouille américaine ou gia, de la famille des *Cystignathidae*.

4. — La sécrétion laiteuse fournie par les nombreuses glandes dorsales des *Bufo*, groupées en petites papules ou en amas volumineux (paratoides etc.) constitue un venin extrêmement actif, semblable, sauf de légères variations dans les propriétés chimiques, chez tous les *Bufo* étudiés et très différent des venins ophidiens ou arachnidiques.

5. — Se desséchant rapidement à l'air, il se redissout lentement mais complètement dans l'eau distillée et les solutions salines faibles, partiellement dans l'alcool, l'éther, le chloroforme et l'acétone; il résiste sans altération à la température de 160°, à l'action de la lumière, du temps, des acides forts et des alcalis avec plusieurs des quels il donne des réactions colorées; il ne contient pas de substances albuminoïdes permettant le développement des germes, sans posséder de propriétés antiseptiques.

6. — Doué de pénétration extraordinaire à travers toutes les muqueuses, il agit aussi rapidement par cette voie que par voie parentale; il détermine d'abord une période d'agitation accompagnée de nausées, de vomissements, d'hypersécrétion, suivie de parésie et de paralysie à début postérieur entre coupée de violentes convulsions toniques; le coeur s'arrête après la respiration; hyperthermie et mydriase notables; localement, ischémie initiale des muqueuses, puis forte irritation locale, pouvant déterminer des ophtalmies graves, ou même la cécité définitive, des perforations stomachales, des œdèmes hémorragiques énormes.

7. — Sur le coeur son action se traduit d'abord par le renforcement et l'augmentation des battements, suivis d'arythmie; il paraît dépourvu d'action diurétique mais possède une affinité spéciale pour les éléments nerveux.

8. — Dépourvu d'action protéolytique ou hémolytique, il retarde *in vitro* la coagulation. Il ne provoque pas la formation d'anti corps mais s'accumule dans l'organisme, la mort survenant quand le total des doses fractionnées injectées est équivalent à la dose minima mortelle d'emblée.

9. — Tous les animaux sont sensibles à son action et le propre crapaud succombe à une dose 200 ou 300 fois moindre que celle qu'il peut fournir.

Les minimas mortelles par diverses voies ont été déterminées pour des représentants de toute l'échelle zoologique. Les ophidiens sont particulièrement sensibles à ce venin.

10. — La sécrétion abdominale des *Bufo*, beaucoup moins active que le venin granuleux paraît devoir ses propriétés à la présence de petites quantités de ce dernier ou d'un corps très semblable.

11.—Accidentellement des traces de venin peuvent passer dans la circulation communiquant ainsi une toxicité très faible et passagère au serum des crapauds.

12. — Le *ceratophrys dorsata* ou Intanha, gros batracien des forêts brésiliennes, très redouté des gens de l'intérieur est dépourvu de sécrétion venimeuse; mais il possède de fortes dents et une très grande force musculaire qui lui permettent d'infliger des morsures douloureuses et de tuer les petits animaux (souris, batraciens, etc) dont il se nourit.

13. — Le *pyxicephalus cultripes*, au contraire possède un venin laiteux, de nature mixte, formé d'une partie albuminoïde et d'une autre partie analogue au venin des *bufo*; le partie albuminoïde est susceptible de provoquer la formation d'anti corps correspondants, qui ne protègent pas contre la partie non albuminoïde.

14. — Le *Leptodactylus pentadactylus*, ou gia, est une très grosse grenouille dépourvue de venin proprement dit; elle sécrète cependant un mucus cutané irritant, déterminant la mort du pigeon par injection endoveineuse, inactif par voie gastrique et perdant toute toxicité après disséction.

1.er Juin 1926.

BIBLIOGRAPHIA

- 1 — *Faust (Edwin S.)* — Ueber Bufonin und Bufotalin, die wirksamen Bestandtheile des Krötenhautdrüsensecretes:—*Archiv für exp. Path. und Pharm.*—Bd. 47, 1902.
- 2 — *Ambroise Paré*—(Les oeuvres de.....) 1575.
- 3 — *Piso et Marcgrav*—*Historia naturalis Brasiliae*—1648.
- 4 — *Novaro*—Action toxique du venin de crapaud pour l'homme et les animaux. *C. R. Soc. Biologie*, 2.° 1922—pag. 824-26.
- 5 — *Rondelet*.—(1507-1566), citado por Ambroise Paré.
- 6 — *Delamazière*.—Observation sur le venin du crapaud.—*Journ. de Médecine, chirurgie et pharmacie*.—XV, p. 220—Paris 1761.
- 7 — *Laurentius*.—Specimen medicum exhibens synopsis reptilium Vienna 1768.
- 8 — *Gemminger*.—Tödliche Vergiftung eines Sperbes durch eine Kröte—*Illust. Medic. Zeitung*.—1-1852.
- 9 — *Lataste* a) Essai d'une faune herpétologique de la Gironde, Bordeaux—1876.
b) Observation relative à l'action sur l'homme de la sécrétion cutanée des Batraciens.—*Ass. française pour l'avancement des sciences*.—1876.
- 10 — *Bringard*.—Curieux cas d'empoisonnement d'un chien par l'absorption buccale de la sécrétion des glandes cutanées d'un crapaud.—*Arch. med. d'Angers*.—IX-1905.
- 11 — *Boulenger*.—The tailless Batrachians of Europe.—London.
- 12 — *Staderini*.—a) *Ann. di Ottalmologia*—XVII, fasc. V-VI-1889.
b) *Bol. Ac. de Fisol. de Sienna*—1888-IV. fasc. 7.
- 13 — *Novaro*.—Action pharmacodynamique du venin de crapaud.—*C. R. Soc. de Biologie*.—LXXXVIII, p. 371-1923.
- 14 — *Davy (J)*.—Observation of the poison of the common Toad. *Phil. Trans.*—1826.
- 15 — *Duméril et Bibron*.—Erpétologie générale ou histoire naturelle complète des reptiles.—Vol. I, pag. 205.—Paris, 1835.
- 16 — *Gratiolet et Cloetz*.—a) Note sur les propriétés venimeuses de l'humeur latescente que sécrètent les pustules cutanées de la Salamandre terrestre et du crapaud commun.—*C. R. Ac. des Sciences*.—XXXII-1851

- b) Nouvelles observations sur le venin contenu dans les pustules cutanées des batraciens.—*C. R. Ac. des Sciences*.—XXIV.-1882.
- 17 — *Vulpian*.—a) Sur le venin du crapaud commun.—*C. R. Soc. Biologie*.—VI-1854.
 b) Absorption du curare et du venin du crapaud commun..... *C. R. Soc. de Biologie*.—1855, pag. 90-91.
 c) *Gazette medicale* de Paris, p. 559-560-1855.
 d) Étude physiologique du venin du crapaud, du triton et de la Salamandre terrestre. *C. R. Soc. Biologie*—2.^a série III-18⁷⁶.
 e) Note relative à l'action du venin des Batraciens sur les animaux qui le produisent.—*C. R. Soc. Biologie*—XVI-1865
- 18 — *Cuvier*.—Leçons d'anatomie comparée (2.^o édition)—III, pag. 613-1855.
- 19 — *Rainey*.—On the structure of the cutaneous follicles of the Toad,.....—*Quartely jorn. of minoscopic sc.*—III-1855.
- 20 — *Claude Bernard*.—a) Leçons sur les substances toxiques et médicamenteuses.—Paris, 1857, pag. 255.
 b) Leçons de pathologie expérimentale.—Paris, 1857—pag. 154-155.
- 21 — *Fornara* (Domenico).—a) Studi sperimentali sopra l'azione dell'upas antiar e del veleno del Rospo... Monogr.—Genova, 1872.
 b) Sur l'effet physiologique du venin de crapaud.—*Journ. de Thérapeutique*—IV, 1877, pag. 882.
- 22 — *Pugliese, A.*—a) Sull'azione methemoglobinogena del veleno de Rospo.—*Arch. de Farm. e Terapeut.* II-1894.
 b) *Archiv. Ital. Biol.* XXII-1895.
- 23 — *Phisalix C.*—a) Propriétés immunisantes du venin de la Salamandre du Japon contre le venin de vipère—*C. R. Soc. de Biologie.* XLIX-1897.
 b) Nouvelles expériences sur le venin de la Salamandre terrestre.—*C. R. Ac. de Sciences.* CLX-1899.
 c) Corrélations fonctionnelles entre les glandes à venin et l'ovaire chez le crapaud commun.—*C. R. Ac. des Sciences.* CXXXIII-1903.
 d) Les venins considérés au point de vue de la Biologie générale et de la Pathologie comparée.—*Rev. Générale des sciences*, 30 juillet 1903
 e) Influence de l'émanation de radium sur la toxicité des venins.—*C. R. Ac. de Sciences.* CXL-1905.

- Phisalix et Bertrand.*—a) Sur le venin des batraciens.—*C. R. Ac. des Sciences.*—XCVIII-1884.
 b) Recherches sur la toxicité du sang du crapaud commun.—*Archives de Phys. normale et Pathologique.*—5.^a série, V, Paris 1893.
 c) Sur les principes actifs du venin de crapaud commun.—*C. R. Ac. Sciences.*—CXXXV-1902.
- Phisalix et Contrejean.*—Nouvelles recherches sur les glandes à venin de la salamandre terrestre.—*C. R. Soc. de Biologie.*—XLIII-1891.
- 24 — *Heuser (O).*—*Arch. intern. de pharmacodyn., et therap.*—X 1902.
- 25 — *Krakow (N).*—*Russky Wratsch*—1904 n. 21 (citado por H. Wieland).
- 26 — *Kobert (R).*—a) Gift absonderung der Kröten.—*Sitzungsberichte des Dorpates Naturforschergesellschaft.*—Apr. 1889.
 b) *Lehrbuch der Intoxikationen.*—2.^a ed. 1906 II, p. 467-470; *ibid.* pag. 1221.
- 27 — *Pröscher.*—Zur Kenntniss des Krötengiftes.—*Beitr zur Chem. Phys. und Path.*—1902.
- 28 — *Pierotti.*—Recherches expérimentales sur le venin de crapaud et son action physiologique. Monographia Pisa. Resumido in *Arch. ital. de Biol.*—XLVI-1906.
- 29 — *Fühner (Herm.)* — *Archiv. Exp. Path. e Pharmak.* — LXIII 1910.
- 30 — *Wieland (Hermann).*—Ueber die Bedeutung des Calciums für die geringe Empfindlichkeit der Kröte gegen Herzgifte — *Bioch Zeitschrif.* — CXXVII-1921.
- 31 — *Dehaut.* — Les venins des batraciens et les batraciens venimeux.—Paris, 1910.
- 32 — *Phisalix (Marie).*—a) Recherches embryologiques, histologiques et physiologiques sur les glandes à venin de la salamandre terrestre. Paris, 1900.
 b) Immunité naturelle des vipères et des couleuvres contre le venin des batraciens et en particulier contre la salamandrine. *Journ. de Physiologie et Path. générale.*—1909.
 c) Animaux venimeux et venins, II, Paris, 1922.
 d) Le venin cutané muqueux du bombinator pachipus. Fitz. Var. brevipes—*Bull. Mus. Histoire naturelle.*—Paris 1923, n.º 1.
 e) Le venin cutané granuleux du Bombinator pachipus.—*Bull. Mus. Hist. nat.* Paris, 1923, n.º 7.

- 33 — *J. Baptista de Lacerda*.—Algumas experiencias com o veneno de Bufo ictericus. Spix.—*Archivos do Museu Nacional*. III Rio de Janeiro, 1878.
- 34 — *Abel e Macht*.—2 ctystalline pharmalogical agents from the Bufo aqua.—*Journ. of pharm. and exp. ther.*—III p. 320-322 1912.
- 35 — *Acrisio Bezerra*.—O sapo.—These da Bahia, 1915.
- 36 — *Pelletier*.—Note sur le venin des crapauds.—*Journal de Médecine, chirurgie, pharmacie, etc.*—XL pag. 75—Paris, 1817.
- 37 — *Davy (J)*.—On the acrid fluid secreted by the common Toad.—*Res. Phsy. and Anat.*—I Londres, 1839.
- 38 — *Casali e Fornara*.—Il veleno del Rospo e la Bufidina.—Studi sperimentali del Dott. Domenico Fornara, con una nota sopra la esperienza chimica relativa del Prof. Adolfo Casali.—*Revista clinica de Bologna*, n.º 10, 1873.
- 39 — *Calmels*.—Sur le venin des batraciens.—*C. R. Ac. des Sciences* XCVIII, 1885.
- 40 — *Bufalini*.—Sopra una reazione del veleno del rospo.—*Ann. de chim. e farmac.*—ser. 2.º, IV, 1885.
- 41 — *Hewlet*.—The venom of the Toad and Salamander.—*Science Progress.*—I, 1897.
- 42 — *Bertrand*.—Sur la nature de la Bufonine.—*C. R. Ac. des Sciences.*—XXXV, 1902.
- 43 — *Shipley and Wislocki*.—*Publication n.º 123 of the carnegie Institution of Washington.*—(Citado por Swale Vincent).
- 44 — *Hautz (Oswald)*.—Harnstoff im Harne der Kröte (Bufo cinereus). *Ann. de Chemie und Pharm.*—LXXXIV, 1852.
- 45 — *Phisalix (Mme.) e Dehaut*.—Action physiologique du venin muqueux d'un batracien le Discoglossus pictus.—*Bull du Mus. d'hist. nat.*—XIV, Paris, 1908.
- 46 — *Phisalix (Mme.) e Dehaut*.—Action physiologique du venin muqueux d'un batracien anoure, le Pelobates cultripes.—*Bull du Mus. d'hist. nat.*—XLVI, Paris, 1909.
- 47 — *Sauvage*.—Sur l'action du venin de quelques batraciens de France.—*Ass. française pour l'avancement des Sciences.*—Montpellier, 1879.
- 48 — *Gidon*.—Venins multiples et toxicité humorale chez les batraciens indigènes.—These de Paris, 1897.
- 49 — *Camis*.—Sur la résistance au curare du Leptodactylus ocellatus et sur d'autres points de la physiologie générale des muscles.—*Archiv. Ital. de Biol.*—LXVI, 1917.
- 50 — *Houssay y Hug*.—a) Toxicidade de curare para la Rana y el sapo americano y el cobayo.—*La semana medica*, Buenos Ayres 1916 e *Revista de la Asociacion medica argentina*, 1916.
b) La curarizacion del Leptodactylus ocellatus. — *La semana medica*, Buenos Ayres 1916 e *Revista de la Asociacion medica argentina*, 1916. *C. R. Soc. de Biologie*, Paris, 1916.

- 51 — *Lutz (Adolpho)*.—a) Observações sobre os Batrachios brasileiros. 1.^a parte:—O genero *Leptodactylus*.—*Instituto Oswaldo Cruz*, 26 de Abril de 1926.
- b) Nota previa sobre especies novas de batrachios brasileiros.—*C. R. Soc. de Biologie*, XC, 1924.—XCIII, 1925, e *Instituto Oswaldo Cruz*, 10 de Março de 1926.
- 52 — *Bert (Paul)*.—Venin cutané de la grenouille.—*C. R. Soc. de Biologie*.—1885, pag. 524.
- 53 — *Dutartre (Abel)*.—*C. R. Ac. des sciences*.—CX, p. 199, 1890.
- 54 — *Leroy*.—*Rana temporaria* possède-t-elle comme *Bufo vulgaris* un poison cutané.—*Arch. inter. de Physiologie*—IX, fasc. 3, 1910.
- 55 — *Pagenstecher (Alex.)*.—Allgemeinen Zoologie.
- 56 — *Escobar*.—Sur une rainette de la Nouvelle Grenade qui sécrète un venin dont les Indiens se servent pour confectionner leurs flèches.—*C. R. Ac. des Sciences*.—LXVIII.—1869.
- 57 — *Posada Arango*.—Le poison de la rainette des sauvages du Choco.—*Arch. de Médecine navale*.—XCI, 1871.
- 58 — *Nieden Fr.*—Amphibia.—Anura I.—*Das Tierreich*.—Leipzig, 1923.
- 59 — *Leydig*.—Ueber die allgemeinen Bedeckungen der amphibiën.—*Archiv. für mikr. Anat.*—XII, 1876.
- 60 — *Calmels*.—E'tude histologique des glandes à venin du crapaud et recherches sur les modifications apportées dans leur évolution normale par l'excitation électrique de l'animal.—*Archiv. de Phy. normale et Path.*—I 1883.
- 61 — *Eckhard*. — Ueber den Bau des Hautdrüsen des Kröten. — *Muller's Archiv. für Anat.*—Jahrgang, 1849, p. 425-428.
- 62 — *Ranvier*.—Morphologie du système lymphatique; de l'origine des lymphatiques dans la peau de la grenouille.—*C. R. Ac. Sciences*.—CXX, 1895.
- 63 — *Weiss (Otto)*.—Ueber die Hautdrüsen von *Bufo cinereus*.—*Archiv. für mikr. Anat.*—LIII, 1899.
- 64 — *Swale Vincent*.—An introduction to the Study of Secretion. London, 1924.
- 65 — *Engelmann*.—Die Hautdrüsen des Frosches.—*Pflüger's Archiv. f. d. ges. Phys.*—V, 1872.
- 66 — *Schultz (P)*. — Ueber die giftdrüsen der Kröten und Salamander.—*Archiv. f. mikr. anat.*—XXXIV, p. 11-57, 1889.
- 67 — *Seeck (Oscar)*.—Ueber die Hautdrüsen einigen amphibiën.—*Inaug. Diss. Dorpat*.—1891.
- 68 — *Maurer*.—Die epidermis und ihre abkömmlinge.—Leipzig, 1895.
- 69 — *Ancel*.—Etude du développement des glandes de la peau des Batraciens et en particulier de la salamandre terrestre.—*Archiv. de Biol. de Van-Ben. et Bambeke*.—XVIII, 1901.
- 70 — *Vital Brazil e J. Vellard*.—Contribuição ao estudo do veneno dos Batrachios do genero *Bufo*. Nota previa publicada no *Brazil Medico* 26 de Setembro de 1925.
- 71 — *Jayme R. Pereira*.—Sobre a acção physiologica do veneno de Sapo.—*Jornal dos Clinicos*, n.º 8—Rio de Janeiro, 1926.



Ceralophrys dorsala, Wied

Nome vulgar: Intanha ou Sapo de chifre

$\frac{4}{5}$ do tamanho natural

RUD. FISCHER, ad nat.



Pyxicephalus cultripes Rhdt. et Ltk. ♂
Tamanho natural



Bufo marinus L. ♂
(= *B. aqua* Seba)
Tamanho natural



Bufo marinus L. ♀
(= *B. agua* Seba)
Tamanho natural



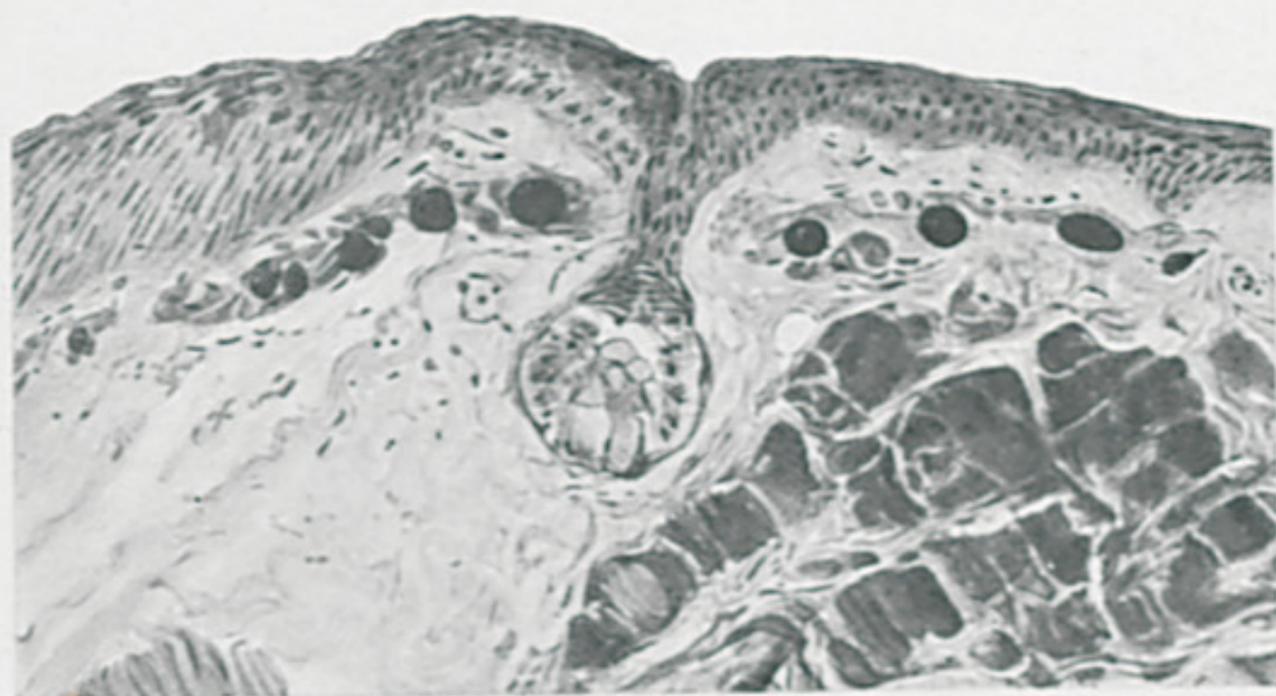
Bufo paracnemis Lutz ♂
Tamanho natural



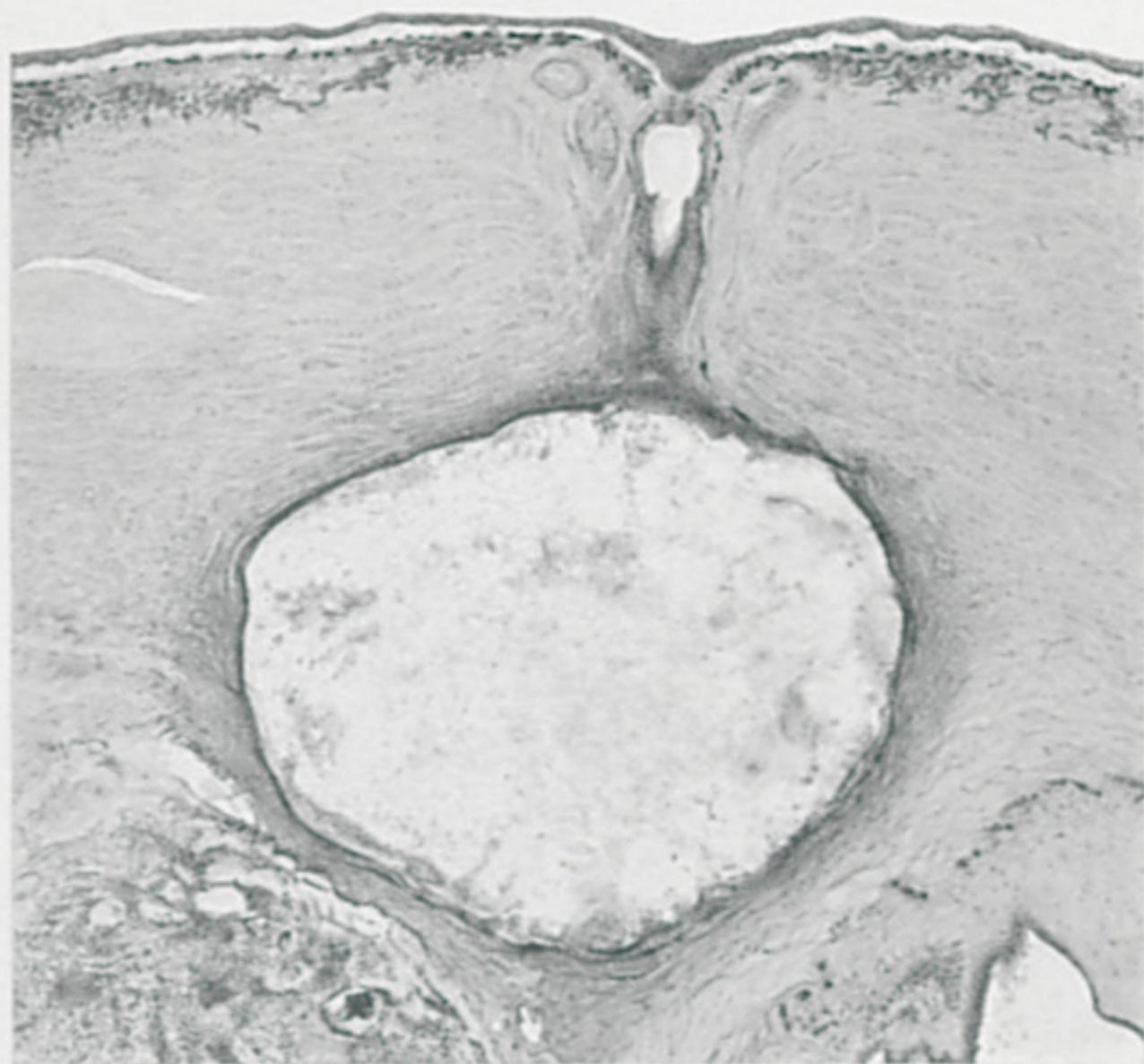
Bufo paracnemis Lutz ♀
 $\frac{3}{4}$ do tamanho natural



Bufo crucifer Wied
Tamanho natural



Glandula mucosa de Bufo marinus
Glande à mucus de Bufo marinus
augm. 200 ×



Glandula de veneno de Bufo marinus
Glande de venin de Bufo marinus
augm. 40 ×



Leptodaectylus pentadaectylus Laur. ♂
 $\frac{2}{3}$ do tamanho natural