

DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DA HIALURONÍDASE DOS VENENOS OFÍDICOS

K. SLOTTA & A. BALLESTER

(*Depto. Científico da Ind. Farm. Endochimica S/A, São Paulo,
com a colaboração do Instituto Butantan*).

Quase que simultaneamente com o esclarecimento da estrutura do ácido hialurônico, como sendo substância altamente polimerizada de quantidades iguais de N-acetilglucosamina e de ácido glucurônico (1), foi também descoberto o enzimo, que desdobra o ácido hialurônico, isto é, a hialuronídase (2). Quanto a ser a hialuronídase um enzimo ou um grupo de enzimos ou ser diferente conforme a sua origem, aqui não tem importância e não será discutido. Todavia, foi provado que o enzimo descoberto já anteriormente em diferentes venenos ofídicos, chamado de "spreading factor" (3), é idêntico à hialuronídase ou pelo menos bastante semelhante a ela (4).

A hialuronídase é geralmente determinada viscosimétrica (5) ou turbimetricamente (6), porém ambos os métodos não são plenamente satisfatórios, por diversos motivos. Por isso pareceu conveniente experimentar se não seria possível usar um método químico-analítico. Para tanto era necessário utilizar um processo de determinação da quantidade mínima do açúcar redutor, formada pelo desdobramento enzimico do ácido hialurônico. Tal método, que permite determinar seguramente 1 a 15 microgramas de glicose, foi publicado em 1949 (7). Este método consiste em deixar o enzimo agir durante um determinado tempo, sob condições idênticas, sobre o ácido hialurônico. Depois, deixa-se reagir o açúcar formado, sobre ferricianeto de potássio em solução alcalina. O ferrocianeto de potássio resultante forma, com ferro trivalente, em solução ligeiramente ácida, ferrocianeto férrico (azul da Prússia). A fim de conservá-lo em solução coloidal, junta-se o detergente Duponol e determina-se colorimetricamente a quantidade do corante.

Conforme foi demonstrado, este método químico dá valores bem concordantes com os obtidos pelo método turbimétrico. Uma unidade turbimétrica de hialuronídase de origem testicular, agindo sobre 200 microgramas de ácido hialurônico

puro em 1 cm³ de tampão acetato de pH 6,0, durante 30 minutos a 37°C, libera uma quantidade de substância redutora equivalente a 1,6 microgramas de glicose (8). Existe assim a possibilidade de exprimir os valores achados com o método colorimétrico, também em unidades tubimétricas.

Antes de usarmos o método químico para a determinação de hialuronídase em venenos ofídicos, fizemos algumas observações de interesse geral. Desde que a preparação de ácido hialurônico puríssimo é difícil e demorada (9), preparamos, conforme consta de indicação mais recente (10), de cordão umbilical, por tratamento com ácido tricloroacético, um ácido hialurônico que, após precipitação repetida com álcool, era biureto-negativo e nos pareceu bastante puro.

Todavia, quando experimentamos a reação descrita, usando este ácido hialurônico, as soluções apresentavam-se turvas, dificultando ou impedindo a fotometria. Além disso, observamos que o estado coloidal do azul da Prússia, às vezes, apesar do acréscimo de Duponol, permaneceu estável somente por um tempo relativamente curto. Ambas as dificuldades são facilmente eliminadas ao deixarmos formar-se o azul da Prússia em um meio um pouco mais ácido, isto é, pH 1,0 a 1,5. A sensibilidade do método por nós usado é talvez um pouco menor mas plenamente satisfatória. Evita-se, desta forma, o acréscimo de Duponol, podendo-se usar o ácido hialurônico de rápido e fácil preparo.

TÉCNICA USADA

Reagentes.

- 1) Solução de ferricianeto de potássio: — 0,5 g de ferricianeto de potássio p. a. em 1 litro de água destilada (guardar em garrafa ambar).
- 2) Solução de cianeto-carbonato: — 5,3 g de carbonato de sódio anidro + 0,65 g de cianeto de potássio por litro.
- 3) Solução de ferro trivalente: — 1,5 g de sulfato férrico amoniacal em 1 litro de ácido sulfúrico 0,2 N.
- 4) Solução de ácido hialurônico: — 200 microgramas de ácido hialurônico (10) em 0,5cc de solução tampão pH 6,0 — 0,02 M.
- 5) Solução tampão de pH 6,0: — acetato de sódio e ácido acético 0,02 M.
- 6) Solução padrão de glicose: — solução de glicose contendo 10 microgramas por cc.

Todas as séries de determinações foram feitas em espectrofotômetro de Coleman modelo 14 com largura constante da faixa de 35 m μ .

Inicialmente foi determinada a absorção da luz de uma solução coloidal de azul da Prússia. Achámos o máximo num comprimento de onda de 675 m μ

com interposição de filtro PC-5. Usamos tubos de 19 x 105 mm em todas as determinações (Veja gráfico 1).

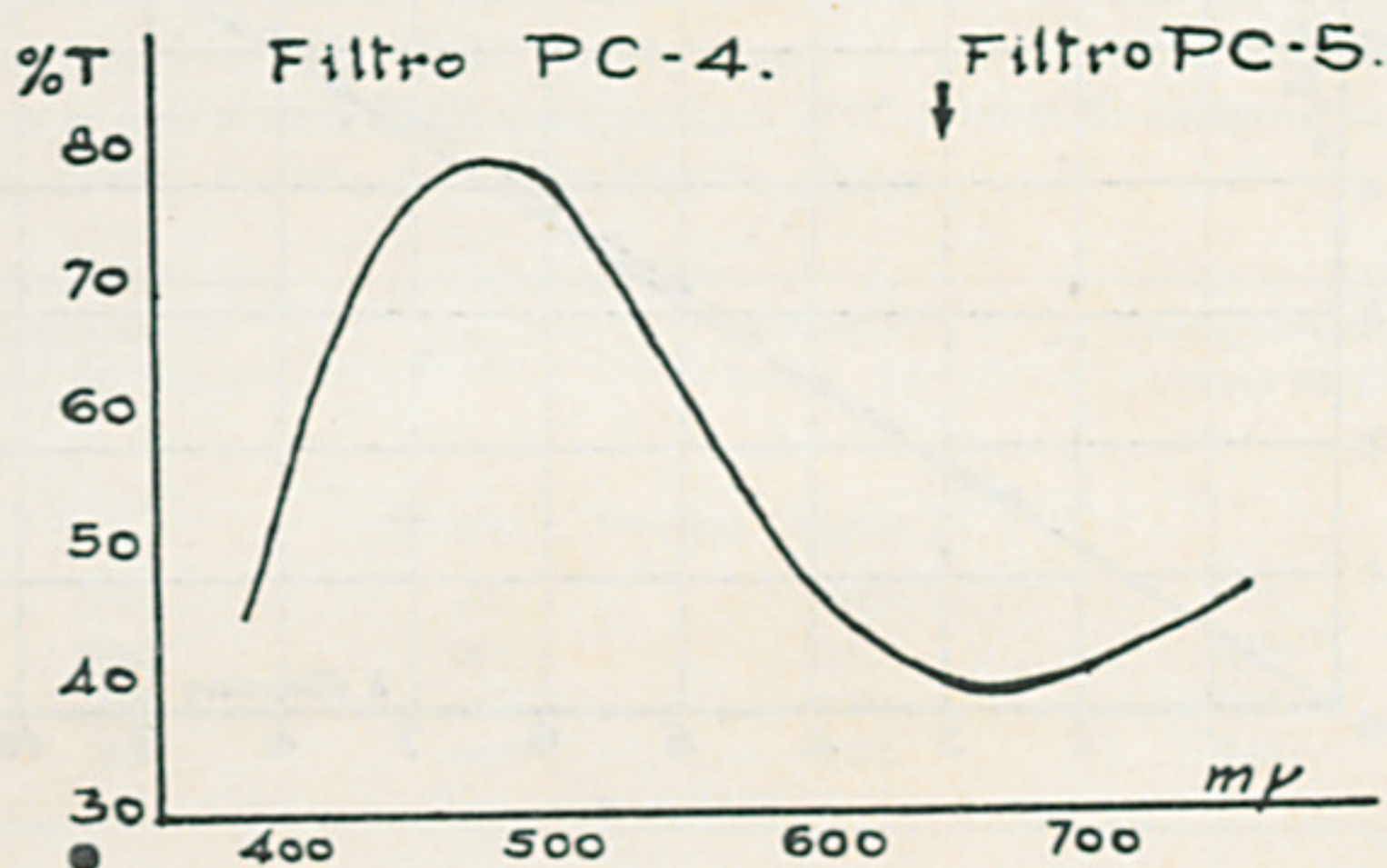


Gráfico 1

Determinação da reta padrão de glicose. Foram colocadas, numa série de tubos, diversas quantidades de solução padrão de glicose e completou-se o volume em todos os tubos para 3 cc com tampão acetado + ácido acético de pH 6,0. Em seguida adicionou-se 1 cc da solução 1) e 1 cc da solução 2) em cada tubo e se colocaram em banho-maria fervente durante 15 minutos. Depois de transcorrido este tempo, esfriaram-se os tubos e adicionaram-se-lhes 5 cc da solução de sulfato férrico amoniacal (reagente n.º 3) em intervalos de 30 segundos (intervalos em que deve ser feita cada leitura, a fim de evitar correções de tempo), sendo medida a cor desenvolvida ao adicionar este último reagente no espectrofotômetro dentro de 5 a 15 minutos. É feita uma prova em branco, contendo todos os reagentes mencionados com exceção da solução de glicose (gráfico 2).

A reta padrão de glicose + ácido hialurônico foi obtida com 0,5 cc da solução 4) (200 microgramas de ácido hialurônico) + quantidade correspondente de solução de glicose e completando o volume para 3 cc com tampão, seguindo-se então o processo já indicado. A prova em branco continha unicamente 0,5 cc da solução 4). Conforme se vê, as retas obtidas com e sem acréscimo de ácido hialurônico são quase idênticas e a proporção da concentração em gamas de glicose (c) para a extinção ($E = -\log. T$) é $K = 15,5$ nas experiências sem ácido hialurônico e $K = 15,9$ nas experiências com ácido hialurônico.

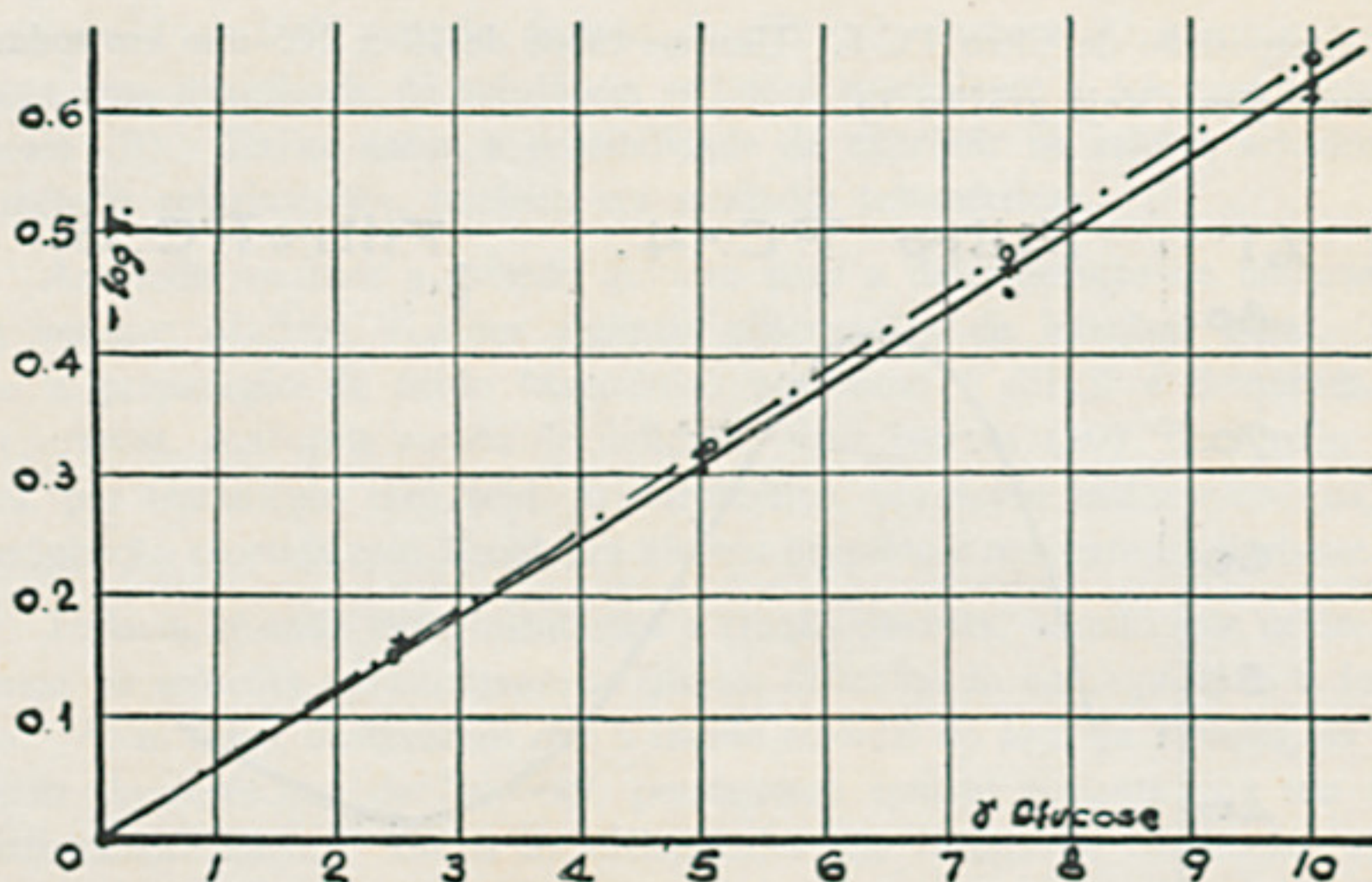


Gráfico 2

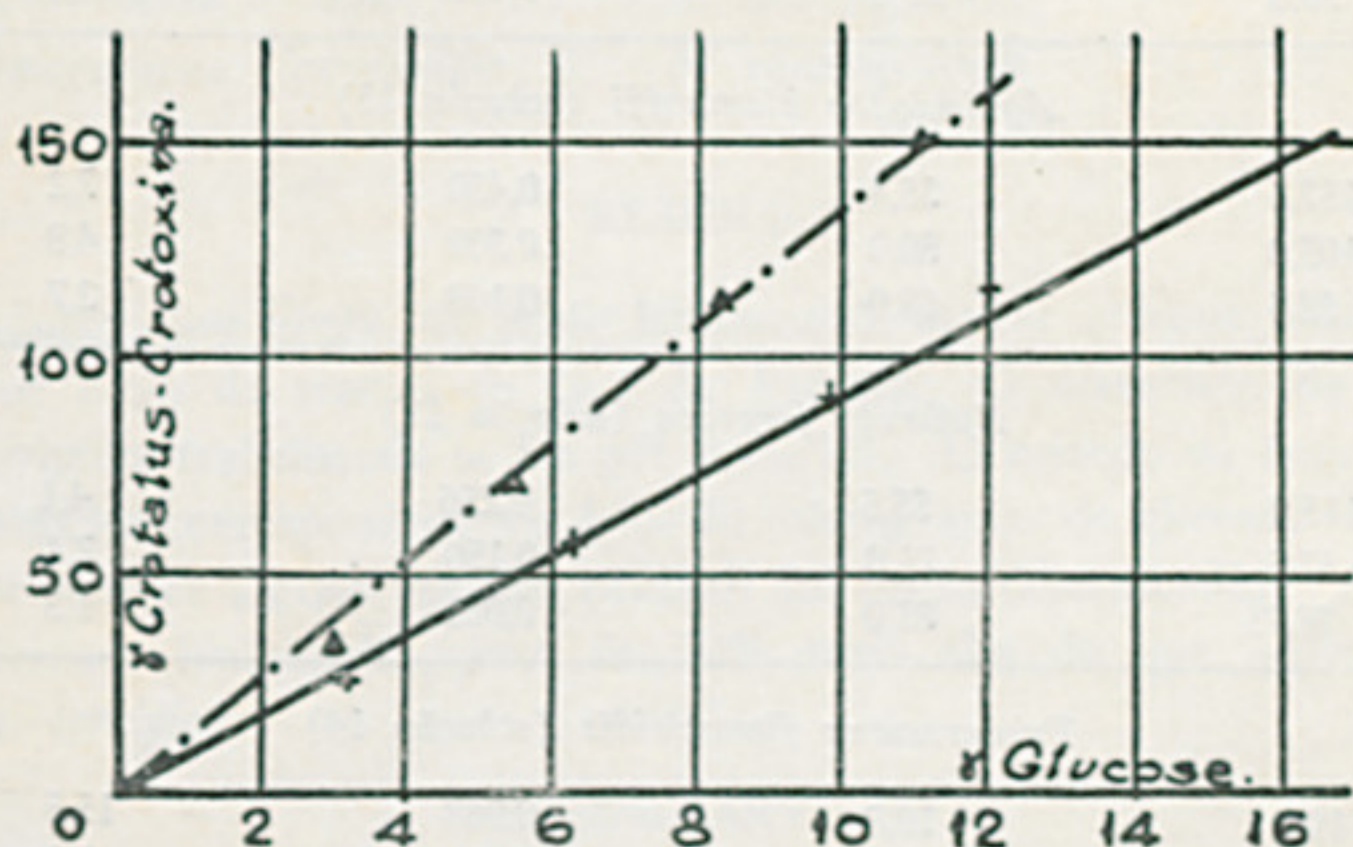
Conforme as experiências exatas de outros autores (8), 1,6 microgramas de glicose correspondem a 1 unidade turbimétrica. Além disso, foi relatado que 1 unidade viscosimétrica corresponde a 2 unidades turbimétricas (6). Pode-se então dizer que, no nosso método, 1 micrograma de glicose equivale a 0,625 unidades turbimétricas e a cerca de 0,3 unidades viscosimétricas. Quando não se trata de determinações do ácido hialurônico em soluções que contêm outras substâncias redutoras, o método colorimétrico é preferível a todos os outros e os valores obtidos são fáceis de serem convertidos em outras unidades. Usamos o método descrito, devido à sua simplicidade e exatidão, para a determinação da hialuronidase de diversos venenos ofídicos, onde principalmente interessava saber se a Crotoxina (11) contém menos ou mais atividade de hialuronidase do que o veneno cru de *Crotalus terrificus terrificus*. Foram preparadas soluções com as seguintes quantidades dos diversos venenos secos em cada 25 cc de solução de NaCl a 0,85%:

- 7) 19 mg de *Crotalus t. terrificus* (= Cascavel) (liofilizado).
- 8) 5,6 mg de *Crotalus t. terrificus* (liofilizado)
- 9) 15 mg de Crotoxina cristalizada (preparada do veneno usado sob n.º 7).
- 10) 5,1 mg de Crotoxina (preparada do veneno usado sob n.º 8)
- 11) 14,3 mg de *Bothrops jararaca* (= Jararaca)
- 12) 7,3 mg de *Naja naja* (= Cobra)
- 13) 6,4 mg de *Agkistrodon blomhoffi* (= Mamushi)
- 14) 6,1 mg de *Trimeresurus flavoviridis* (= Habu).

Em um tubo foi colocado somente 0,5 cc da solução de ácido hialurônico (solução 4) como prova em branco; nos outros colocaram-se, além disso, 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20 cc da solução de veneno de *Crotalus t. terrificus* (solução 7) e da Crotoxina (solução 9), respectivamente. Em todos os tubos foi completado o volume para 3 cc com solução tampão acetato de pH 6,0 0,2 M (solução 5), colocando-se toda a série de tubos na estufa a 37°C durante 30 minutos, seguindo depois a técnica descrita para o padrão de glicose.

Microgramas de veneno em 3 cm ³	% T	Extinção (-log. T)	Corresponde a microgramas de glicose
<i>Crotalus t. terrificus</i> (solução 7)			
152,0	20,2	0,695	11,10
114,0	30,0	0,523	8,35
76,0	44,2	0,354	5,65
38,0	64,9	0,188	3,10
Crotoxina (solução 9)			
120,0	17,9	0,750	12,00
90,0	24,1	0,618	9,90
60,0	39,8	0,400	6,40
30,0	62,5	0,205	3,30

Dêstes dados obtem-se o seguinte gráfico:



Podemos, pois, afirmar que, com a separação, precipitação e cristalização, a Crotoxina não somente não perde a atividade de hialuronidase quanto ao veneno

crú, mas esta se acha enriquecida em 50%. É interessante fazer notar que a toxicidade e a ação hemolítica da Crotoxina acha-se também enriquecida em cerca de 50% quanto ao veneno crú (11).

Da repetição destas experiências com soluções novamente preparadas de outra partida de veneno crotálico e de Crotoxina, obtivemos resultados praticamente iguais. Usámos o método também para determinação da hialuronidase de alguns outros venenos ofídicos:

Microgramas de veneno em 3 cm ³	% T	Extinção (-log. T)	Corresponde a microgramas de glicose
<i>Crotalus t. terrificus</i> (solução 8)			
150,0	19,9	0,700	11,2
112,5	29,8	0,526	8,42
75,0	44,0	0,356	5,70
37,0	64,1	0,195	3,12
Crotoxina (solução 10)			
120,0	17,3	0,762	12,2
90,0	23,7	0,625	10,0
60,0	39,8	0,400	6,4
30,0	62,2	0,205	3,3
<i>Naja naja</i> (solução 12)			
120,0	27,4	0,562	9,0
90,0	38,2	0,418	6,7
60,0	54,0	0,268	4,3
30,0	75,0	0,125	2,0
<i>Agkistrodon blomhoffi</i> (solução 13)			
157,5	35,4	0,450	7,2
105,0	50,0	0,300	4,8
52,5	68,0	0,168	2,7
<i>Bothrops jararaca</i> (solução 11)			
115,0	55,5	0,256	4,1
57,5	71,0	0,150	2,4
28,75	83,0	0,081	1,3
<i>Trimeresurus flavoviridis</i> (solução 14)			
192	10,8	0,968	15,5
128	35,5	0,450	7,2
64	57,0	0,243	3,9

Dêstes dados obtivemos o seguinte gráfico:

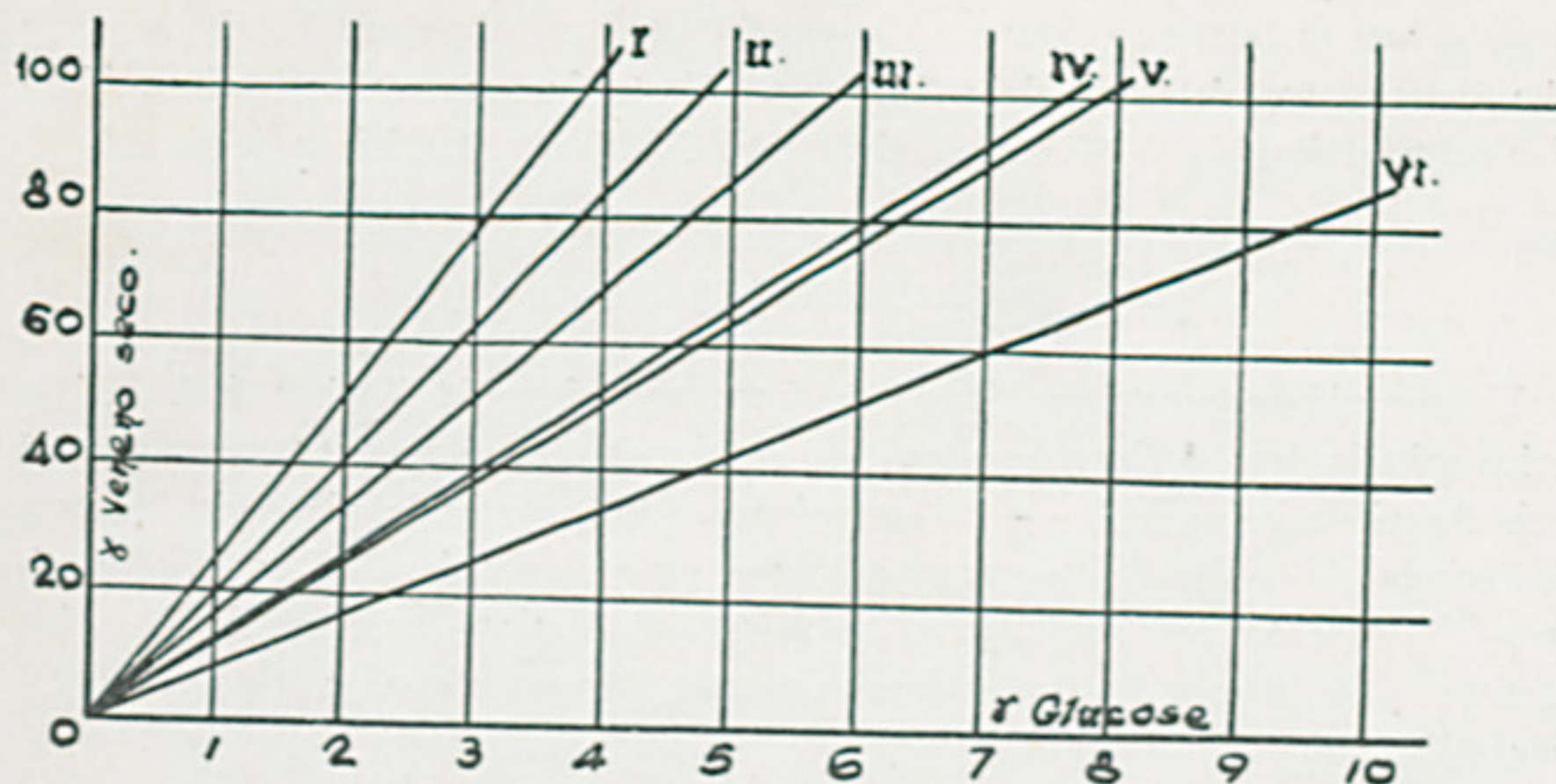


GRÁFICO 4

Destas retas deduzimos o teor de hialuronídase como sendo aquela quantidade de glicose liberada por 1 mg de veneno. Assim, 1 mg dos venenos usados nestas experiências libera, sob as condições descritas, as seguintes quantidades de glicose do ácido hialurônico:

<i>Crotalus t. terrificus</i>	74 microgramas;	77 microgramas.
<i>Crotoxina</i>	110 microgramas;	116 microgramas.
<i>Naja naja</i>	75 microgramas.	
<i>Bothrops jararaca</i>	38 microgramas.	
<i>Agkistrodon blomhoffi</i> ...	47 microgramas.	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i> ..	57 microgramas.	

RESUMO

A hialuronídase libera, de ácido hialurônico, açúcar redutor. Êste é determinado por meio da reação de azul da Prússia. O acréscimo de detergente pode ser evitado, trabalhando-se em pH 1 — 1,5. O método dá bons resultados com quantidades correspondentes a 1 — 10 microgramas de glicose. O conteúdo de hialuronídase de alguns venenos ofídicos foi assim determinado. A crotoxina possui atividade hialurônica cerca de 50% mais alta do que veneno sêco de *Crotalus t. terrificus*.

SUMMARY

Hyaluronidase liberates from hyaluronic acid reducing sugars, determined by means of the Prussian blue reaction. Addition of detergents is avoided by

working at a pH of 1 — 1,5. The method gives good results with amounts corresponding to 1-10 micrograms of glucose. The hyaluronidase content of some snake venoms was determined in this way. Crotoxin possesses a hyaluronidase activity approximately 50% higher than dry *Crotalus t. terrificus* venom.

ZUSAMMENFASSUNG

Hyaluronidase setzt aus Hyaluronsäure reduzierende Zucker frei. Diese werden mittels der Berlinerblau-Reaktion bestimmt. Zusatz von Detergent wird durch Arbeiten bei pH 1 — 1,5 vermieden. Die Methode gibt mit Mengen entsprechend 1 — 10 Mikrogramm Glukose gute Ergebnisse. Der Hyaluronidase — Gehalt einiger Schlangengifte wurde so bestimmt. Crotoxin hat eine ungefähr 50% höhere Hyaluronidase-Aktivität als getrocknetes *Crotalus t. terrificus* Gift.

Agradecemos à Diretoria do Instituto Butantan pelo fornecimento do veneno crotálico, ao Prof. Th. Wieland (Frankfurt) pelo veneno de "Cobra" (*Naja naja*) e ao Dr. K. Nakamura (Tokyo) pelo veneno de "Habu" (*T. flavoviridis*) e "Mamushi" (*A. blomhoffi*).

BIBLIOGRAFIA

1. Meyer, K., & J. W. Palmer — J. Biol. Chem. 114, 689, 1936.
2. Meyer, K., R. Dubos & E. M. Smyth — J. Biol. Chem. 118, 71, 1937.
3. Duran-Reynals, F. — Exp. Med. 50, 327, 1929.
4. Chain, E. & E. S. Duthie — Brit. J. Exp. Pathol. 21, 324, 1940.
5. Madinavetia, J. & T. H. H. Quibell — Biochem. J. 34, 625, 1940.
6. Kass, E. H. & C. V. Seastone — J. Exp. Med. 79, 319, 1948.
7. Park, J. T. & M. J. Johnson — J. Biol. Chem. 181, 149, 1949.
8. Rapport, M. M., K. Meyer & A. Linker — J. Biol. Chem. 186, 615, 1950.
9. K. Meyer & M. M. Rapport — Advances in Enzymology 13, 200, 1952.
10. Janczik, W. E. & E. Kaiser — Nature 169, 114, 1952.
11. Slotta, K. & H. L. Fraenkel-Conrat — Mem. Inst. Butantan 12, 505, 1938.





★ Impresso na ★
EMPRESA GRÁFICA DA
"REVISTA DOS TRIBUNAIS" LTDA
★ São Paulo ★