

ESTUDOS PHYSICO-CHIMICOS

SOBRE PROTEINAS EM PRESENÇA DE ALCOOL

I. Sobre a coagulação pelo calor das soro-proteinas em presença de alcool ethylico

POR

D. VON KLOBUSITZKY

A coagulação pelo calor das soro-proteinas em presença de alcool constitue objecto de relativamente poucos trabalhos e estes tratam quasi que exclusivamente da proteina de Bence-Jones. Ha pouquissimas communicações sobre experiencias feitas com soro ou com albuminas typicas (seralbumina ou ovalbumina). Na literatura que nos era accessivel só encontrámos indicações, quer sobre a relação reciproca entre a acção do alcool e do sal, quer sobre o comportamento de proteinas que, com solutos tampão (em quasi todos os casos foram usados solutos tampão de acetato), davam uma reacção mais ou menos acida. Além disso, a maioria dos auctores experimentava apenas com solutos albuminosos muito diluidos. Não existem dados quanto ao comportamento do soro total e de suas fracções albuminosas na reacção normal do sangue, com um teor de sal correspondente ás condições physiologicas.

Sobre preencherem uma lacuna em nossos conhecimentos sobre as soro-proteinas taes pesquisas são necessarias e uteis do ponto de vista puramente theorico. Com o uso do alcool como factor auxiliar da coagulação pelo calor, os phenomenos colloido-electricos, que tornam as circumstancias mais complicadas, passam para um plano secundario, de maneira que as alterações de dispersão e estabilidade se processam em condições as mais simples possiveis, o que facilita sensivelmente a verificação geral das condições de deshydratação.

Correspondendo a esse fim, esta parte do nosso trabalho relata as experiencias feitas com soro, fibrinoglobulina, euglobulina, pseudoglobulina e seralbumina de concentrações diversas, nas quaes se conservavam constantes o pH

e as concentrações de sal dos solutos albuminosos, variando apenas as quantidades de alcool.

Methodo

Com soro desfibrinado de cavallo eram preparadas, por precipitações fraccionadas com soluto de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado, fibrinoglobulina (saturação de 30 %), euglobulina (saturação de 36 %), pseudoglobulina e seralbumina. As diferentes fracções eram previamente dialysadas, em saccos de pergaminho, com agua corrente de torneira e, depois de ter sido sufficientemente diminuida a sua conductividade, electro-dialysadas, no electro-dialysador de Pauli, entre duas membranas de pergaminho, ou em um electro-ultrafiltro (1) por nós construido, até obtenção de solutos perfectamente livres de electrolytos, ou precipitados. Os precipitados de fibrinoglobulina e euglobulina assim obtidos eram dissolvidos em quantidades minimas de NaCl physiologico. A pseudoglobulina e a seralbumina adicionava-se NaCl deshydratado até a concentração final de 0,9%. A reacção de todos os solutos era, por meio de um soluto a 2 % de Na_2CO_3 , ajustada mais ou menos em pH 7,4 (*). O pH dos solutos promptos para uso era determinado electrometricamente.

Com excepção da fibrinoglobulina, da qual não conseguimos preparar um soluto sufficientemente concentrado (não achámos conveniente, em virtude das eventuaes alterações do grau de dispersão, proceder á concentração por meio de ultrafiltrações), preparámos solutos padrão a 30,00 % de todas as outras proteínas. A concentração desses solutos padrão era determinada pelo methodo micro-Kjeldahl. Para a diluição dos solutos padrão usámos sempre NaCl a 0,9 %, cuja reacção com o mencionado soluto de Na_2CO_3 estava igualmente ajustada ao pH 7,4. O soro obtido do sangue desfibrinado de cavallo era, sem tratamento nenhum, diluido com soluto physiologico de NaCl até a concentração total de proteina 3,00 %. Usámos o alcool ethylico, "pro analyse" de Merck, deshydratado por nós.

As experiencias foram executadas da seguinte maneira: de cada soluto de proteina preparavam-se series, contendo uma proveta 5 cc. desse soluto e quantidades variaveis de alcool, mas de sorte que o volume total da mistura proteina-alcool fosse igual em todos os tubos da serie. Isto se obtinha adicionando ao primeiro tubo de cada serie 3 cc. de soluto de NaCl physiologico, enquanto nos demais este soluto era juntado gradativamente com o alcool. Sendo elevada de 0,5 cc. a quantidade de alcool em cada tubo seguinte da serie, quantidade esta que corresponde a uma concentração de 6 %, a concentração de alcool pode ser augmentada até 36 %. Conclue-se dahi que as concentrações

(*) Em experiencias previas verificámos que a baixa do pH em consequencia da fervura é insignificante, pois representa menos de 0,1 unidade.

de proteína effectivas na fibrinoglobulina eram: 0,93, 0,465 e 0,233 %, enquanto nas demais fracções albuminosas e no soro correspondiam aos valores: 1,86, 0,93 e 0,465 %

A determinação da coagulação era feita em banho-maria, agitando-se constantemente. O conteúdo das provetas era, durante toda a determinação, remexido com o termometro, o qual, afim de evitar o mais possivel uma evaporação do alcool e da agua, estava fixado, guardando, porém, liberdade de movimento, em uma rolha de cortiça. Mantinha-se, naturalmente, uma iluminação uniforme dos tubos.

A verificação das alterações ocasionadas pelo aquecimento era feita pela observação das seguintes circunstancias: opalescencia (Op.), turvação nitida (T. n.), flocos finos, com aspecto de fios (Fl. f.) e flocos grossos, granulados (Fl. gr.).

Parte experimental

Os resultados estão representados nas tabellas seguintes. A segunda columna contém as concentrações percentuaes de alcool e as demais assignalam as temperaturas, nas quaes houve as alterações que constam da primeira linha.

TABELLA I

Fibrinoglobulina

Concentração da proteína: 0,93 %

pH 7,38

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	62	66	68	72
2	6	59	63,5	65	67
3	12	52,5	57	59	60
4	18	48	53,5	55	55
5	24	*	42	46	49

Nota: * Já opalesce em temperatura ambiente (15°).

TABELLA II

Fibrinoglobulina

Concentração da proteína: 0,465 %

pH 7,42

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	57	62	62	75
2	6	53	59	56	68
3	12	47	57	53	63
4	18	*	38	42	56

Nota: * Já opalesce em temperatura ambiente (15°).

TABELLA III

Fibrinoglobulina

Concentração da proteína: 0,233 %

pH 7,41

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	55	64	57	70
2	6	55	64	57	70
3	12	46	60	53	65
4	18	38	45	45	55
5	24	*	*	36	49

Nota: * Opalesce e mostra turvação em temperatura ambiente (15°).

TABELLA IV

Euglobulina

Concentração da proteína: 1,85 %

pH 7,50

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	72	76	76	80
2	6	65	70	67	74
3	12	58	65	63	67
4	18	49	58	55	60
5	24	43	48	45	53
6	30	*			

Notas * Opalesce e apresenta forte turvação em temperatura ambiente (15°).

TABELLA V

Euglobulina

Concentração da proteína: 0,93 %

pH 7,48

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	66	75	72	80
2	6	60	68	68	72
3	12	55	60	60	63
4	18	45	50	45	55
5	24	40	45	40	46
6	30	*			

Nota: * Opalesce e apresenta forte turvação em temperatura ambiente (16°).

TABELLA VI

Euglobulina

Concentração da proteína: 0,465 %

pH 7,50

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	61	77	64	82
2	6	60	73	64	78
3	12	51	65	54	71
4	18	41	56	45	60
5	24	28	50	30	54
6	30	*	47	31	52

Nota: * Opalesce em temperatura ambiente (16°).

TABELLA VII

Pseudoglobulina

Concentração da proteína: 1,86 %

pH 7,54

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	72	78	80	94
2	6	65	71	76 *	86
3	12	57	65	*	77 **
4	18	48	56	58 *	60
5	24	43	50	*	52
6	30 †	34	43	*	45 ††

Notas: * Não é possível uma observação minuciosa por causa das muitas bolhas de ar. ** A 72° torna-se uma massa muito viscosa, gelatinosa, que contém muitas bolhas de ar. † Ficou parada 20 minutos, conservando-se clara. †† Sóluto muito grosso.

TABELLA VIII

Pseudoglobulina

Concentração da proteína: 0,93 %

pH 7,46

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	65	78	65	*
2	6	62	74	65	**
3	12	59	68	59	†
4	18	47	58	48	††
5	24	38	52	† *	59
6	30	35	42	42	48 † **
7	36	†† *			

Notas: Nos Nos. 1 a 4 não ha formação de flocos grossos. O alcool influe sobre os solutos no sentido de tornal-os oleosos com o aquecimento. * A 88° apparecem alguns

flocos, porém o soluto, mesmo durante a fervura, permanece líquido e leitoso, sem que aumente o número dos flocos. ** A 84° podem-se observar alguns flocos mais grossos. † A 85° observam-se alguns flocos mais grossos. †† Turvo a 65°, clarifica-se com a fervura, mas, depois de resfriado, volta a turvação. †* A 56° turvo, clarifica-se quando aquecido até fervura; após resfriamento turva-se novamente. †** Turva-se a 46°, á fervura e ao resfriamento comporta-se como o N° 5. ††* Já se turva em temperatura ambiente (19°).

TABELLA IX

Pseudoglobulina

Concentração da proteína: 0,465 %

pH 7,45

	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	65	76	65	*
2	6	62	69	62	**
3	12	58	66	58	†
4	18	52	57	52	††
5	24	47	53	†*	58 † **
6	30	††*	42	40	50

Notas: * Não se formam flocos grossos, nem á fervura. Fervido a fogo livre, pode-se observar abundante floculação. ** Mesmo aquecido até fervura não ha floculação. † Comporta-se como o No. 7. †† A 80° apresenta maxima turvação, com a fervura clarifica-se consideravelmente. Após resfriamento a turvação aumenta novamente. †* A observação é impossibilitada pelas muitas bolhas de ar. †** Turva-se a 57°, clarifica-se á fervura, após resfriamento aparece novamente a turvação. ††** Já se turva em temperatura ambiente (19°).

TABELLA X

Seralbumina

Concentração da proteína: 1,86 %

pH 7,40

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	76	79	*	90 **
2	6	73	76	*	86 †
3	12	67	72	*	80 ††
4	18	62	67	*	75 †*
5	24	55	60	*	68 †**
6	30	45	53	*	59 ††*
7	36	36	43	*	49 ††**

Notas: * Ausencia completa de flocos finos. ** A 86° torna-se turvo e gelatinoso. Aquecido até fervura não se altera. Fervido ao fogo livre observam-se tambem flocos finos. † A 81: turvo e gelatinoso: a diferença, mencionada em No. 1, entre o aquecimento em banho-maria e a fogo livre, existe neste como em todos os tubos da serie. †† A 76° tor-

na-se turvo e gelatinoso. † * A 69° turvo e gelatinoso. † ** A 62° turvo e gelatinoso.
 †† * A 48° turvo e gelatinoso. †† ** A 48° turvo e gelatinoso.

TABELLA XI

Seralbumina

Concentração da proteína: 0,93 %

pH 7,35

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	77	84	*	—
2	6	74	78	**	—
3	12	69	75	†	—
4	18	64	70	††	—
5	24	57	61	††	—
6	30	49	55	58	62
7	36	39 † *	46	50	55

Notas: Durante o aquecimento aumenta visivelmente a viscosidade dos solutos 2-7. Nos 1-5: não se formam flocos grossos, nem á fervura. Fervido ao fogo livre, podem-se observar flocos grossos. * Flocos finos isolados a 90°. ** Flocos finos isolados a 85°. † Flocos finos isolados a 80°. †† Não ha formação de flocos finos. † * Conserva-se claro mesmo após 20 minutos de permanencia em temperatura ambiente (21°).

TABELLA XII

Seralbumina

Concentração da proteína: 0,465 %.

pH 7,38

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	77	84	87	—
2	6	72	80	86	—
3	12	67	73	78	—
4	18	62	68	*	—
5	24	59	64	**	—
6	30	50	56	†	—
7	36	39 † *	46	††	—

Notas: Não se formam flocos grossos, nem com aquecimento ao fogo livre. * Flocos finos isolados a 69°. ** Flocos finos isolados a 65°. † Flocos finos isolados a 60°. †† Flocos finos isolados a 49°. † * Conserva-se claro mesmo após permanencia por 15 minutos em temperatura ambiente (18°).

TABELLA XIII

Soro de cavallo

Concentração total da proteína: 1,86 %

pH 7,43

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	71	76	81	—
2	6	67	72	78 ?	—
3	12	60	66	82 ?	—
4	18	54	59	*	—
5	24	**	47	†	60
6	30	††	††	† *	52

Notas: Nos. 1-4: não se formam flocos grossos, nem mesmo fervido a fogo livre. A observação dos flocos finos é muito difficil nos Nos. 2 e 3, por causa das bolhas de ar, e dahi incerteza dos numeros indicados. * A 78° torna-se denso e as bolhas de ar impossibilitam a observação dos flocos finos. ** Opalesce já em temperatura ambiente (24°). † Observação de flocos finos impossibilitada pelas bolhas de ar. Gelatinoso a 55°. †† Turva-se em temperatura ambiente. † * Gelatinoso a 48°.

TABELLA XIV

Soro de cavallo

Concentração total da proteína: 0,93 %

pH 7,41

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	74	78	84	—
2	6	69	73	78	—
3	12	62	67	73	—
4	18	51	57	71	—
5	24	*	45	**	—

Notas: Em nenhum tubo da serie formaram-se flocos grossos, nem com fervura a fogo livre. * Turva-se em temperatura ambiente (23°). ** Por causa das bolhas de ar não se podem observar os flocos finos.

TABELLA XV

Soro de cavallo

Concentração total de proteína: 0,465 %

pH 7,36

No.	C ₂ H ₅ OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	74	78	70	—
2	6	62	70	62	—
3	12	58	68	*	—
4	18	43	55	**	—
5	24		†	—	—

Notas: Não se formaram flocos grossos em nenhum tubo da serie, nem quando fervidos a fogo livre. * Não ha flocos finos. ** Observação impossibilitada pelas bolhas de ar. † Opalesce já em temperatura ambiente (23°).

Antes de passarmos á discussão dos resultados, desejamos mencionar que também fizemos algumas experiências com fracções de pseudoglobulina. Nessas experiências a pseudoglobulina era novamente precipitada com um soluto de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado a 43 %, sendo considerado o precipitado como pseudoglobulina I e o filtrado como pseudoglobulina II. A dialyse e o preparo dos solutos promptos para uso eram feitos conforme está indicado na parte do methodo. Os resultados obtidos com esses solutos divergiam daquelles alcançados com os solutos de pseudoglobulina total apenas dentro do limite dos erros de observação, de maneira que nos restringimos á apresentação de uma tabella de cada um.

TABELLA XVI

Pseudoglobulina I

Concentração da proteína: 0,39 %					pH 7,31	
No.	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.	
1	0	63	79	68	—	
2	6	62	70	62	—	
5	12	56	66	58	—	
4	18	52	57	52	*	
5	24	47	53	**	58	
6	30	†	42	40	50	

Notas: Nos tubos 1-4 da serie não se formaram flocos grossos. Os mesmos, fervidos a fogo livre, contêm muitos flocos grossos. O conteúdo dos tubos aquecidos em banho-maria conserva-se perfeitamente homogêneo mesmo após uma parada por tempo mais ou menos longo; nos tubos aquecidos a fogo livre, porém, separam-se precipitados volumosos. Uma parte da mistura aquecida em banho-maria até 90° foi fervida a fogo livre, mas também não se observaram flocos grossos. * O máximo de turvação é atingido a 80°; á fervura o soluto clarifica-se consideravelmente; resfriado, a turvação apparece novamente. ** A observação é impossibilitada pelas bolhas de ar. † Opalesce em temperatura ambiente (23°).

TABELLA XVII

Pseudoglobulina II

Concentração da proteína: 0,39 %					pH 7,46	
No.	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.	
1	0	62	78	70	—	
2	6	62	72	62	—	
3	12	54	64	56	—	
4	18	51	59	51	—	
5	24	46	52	46	—	
6	30	35	42	35	—	

Notas: Nenhum dos tubos apresentou flocos grossos. Os Nos. 5 e 6 tornaram-se muito mais claros com a fervura; resfriados voltaram á turvação.

Conforme se deprehe de das duas tabellas acima, essas fracções, assim como a pseudoglobulina total, clarificam-se numa temperatura mais elevada. Quanto ao resto — a pseudoglobulina II — e de conformidade com seu grau de dispersão mais fino, toma uma posição intermediaria entre a seralbumina e a pseudoglobulina total, por um lado com temperaturas de coagulação correspondentes ás da pseudoglobulina total e da pseudoglobulina I e, por outro lado, permanecendo, como a seralbumina, clara mesmo numa concentração de alcool de 24 % (em temperatura ambiente) e sem apresentar flocos grossos.

Discussão dos resultados

Baseado nas experiencias relatadas, pode-se estabelecer como regra geral que:

1. o alcool abaixa a temperatura de coagulação;
2. a resistencia absoluta das differentes proteínas em relação ao alcool é diversa em cada especie.

A baixa da temperatura de coagulação é tão evidente e inequivoca que este facto, já estabelecido nas experiencias de Spiro (2), Loeb (3), Schorr (4), Teorell (5) e outros, não carece de discussão.

Considerando agora a resistencia absoluta das differentes proteínas, observa-se o seguinte:

A fibrinoglobulina occupa uma posição especial entre as demais fracções, mostrando-se os seus solutos a 0,93 e 0,233 % mais resistentes em relação ao alcool do que o soluto a 0,465 %. O soluto a 0,93 % só apresenta opalescencia numa concentração de alcool de 24 %, ao passo que o soluto a 0,465 % opalesce até com alcool a 18 %. A resistencia do soluto de 0,233 % é, sob este ponto de vista, intermediaria. Não apresenta opalescencia com 18 % de alcool, porém com 24 % já se nota uma consideravel turvação.

Na euglobulina a influencia do alcool parece ser independente da concentração da proteína.

Os solutos mais concentrados da *pseudoglobulina* eram mais resistentes em relação ao alcool do que os diluidos, ficando os solutos de 1,86 e 0,93 % perfeitamente claros mesmo com alcool a 30 %, enquanto opalesce o soluto a 0,465 % com igual quantidade de alcool.

A *seralbumina* comporta-se mais ou menos como a *euglobulina*, isto é, o soluto diluido mostra-se tão resistente quanto o concentrado.

O comportamento do *soro* em geral corresponde á expectativa, mostrando-se muito semelhante a um soluto fortemente diluido de fibrinoglobulina. At-

tribuímos a circumstancia de apresentar o soro comparativamente com a fibrinoglobulina pura maior resistencia absoluta (com alcool a 24 % sempre se observava apenas opalescencia) á acção protectora das demais fracções albuminosas existentes no soro, a seralbumina, em primeiro logar. Esta observação está inteiramente de accordo com o effeito de estabilização das fracções albuminosas finamente dispersas que observámos durante o estudo da acção do sal (6).

Além destas influencias generalizadas do alcool, percebemos tambem acções especificas muito evidentes e dependentes da especie e concentração da proteina.

Estas differenças especificas referem-se á: 1) *floculação*; 2) *viscosidade* e 3) *alteração da capacidade de coagulação pelo calor*.

1) — Enquanto nos solutos de fibrinoglobulina e euglobulina (indifferentemente com ou sem alcool) com a elevação da temperatura, após previa opalescencia e turvação, apparecem flocos finos, em forma de fios e finalmente grossos, granulados, a flocculação na pseudoglobulina, seralbumina e soro depende, de um lado, do teor de alcool e, de outro lado, da concentração da proteina. O soluto de pseudoglobulina a 1,86 % apresenta ainda a mesma escala de coagulação dos solutos de fibrinoglobulina, porém nos solutos a 0,93 e 0,465 % só se formam flocos grossos com uma quantidade grande de alcool (pelo menos 24 %). Esta relação da flocculação com a concentração de albumina e de alcool é ainda mais evidente na seralbumina. A seralbumina a 1,86 % não diverge absolutamente — quanto á formação de flocos grossos — da fibrinoglobulina e da euglobulina, ao passo que no soluto de 0,93 % só apparecem flocos grossos com alcool na concentração de 30 %, e no soluto de 0,465 % não ha essa flocculação nem mesmo com 36 % de alcool.

Este comportamento diverso das fracções de dispersão fina e grossa, relativamente á coagulação pelo calor, indica que as alterações determinadas pelo calor dependem da dispersão das proteínas. Conforme foi primeiramente verificado por Hardy (7) e mais tarde por Pauli e Handovsky (8), essas alterações são determinadas por dois processos completamente independentes um do outro, isto é, a desnaturação e a flocculação da proteina. A desnaturação é considerada consequencia de uma reacção entre a proteina e a agua. A flocculação, de accordo com Pauli e Handovsky, depende dos iões H e dos outros porventura existentes, representando, portanto, uma reacção colloido-electrica. O processo da desnaturação ainda não está inteiramente esclarecido, havendo a esse respeito duas theorias oppostas: uma parte dos auctores [Sörensen (9), Weber e Versmold (10)] attribue o phenomeno a uma deshydratação; outros [Freund e Lustig (11)], ao contrario, a um augmento de hydratação. Si bem que os resultados das experiencias de Versmold (12), baseadas na determinação do espaço de hydratação, confirmem a theoria de Sörensen, ainda restam duvidas

sobre si essas experiencias, feitas com uma só proteina (ovalbumina) e com reacção acida, constituem base sufficiente para uma generalização da theoria de deshydratação. Considerando as experiencias por nós feitas, devemos suppor que esta generalização não é acertada, porque no processo da desnaturação a reacção do meio e a natureza da proteina desempenham papel da maxima importancia. A nosso ver a theoria da deshydratação — pelo menos com os pH por nós empregados — applica-se somente aos systemas de proteínas de dispersão grosseira, parecendo que nos de dispersão fina a alteração pelo calor é occasionada por um augmento da hydratação.

A influencia da deshydratação manifesta-se pela formação de flocos grossos, a do augmento de hydratação, por uma enorme elevação da viscosidade, a ponto de apresentarem os solutos uma consistencia semelhante á dos pesados oleos technicos. Na deshydratação ocorre um desentumescimento das particulas de albumina, ao passo que como augmento de hydratação as mesmas se entumescem. Em consequencia do desentumescimento, as differentes particulas se apresentam asperas e irregulares, de maneira que, com as collisões, ficam presas umas ás outras, formando finalmente, depois de um certo numero de collisões, um unico floco grosso. O entumescimento das particulas naturalmente evita o seu agrupamento e occasiona um augmento da viscosidade. A circumstancia de, na presença do alcool em concentrações mais elevadas, apparecerem os flocos tambem nos solutos e proteínas de dispersão fina está em perfeita conformidade com a opinião acima emittida, pois, si se considerar que neste caso não existe a quantidade de agua necessaria para o entumescimento das particulas, impõe-se a idéa de que a capacidade de deshydratação, conjunctamente do calor e do alcool, produz um desentumescimento, isto é, deshydratação.

Do mesmo modo e baseado na theoria acima exposta, pode-se explicar o phenomeno da semelhança entre o comportamento dos solutos concentrados de pseudoglobulina e seralbumina e o das fracções de dispersão grosseira. Nestas o espaço de hydratação em relação ao espaço preenchido pela agua livre é tão pequeno, que uma aggregação de agua, por parte da proteina, motivada por falta de agua, não é possivel, ou pode ocorrer apenas passageiramente, circumstancia esta que necessariamente dentro de pouco tempo conduz á deshydratação.

Deprehende-se do que foi dito que, nas condições das experiencias indicadas, *attribuimos a desnaturação pelo calor, nas fracções de albumina de dispersão grosseira (labeis), a uma deshydratação, nas de dispersão fina (estaveis), a um augmento de hydratação.*

Esta theoria não collide absolutamente com a natureza de phase dupla da coagulação pelo calor, porquanto ella se refere somente á primeira phase, isto é, á desnaturação.

Devemos accrescentar que a acção desnaturadora da deshydratação deve ser de natureza diversa da do augmento de hydratação. Esta conclusão nós a tiramos

da seguinte experiência: interrompendo-se o aquecimento numa temperatura mais elevada (por exemplo, no caso de um soluto de pseudoglobulina livre de álcool, a 70°) e acrescentando-se á metade do conteúdo da proveta algumas gottas de um soluto a 1 % de ácido acético, ha, naturalmente, em todos os solutos de proteína um novo precipitado. Resfriando-se rapidamente a outra metade do conteúdo da proveta e juntando-se, agora, só o CH_3COOH aos solutos, não ha alteração perceptível na pseudoglobulina e na seralbumina, ao passo que na fibrinoglobulina e na euglobulina se forma um precipitado. Donde concluímos que a *desnaturação em consequencia de deshidratação é irreversível, enquanto a desnaturação consequente a um augmento de hidratação deve ser reversível.*

O soro neste particular se comportou á semelhança das fracções albuminosas estaveis, o que não pode significar outra coisa sinão que a fibrinoglobulina na presença das fracções estaveis toma o caracter das mesmas. Não podemos por ora averiguar qual a maneira por que se processa esta estabilização; porém, baseado nas nossas experiencias ainda não publicadas, feitas com misturas compostas de fracções electrodiálizadas, portanto com "soros artificiaes", estamos inclinado a crer que o grau de dispersão da fibrinoglobulina e da euglobulina é mais fino no soro do que em seus solutos puros.

2) — Conforme se verifica pelas tabellas VII, VIII, X, XI e XIII, os solutos a 1,86 e 0,93 % de pseudoglobulina e seralbumina e a diluição a 1,86 % de soro em presença de álcool são, attingida uma certa temperatura, extremamente viscosos. Procurámos expor a razão desse enorme augmento da viscosidade na parte da discussão sobre o augmento da hidratação, pelo que nos parece superfluo insistir neste ponto.

3) — Pelas observações acrescentadas ás tabellas VIII, IX, XVI e XVII evidencia-se o interessante facto de os solutos de pseudoglobulina mais diluidos, com um certo teor (18 % ou mais) de álcool perderem a sua capacidade de coagulação pelo calor, ou melhor, se comportarem, neste sentido, á semelhança dos corpos albuminosos de Bence-Jones (*). Estes solutos apresentam a turvação maxima bastante abaixo da temperatura de fervura; aquecidos até fervura, clarificam-se e, com o resfriamento, apparece um precipitado, que a um novo aquecimento torna a dissolver-se. A temperatura da turvação maxima depende da concentração da albumina e do álcool. No soluto mais concentrado, a temperatura em que apparece a turvação maxima é mais baixa do que nos mais diluidos e no mesmo soluto ella cae á medida que augmenta o teor de álcool. Resultado semelhante foi publicado por Torsten (13) em relação á ovalbumina e ao soro humano tamponados com acetato e esses resultados seriam, portanto,

(*) Sobre propriedades da proteína de Bence-Jones veja: Willheim, R. — *Biochem. Zschr.* CLXXX:231.1927.

completados com o comportamento semelhante da pseudoglobulina. A circunstancia de só os solutos relativamente diluidos apresentarem o caracter da proteina de Bence-Jones deve impor maior cuidado na observação desta proteina, especialmente quando na execução da prova, segundo a indicação de Malengrau (14) e Blix (15), se usa alcool.

Pelas observações junto ás tabellas verifica-se ainda que a maneira do aquecimento exerce consideravel influencia sobre os phenomenos da coagulação, o que, sem duvida, é motivado pelo curso differente da deshydratação.

Finalmente, desejamos dizer ainda alguma cousa sobre a proporção da baixa da temperatura de coagulação occasionada pelo alcool, portanto sobre a *resistencia relativa* das albuminas. Comparando-se os resultados obtidos com concentrações differentes da mesma proteina, pode-se tirar uma conclusão quanto á resistencia relativa das mesmas ao calor e ao alcool.

Sendo minimo o erro de observação ($\pm 0,5^\circ$) quando se verifica a opalescencia, enquanto a leitura da turvação, mesmo quando se têm á mão solutos para comparação, pode com muito maior facilidade ser influenciada por motivos subjectivos (além disso nem todos os solutos apresentam flocculação), tomámos por base essas observações comparativas a temperatura da opalescencia.

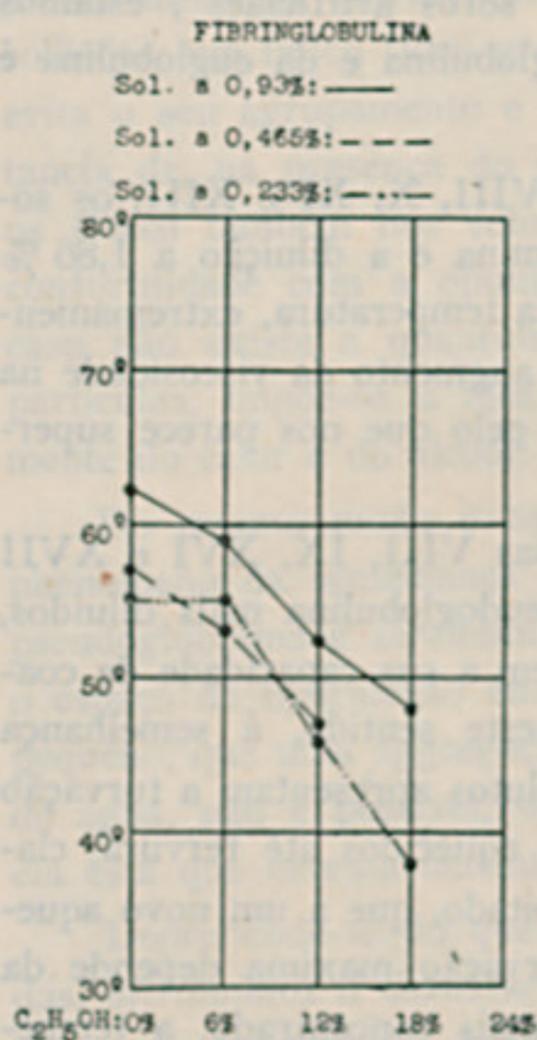


FIG. 1

Pelas Figs. 1 - 5 fica bem evidente que, á semelhança da resistencia absoluta, tambem a resistencia relativa se altera de accordo com a natureza e a concentração da proteina. As curvas dos solutos de fibrinogen a 0,93 e 0,465 %, assim como as de euglobulina a 1,86 e 0,93 % apresentam-se, até um teor de alcool de 12 %, quasi iguaes. As curvas da fibrinogen a 0,233 % e da euglobulina a 0,465 %, por sua vez, tambem são perfeitamente iguaes, até á referida concentração de alcool. A resistencia relativa dos solutos de fibrinogen corresponde á absoluta, sendo minima no soluto a 0,465 %. Os solutos a 1,86 e 0,93 % apresentam a menor resistencia relativa entre as concentrações de alcool de 12 a 18 %, enquanto a mesma na euglobulina a 0,465 % se manifesta entre as concentrações de alcool de 18 a 24 %.

A seralbumina tambem possui, de acordo com sua elevada estabilidade, uma grande resistencia relativa, a qual até uma concentração de alcool de 24 %,

EUGLOBULINA

Sol. a 1,86%: ———
 Sol. a 0,93%: - - - -
 Sol. a 0,465%: - · - · -

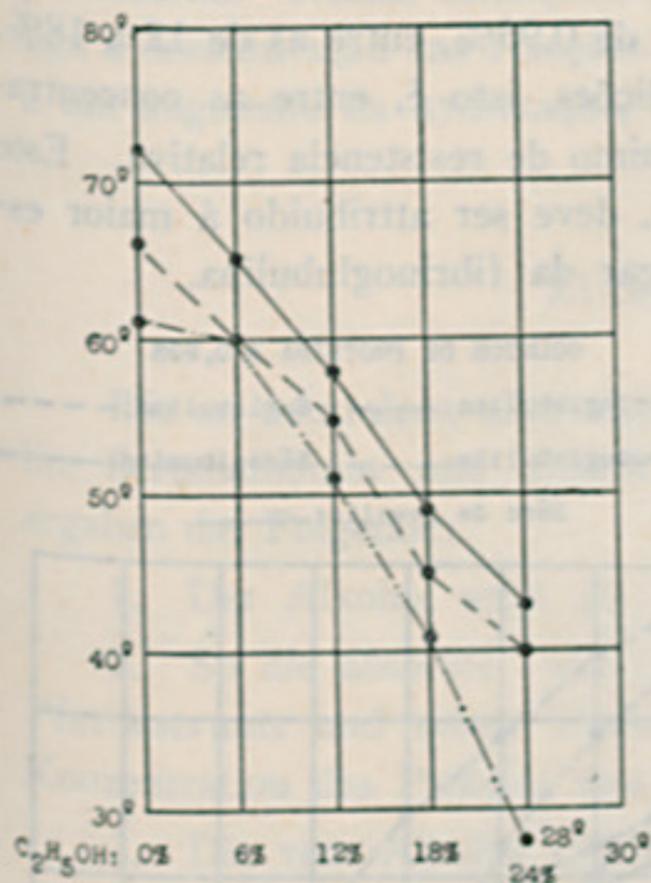


FIG. 2

PSEUDOGLOBULINA

Sol. a 1,86%: ———
 Sol. a 0,93%: - - - -
 Sol. a 0,465%: - · - · -

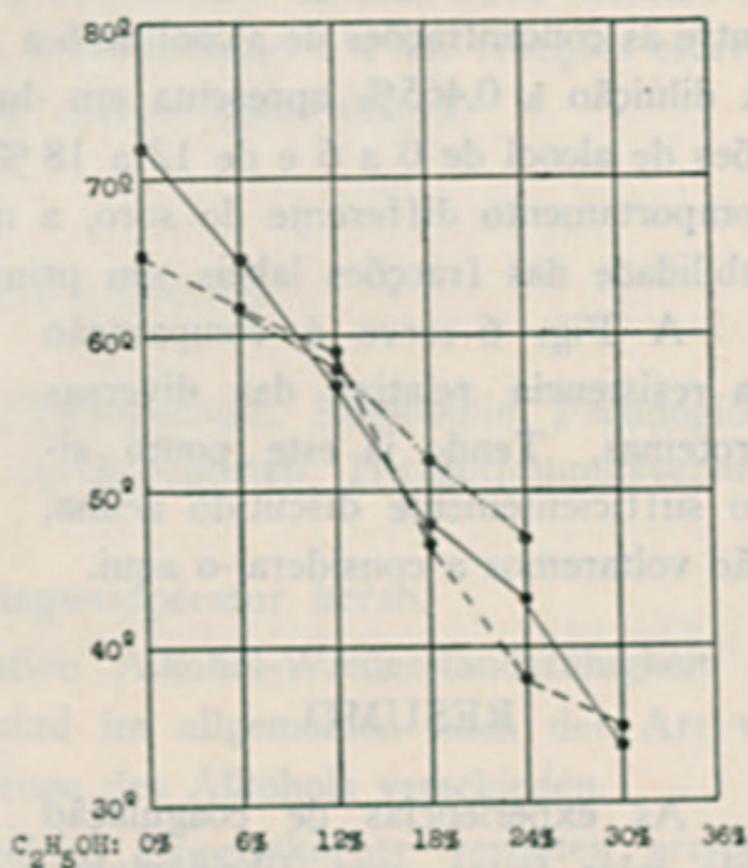


FIG. 3

SERALBUMINA

Sol. a 1,86%: ———
 Sol. a 0,93%: - - - -
 Sol. a 0,465%: - · - · -

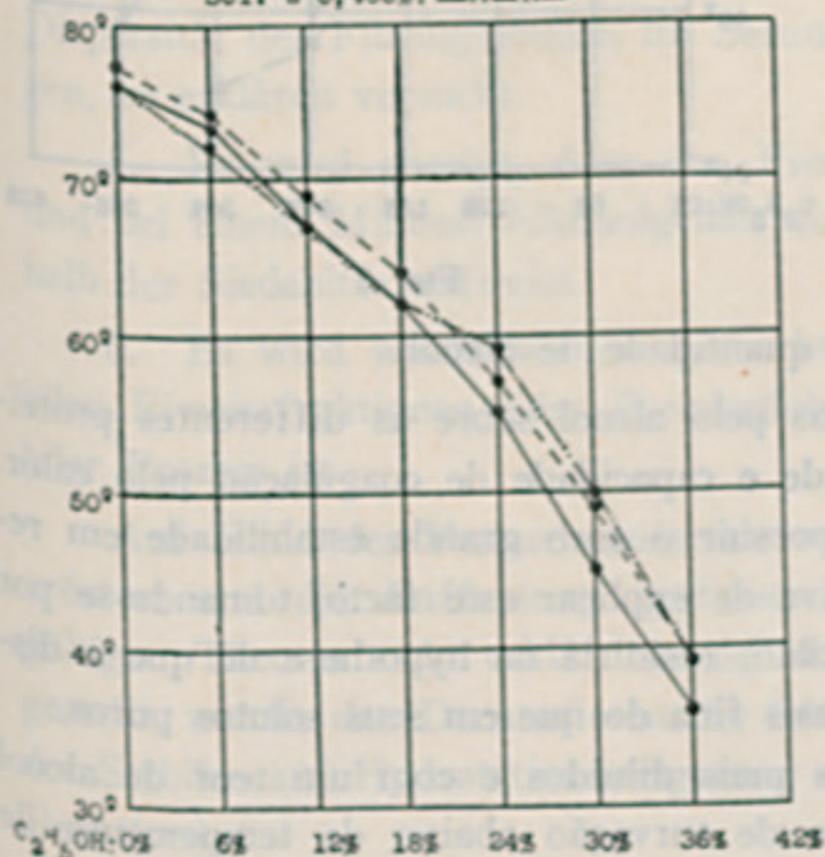


FIG. 4

SORO DE CAVALLO

Conteudo total em proteinas
 1,86%: ———
 0,93%: - - - -
 0,465%: - · - · -

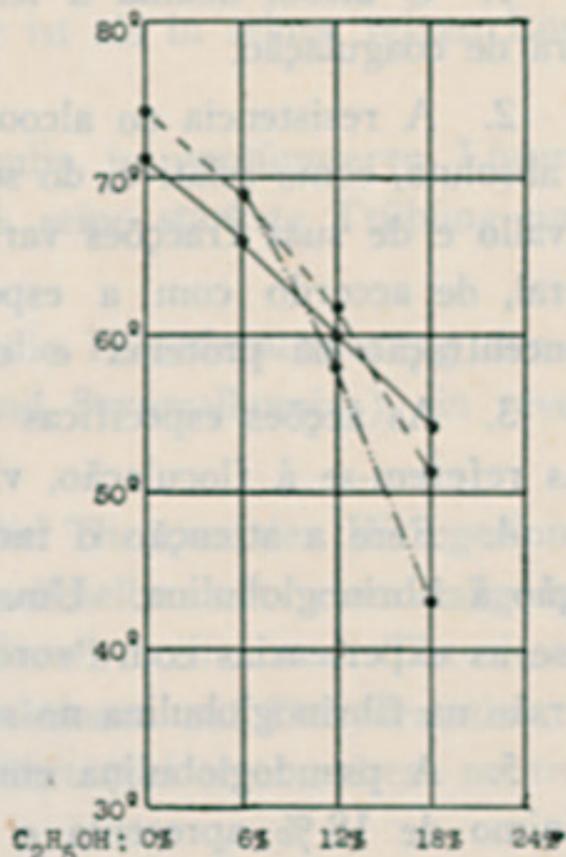


FIG. 5

independente da quantidade de proteina, é quasi perfeitamente uniforme. Esta proteina apresenta a menor resistencia relativa entre as concentrações de alcool de 30 a 36 %.

A resistencia relativa do soro differe consideravelmente da de suas fracções e tambem as tres diluições, comparadas sob este ponto de vista, apresentam notaveis divergencias. O soro a 1,86 % possui a maior resistencia relativa entre as concentrações de alcool de 6 a 12%; o de 0,93%, entre as de 12 a 18%. A diluição a 0,465% apresenta em duas condições, isto é, entre as concentrações de alcool de 0 a 6 e de 12 a 18 %, o minimo de resistencia relativa. Este comportamento differente do soro, a meu ver, deve ser attribuido á maior estabilidade das fracções labéis, em primeiro logar da fibrinoglobulina.

A Fig. 6 serve á comparação da resistencia relativa das diversas proteinas. Tendo já este ponto sido sufficientemente discutido acima, não voltaremos a consideral-o aqui.

RESUMO

As experiencias de coagulação pelo calor feitas com fibrinoglobulina, euglobulina, pseudoglobulina, se-albumina e soro de cavallo, neutros, contendo alcool, esclareceram o seguinte:

1. O alcool abaixa a temperatura de coagulação.
2. A resistencia ao alcool, tanto absoluta, como relativa, do soro de cavallo e de suas fracções varia, em geral, de accordo com a especie e concentração da proteina e com a quantidade de alcool.

3. As acções especificas exercidas pelo alcool sobre as differentes proteinas referem-se á floculação, viscosidade e capacidade de coagulação pelo calor.

4. Fere a attenção o facto de possuir o soro grande estabilidade em relação á fibrinoglobulina. Uma tentativa de explicar este factò, tomando-se por base as experiencias com "soro artificial", residiria na hypothese de que a dispersão na fibrinoglobulina no soro é mais fina do que em seus solutos puros.

5. A pseudoglobulina em solutos mais diluidos e com um teor de alcool minimo de 18 % apresenta o maximo de turvação abaixo da temperatura de fervura.

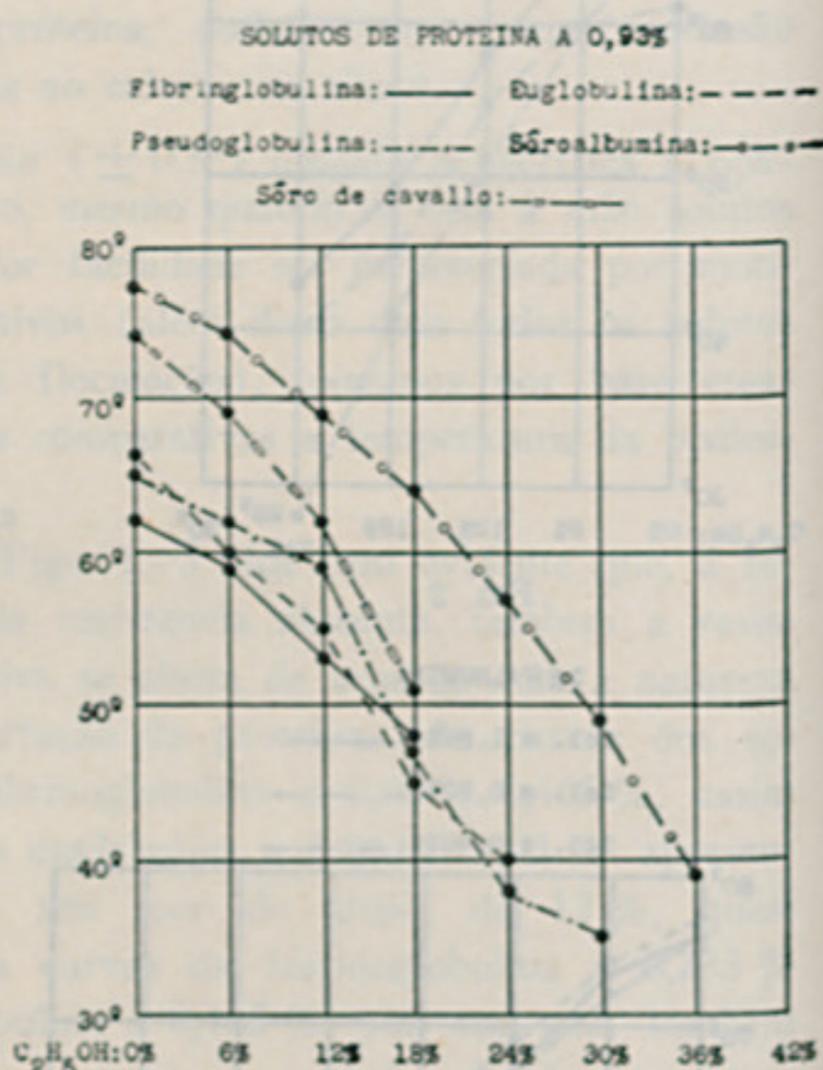


FIG. 6

6. Ficou demonstrado que a desnaturação pelo calor das fracções albuminosas estaveis (da pseudoglobulina e da seralbumina) é provavelmente um processo reversível.

Em face do material das experiencias, as theorias relativas á coagulação pelo calor, porque generalizadoras, afiguram-se insufficientes para explicar este phenomeno. Nestas condições, ressalta a necessidade de uma nova theoria: esta liga a desnaturação das fracções labéis á deshydratação e a das fracções estaveis, a um augmento da hydratação, com uma reacção quasi neutra.

ZUSAMMENFASSUNG

Die an neutralem, alkoholhaltigem Fibringlobulin, Euglobulin, Pseudoglobulin, Serumalbumin und Pferdeserum durchgeführten Hitzgerinnungsversuche ergaben das Folgende:

1. Der Alkohol setzt die Gerinnungstemperatur herab.
2. So die absolute, wie die relative Alkohol-Widerstandsfähigkeit des Pferdeserums und seiner Fraktionen sind im allgemeinen nach der Art und Konzentration des Proteins und der Menge des Alkohols verschieden.
3. Die vom Alkohol auf die einzelnen Eiweisskörper verübten artspezifischen Wirkungen beziehen sich auf die Flockenbildung, Viskosität und Hitzgerinnungsfähigkeit.
4. Es wird darauf hingewiesen, dass das Serum dem Fibringlobulin gegenüber eine erhöhte Stabilität besitzt. Diese Tatsache wird — gestützt auf mit "künstlichen Sera" durchgeführte Versuche — durch die Annahme, dass die Dispersität des Fibringlobulins im Serum feiner ist als in seinen reinen Lösungen, zu erklären versucht.
5. Es wird gezeigt, dass das Pseudoglobulin in verdünnteren Lösungen und bei einem Mindest-Alkoholgehalt von 18 % seine stärkste Trübung unterhalb der Siedehitze aufweist.
6. Es wird wahrscheinlich gemacht, dass die Hitzedenaturierung der stabilen Eiweissfraktionen (des Pseudoglobulins und Serumalbumins) ein reversibler Prozess ist.

Auf Hand des Versuchsmaterials werden die Theorien der Hitzegerinnung erörtert und die Auffassung geäußert, dass dieselbe mit einer allgemeingültigen Theorie nicht erklärt werden kann. Es wird eine neue Theorie aufgestellt, welche das Denaturieren der labilen Fraktionen auf (Dehydratation, das der Stabilen auf Hydratationssteigerung zurückführt (bei einer nahezu neutralen Reaktion).

BIBLIOGRAPHIA

1. *Klobusitzky, D. von* — J. Phys. Chem. XXXVI:3189.1932 et Mem. Inst. Butantan VI:295.1931.
2. *Spiro, K.* — Beitr. chem. Physiol. IV:300.1904.
3. *Loeb, J.* — Die Eiweisskörper u. die Theorie der koll. Ersch., J. Springer, Berlin. 1924.
4. *Schorr, C.* — Biochem. Zschr. XLVII:269.1912.
5. *Teorell, T.* — Biochem. Zschr. CCXXIX:1.1930.
6. *Klobusitzky, D. von* — Biochem. Zschr. CCXXIII:120.1930; Koll. Beih. XXXII:382.1931 et Mem. Inst. Butantan VI:276.1931.
7. *Hardy, W. B.* — J. Physiol. XXIV:158.1899.
8. *Pauli, W. et Handovsky, H.* — Beustr. chem. Physiol. XI:425.1908.
9. *Sörensen, S. P. L.* — C. R. Trav. Labor. Carlsberg XV:9.1925.
10. *Weber, H. H. et Versmold, H.* — Biochem. Zschr. CCXXXIV:62.1932.
11. *Freund, E. et Lustig, B.* — Biochem. Zschr. CLXVII:355.1926.
12. *Versmold, H.* — loc. cit. (10).
13. *Teorell, T.* — loc. cit.
14. *Malengrau, F.* — Arch. intern. Physiol. XVIII:151.1922.
15. *Blix, G.* — Svenska Läkaretidningen (38):1105.1930.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan, recebido em fevereiro de 1934 e publicado em alemão in Biochemische Zeitschrift. Dado á publicidade em agosto de 1934.).