

## ESTUDOS BIOCHIMICOS SOBRE OS VENENOS DAS SERPENTES DO GENERO *BOTHROPS*

### I. Acção coagulante e purificação da secreção da glandula venenosa da *Bothrops jararaca*

POR

DIONYSIO VON KLOBUSITZKY

Desde as communicações de BRAINARD e de MARTIN (1), que descreveram a coagulação intravascular do sangue sob o effeito dos venenos da cascavel e da "serpente preta" australiana (*Pseudechis porphyriacus*), muitos auctores se têm occupado da acção hemostatica do veneno de certas serpentes. Recentemente HOLDEN (2), trabalhando com veneno de cobras Australianas, tentou, porém sem resultado satisfactorio, isolar, sob forma activa, por meio de adsorpção pelo  $BaCO_3$ , a substancia que provoca a coagulação. MACFARLANE e BARNETT (3) publicaram algumas experiencias sobre coagulação do sangue oriundo de pessoas hemophilicas sob a acção do veneno de *Vipera russellii*. Devemos tambem mencionar PECK (4) e PECK e GOLDBERGER (5), que, applicando o veneno, obtiveram bons resultados no tratamento da diathese hemorrhagica e da hemorrhagia do utero. Finalmente, BARNETT e MACFARLANE (6), que fizeram um estudo comparativo do effeito do veneno de varias colubrideas, viperideas e crotalideas no tratamento da hemophilia.

Consultando a bibliographia, verificámos que, apesar do grande numero de trabalhos, antigos e recentes, feitos a respeito, ha dois pontos em que os auctores discordam: 1.º alguns auctores, como ARTHUS (7), HOUSSAY, SORDELLI e NEGRETE suppõem que a acção coagulante ou hemolytica seja devida ao principio toxico, attribuindo a este o character de fermento, enquanto outros, como MORAWITZ (8), HOLDEN (2) são de opinião que estas propriedades não têm relação alguma com o principio toxico; 2.º, o facto de a secreção da glandula venenosa da mesma serpente produzir, ora hemolyse, ora coagulação, é explicado pela maioria dos investigadores e especialmente ARTHUS, HOUSSAY, NOC (9) e CAL-

METTE (10) como devido a substancias da mesma natureza, ao passo que FAUST (11) suppõe ser a hemolyse produzida pelo principio toxico e a coagulalação, por um fermento.

Com respeito á acção coagulante ou hemolytica dos venenos do genero *Bothrops* (nome antigo: *Lachesis*), os trabalhos mais importantes são os de LACERDA (12), ARTHUS e colaboradores (13), NOC (9), BRAZIL e RANGEL PESTANA (14), SAMMARTINO (15), HOUSSAY e SORDELLI (16), RANGEL PESTANA (17) e HOUSSAY e NEGRETE (18). As conclusões desses auctores são bastante divergentes: LACERDA e BRAZIL e RANGEL PESTANA assignalam que o sangue dos animaes de laboratorio fica liquido nos vasos após injeccões do veneno; SAMMARTINO affirma que o envenenamento pela *B. alternata* tem por consequencia uma diminuição da coagulabilidade, ao contrario de ARTHUS, que indica o apparecimento de thrombose, quando a dose é pequena, e coagulação elevada a principio e depois tendencia persistente á não coagulação, quando a dose empregada é grande. HOUSSAY e colaboradores são de opinião que todos os venenos deste genero são anti-coagulantes e que a coagulação é causada por uma thrombina especifica, existente na secreção da glandula venenosa de certas especies. RANGEL PESTANA attribue ás especies de *Bothrops* apenas uma acção hemolytica muito fraca, verificando que não ha relação entre esta propriedade e a acção toxica. NOC regista que o veneno destas serpentes facilita a coagulação, attribuindo este phenomeno á libertação da thrombina contida no plasma.

O fim de nossas pesquisas é contribuir, de algum modo, para o esclarecimento dos motivos dessas discordancias. No presente trabalho versaremos sobre o veneno da *Bothrops jararaca*. As experiencias foram realizadas: com o veneno natural, isto é, com a secreção normal das glandulas venenosas; com solutos preparados com o veneno secco; finalmente, com o veneno purificado, isento de proteinas, productos de sua decomposição e substancias dialysaveis. Por economia de espaço damos um resultado apenas de cada experiencia.

#### Technica geral

Para determinação da acção coagulante foi usado quasi que exclusivamente o sangue oxalatado de cavallo, sendo de 0,3% o teor de  $(\text{COONa})_2$ .

Salvo onde houver indicação especial, usámos sempre 5 cc. de sangue e 1 cc. do soluto oxalatado. Em tubos em serie juntámos o soluto a pesquisar, diluido na maneira usada em zymologia, isto é, sempre ao dobro. As experiencias foram executadas em tubos de ensaio, marcando-se o tempo de coagulação completa, isto é, até que o sangue não se movesse mais ao se inverter o tubo. O poder toxico do material foi verificado por meio de injeccões intravenosas em pombos. Conforme a technica usada na Secção de Immunologia do Instituto, considera-se como dose minima letal (D. M. L.) a menor quantidade de veneno de *B. jararaca*

capaz de matar, inoculada por via venosa, um pombo dentro de vinte minutos (\*). Como nas condições referidas não ha necessidade de se marcar o tempo de coagulação com muito precisão e a influencia da temperatura deve ser desprezada, as experiencias foram feitas em temperatura ambiente, a qual variou entre 23 e 25°C.

### 1. Experiencias com a secreção natural

A secreção centrifugada, representando mistura proveniente de cerca de 50 jararacas, apresenta-se como um liquido transparente, de côr amarello-clara, viscoso e ligeiramente acido (pH determinado pelo electrodo de platina e gas de H = 5,46). Segundo as verificações de BRAZIL e RANGEL PESTANA (14), a secreção natural contém 33% de substancias seccas, pelo que foi ella usada na diluição de 1:32 com agua physiologica. Eis os resultados das experiencias de coagulação :

#### QUADRO I

Sangue oxalatado de cavallo + veneno natural

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diluição lação	sem dil.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Coagulação em minutos	ficou liquido	2'	2'	2'5"	2'5"	2'30"	3'40"	10'	12'15"	13'	14'	

A secreção natural não diluida na mesma proporção tambem não coagulou; ao contrario, após 2 horas, o sangue ficou lysado.

Numa outra experiencia foram usados 15 cc. de sangue humano, retirados da veia cubital e collocados em 3 tubos: no primeiro (No. 1) + 1 cc. da secreção natural pura; no segundo (No. 2) + 1 cc. da secreção natural diluida a 1:1920, isto é, de modo que seu teor em substancias seccas fosse 1 ‰; no terceiro (No. 3), sem secreção, para servir de testemunha. O resultado foi o seguinte:

No. 1 — Hemolyse dentro de 2 minutos.

No. 2 — Coagulação em 2 minutos.

No. 3 — Coagulação em 7 minutos.

(\*) Quasi todos os doseamentos foram feitos pelo nosso distincto collega, dr. J. B. Arantes, chefe da Secção de Immunologia, a quem agradecemos a collaboração.

Verifica-se por estes dados que a secreção natural, na concentração de 5,5%, causa hemolyse; na concentração de 0,02% ou 0,01%, deixa o sangue liquido; de 0,005% para baixo, provoca a coagulação do sangue.

## 2. Experiencias com solutos de veneno.

Foi usado um soluto de 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub>, sendo de 0,6 mgm. (\*) a D. M. L. do veneno dissolvido. Eis os resultados:

QUADRO II

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Diluição	sem dil.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Coagulação em minutos	2'20"	3'55"	4'30"	9'20"	10'15"	13'20"	19'25"	56'	60'	297'	409'	675'	880'

Numa outra serie de experiencias foi determinada a influencia da concentração por meio dum soluto a 8,33%. Os resultados podem ser resumidos como segue:

	1a. leitura 1 h. depois	2a. leitura 3 ½ h. depois	3a. leitura 19 h. depois
5 cc. de sangue + 1 cc. de sol. de veneno (concentração a 1,4%)	liquido	liquido	hemolyse
2 cc. de sangue + 2 cc. de sol. de veneno (concentração a 4,16%)	liquido	hemolyse	
1 cc. de sangue + 2 cc. de sol. de veneno (concentração a 6,9%)	liquido	hemolyse	

Experiencias deste typo foram repetidas com sangue equino, tirado da veia e directamente collocado nos tubos previamente preparados. O soluto de veneno era a 2,78%.

	1a. leitura 1 h. depois	2a. leitura 19 h. depois
5 cc. de sangue + 1 cc. de sol. de veneno (concentração a 0,49%)	liquido	hemolyse
2 cc. de sangue + 2 cc. de sol. de veneno (concentração a 1,39%)	liquido	hemolyse
1 cc. de sangue + 5 cc. de sol. de veneno (concentração a 2,3%)	começo de hemolyse	hemolyse

(\*) O veneno secco tinha inicialmente a D.M.L. de 0,26 mgm.. Depois de pulverizado, foi guardado durante 3 annos, soffrendo provavelmente uma ligeira oxydação, facilitada pela grande superficie, donde decorre esta diminuição da actividade.

Estas experiencias demonstram tambem, em relação, tanto ao sangue oxalato, quanto ao sangue natural, que a influencia da secreção da glandula venenosa depende de sua concentração. Em concentração inferior a 0,4% produz coagulação; entre 0,4 e 4% impede a coagulação e acima de 4% causa hemolyse dentro de pouco tempo, sendo que as concentrações que impedem a coagulação tambem causam hemolyse, mas só quando postas em contacto demorado com o sangue.

Afim de obter a explicação destes varios phenomenos, aparentemente causados pelo principio toxico, tentámos isolar da secreção a substancia venenosa.

### 3. Purificação para isolamento do principio toxico.

A secreção, além do principio toxico, contém proteínas de caracter albuminoso e globulinoso, peptonas, fermentos, substancias corantes e varios saes inorganicos. Porisso, para a purificação, tivemos, em primeiro logar, de proceder à sua desproteinização.

Baseados nas experiencias de FAUST (19), fizemos a desproteinização por meio do calor ou de hydroxydo de ferro colloidal. Ambos os methodos permitem obter solutos isentos de proteínas typicas, mas têm a desvantagem de permitir que o precipitado acarrete tambem consigo uma parte da substancia toxica, perda inevitavel. Assim, experimentámos o  $\beta$ -naphtholsulfonato de Ca, que se vende no commercio sob o nome de *asaprol*, segundo a formula de RIEDEL (20), e tentámos a adsorção pelo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , conforme indicação de WILLSTAETTER (21). Verificámos que o *asaprol* não pode ser usado, porque destroe completamente o veneno. Tambem a adsorção pelo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  não representa um methodo optimo, porque este sal só pode ser usado em solutos previamente desproteinados, visto o adsorvente retirar tambem um pouco de proteina. Por esse motivo, em nossas experiencias foram firmados os dois methodos seguintes:

*Methodo I.* Dissolvem-se 20 grammas da secreção secca (\*) em 800 cc. de soluto de NaCl a 6%. A reacção deste soluto é apenas ligeiramente acida (pH 6,0), de sorte que, para facilitar a coagulação, é necessario adicionar HCl a 5% até se attingir o pH 5,0, que se verifica rapidamente com papel de tornasol que fica distinctamente vermelho. Em seguida, aquece-se a 70°C o soluto em banho maria, mexendo sempre, durante 10 minutos; assim se precipita a maior parte das proteínas coagulaveis. Após um rapido resfriamento filtra-se o soluto e ajusta-se o pH com NaOH até 6,0 (\*\*). Faz-se então a precipitação completa das proteínas por meio de um soluto de oxydo de ferro colloidal a 10%, numa proveta, juntando o reactivo gotta a gotta e mexendo sempre o soluto.

(\*) Para a purificação usámos a substancia secca pulverizada, tendo como D.M.L. 0,6 mgm.

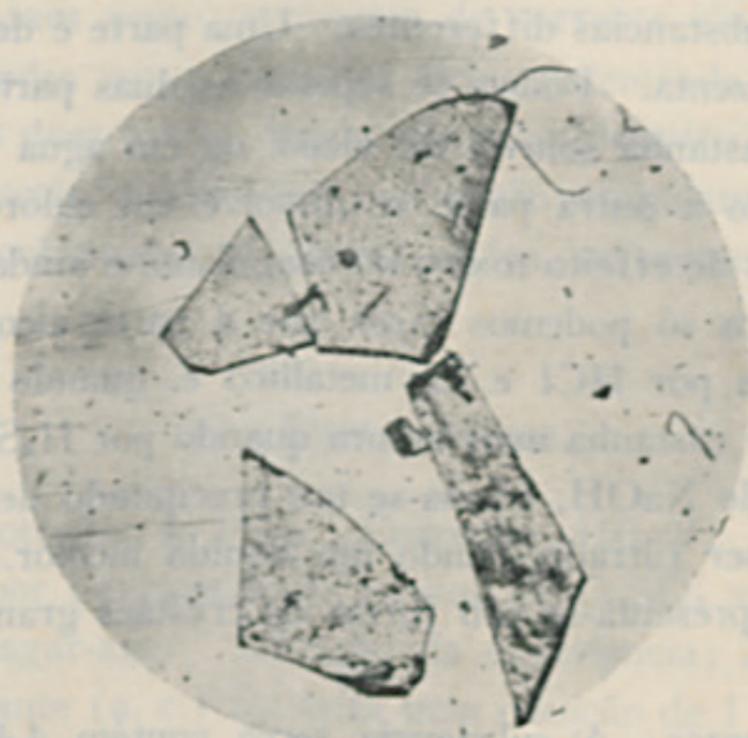
(\*\*) Sendo a substancia toxica muito sensivel á reacção alcalina, é preciso evitar ultrapassar este pH.

Em intervallos convenientes interrompe-se a precipitação até o precipitado ficar depositado e retira-se uma pequena quantidade do liquido sobrenadante para verificar si ainda dá precipitado pelo soluto de ferro. Terminada a precipitação, filtra-se o soluto no frigo e diminue-se o volume para 60 cc.. A concentração é feita pela ultrafiltração no frigo, usando-se como ultrafiltro membrana de colloidio em acido acetico glacial a 6%, endurecida em agua. Para facilitar a ultrafiltração, é conveniente mexer o soluto. Lava-se agora, numa proveta, o liquido concentrado em 20 cc. de agua destillada. O liquido contém ainda substancias biuretas, principalmente peptonas, para cuja eliminação usa-se o acido metaphosphorico em soluto a 10%, conforme indicação de FAUST. Elimina-se o precipitado assim formado pela filtração, devendo a prova de biureto com agua destillada ser negativa no filtrado. Completa-se o volume deste para 200 cc. e adiciona-se ao liquido igual volume de alcool absoluto, produzindo assim uma turvação que pode ser eliminada pela centrifugação do soluto. Ao liquido claro junta-se mais alcool absoluto até não se formar mais precipitado, centrifugando-o de novo. O precipitado contém o principio toxico e é collocado num sacco de pergaminho e dialysado no frigo em agua destillada — trocada 2 vezes por dia — durante 2 dias. Termina-se a dialyse com uma electrodialyse de 8-10 horas, usando uma corrente de 110 Volts. O soluto assim purificado contém somente o principio toxico e, para converter este em pó, precipita-se o soluto novamente com alcool absoluto. A seccagem deste precipitado é feita no vacuo sobre acido sulfurico, numa estufa a 37°. Dentro de 2 dias pode o mesmo alcançar o peso constante. Rendimento:  $\pm$  8%.

*Methodo II.* Adicionam-se ao soluto a 10% do veneno secco, revolvendo-o fortemente com o mexedor electrico, alternadamente 6 cc. de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  a 9% e 3 cc. de  $\text{CaCl}_2$  a 15% até que se obtenha um soluto bem leitoso. Deixa-se depositar o precipitado e retira-se uma amostra do liquido sobrenadante, diluindo-a a 1:25 e della juntando 1 cc. aos 5 cc. de sangue oxalatado. Si dentro de 15 minutos houver coagulação, continua-se a adsorpção pelos solutos mencionados, até que a prova de coagulação seja negativa. Centrifuga-se depois o precipitado, que é constituido pelo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e pelo principio toxico por elle adsorvido, e dissolve-se em acido acetico a 10%. Submettendo-se esta solução á dialyse no frigo durante 8 dias, obter-se-á um soluto isento de Ca. As substancias biuretas, cujas quantidades são pequenas, eliminam-se pelas precipitações com hydroxydo de ferro colloidal e acido metaphosphorico, seguindo-se depois o mesmo processo de purificação usado no methodo I. Rendimento: muito variavel, no maximo 10,5%.

A substancia secca assim obtida apresenta-se sob a forma de um pó amorfo, de côr amarello-esverdeada, que ao exame microscopico se revela como plaquinhas de formas irregulares, porém marginadas de linhas rectas, de côr amarello-canario pallida e estructura ligeiramente marmorizada. Dá, com agua ou alcool

a 50%, solutos colloidaes fortemente espumantes. Sua dose minima letal é de 0,2 mgm. As analyses qualitativas (\*) mostram que ella não contém azoto, enxofre ou phosphoro, nem halogeneos, mas é composta tão somente de C, H e O. Tambem foi verificado que não se pode della desdobrar, pela hydrolyse com acido mineral, nenhum hydrato de carbono com poder reductor. Tentativas de crystallização (resfriamento, precipitação pelos saes, evaporação, precipitação por varias substancias) não deram resultado.



Bothropotoxina  
tres vezes precipitada. (D. M. L. = 0,05 mgm.)

Comparando as propriedades da substancia obtida com as da ophiotoxina e crotalotoxina, preparadas por FAUST, não pode haver duvida de que aquella corresponde ao principio activo, até agora mais puro, do veneno de *B. jararaca*. Porisso, embora admittindo a possibilidade de mais tarde ser verificado que ella ainda é composta de dois ou mais elementos de propriedades toxicas, propomos para a mesma o nome de **bothropotoxina** (\*\*).

Antes de relatar sobre a acção coagulante da bothropotoxina mencionaremos algumas experiencias elucidativas da composição da secreção da glandula venenosa (\*\*\*)).

*Substancias azotadas.* Pelo doseamento do nitrogenio na secreção secca por meio de processo de KJELDAHL verificámos que 1 cc. dum soluto a 1% contém 0,9704 mgm.; isto é, 9,704% de nitrogenio, de que 8,971% se originam das proteínas coagulaveis. Por meio de fraccionamento pelo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  observámos que a proteina se compõe de albumina e globulina. Ao contrario de FAUST, não

(\*) Os resultados das analyses quantitativas serão objecto da segunda parte desta investigação, a ser feita em collaboração com nosso distincto collega, dr. Paulo König.

(\*\*) Os futuros compostos, della isolados, deveriam ser designados pelas varias letras do alphabeto grego.

(\*\*\*) Os exames foram feitos numa amostra oriunda da mistura de cerca de 100.000 extracções de veneno de exemplares de *B. jararaca*.

encontrámos albumoses na secreção, de modo que, depois de eliminadas as proteínas coaguláveis, só poude ser verificada a presença das peptonas. A determinação do nitrogenio mostra-nos que a maior parte, isto é, 56,06%, da secreção secca é composta de proteínas coaguláveis.

*Sustancias extrahiveis pelo ether de petroleo.* — Extrahimos algumas amostras da substancia secca por ether de petroleo com ponto de ebulição acima de 50°C, methodo de SOXLETH, e verificámos que a concentração total das substancias extrahiveis perfaz 5,296%. O extracto ethereo, pelo simples aspecto, mostra ser mistura de duas substancias differentes. Uma parte é de côr castanho-escura e a outra amarello-cinzenta. Podem-se separar as duas partes pelo alcool, sendo a substancia de côr castanha soluvel em alcool ou em agua e não em benzol ou chloroformio, enquanto a outra parte se dissolve em chloroformio. Ambas as substancias são isentas de effeito toxico ou coagulante e ainda estão sendo objecto de pesquisas. Por ora só podemos dizer que a parte alcool - e hydro-soluvel não pode ser reduzida por HCl e Zn metallico e, quando oxydada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> torna-se de côr rosa, e castanha mais escura quando por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e KMnO<sub>4</sub>. Pela addição de sol. 4N de NaOH, forma-se um precipitado de côr castanho-escura que pode facilmente ser filtrado, dando um liquido incolor. Ao exame microscopico o precipitado apresenta-se sob forma de crystaes grandes, irregulares e de côr amarello-clara.

*Substancias mineraes.* A substancia secca contém 4,437% de substancias mineraes não volateis, dos quaes 0,179% de chloro (methodo de VOLHARD-SALKOWSKI), não revelando a presença de ferro.

#### 4. Acção coagulante da bothropotoxina

Estas experiencias foram feitas com um soluto, em agua physiologica, de bothropotoxina a 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub>, sob condições identicas ás mencionadas na descripção da technica geral. Expomos no quadro abaixo os resultados de uma das experiencias:

#### QUADRO III

Sangue equino oxalatado + bothropotoxina

Sol. a 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub>; D. M. L. = 0,25 mgm.

Tubos	1	2	3	4	5
Diluição	não dil.	1:2	1:8	1:32	1:128
Coagulação em minutos	4'15"	7'	9'50"	14'	45'

Para verificar a influencia da concentraçao fizemos experiencias com solutos de concentraçoes mais elevadas, até 10%, e observámos que os solutos de concentraçao superior a 1% mantêm o sangue retirado da veia em estado liquido, mas, *contrariamente ás experiencias feitas com sol. de veneno natural, nunca verificámos hemolyse*. Este facto nos suggeriu que provavelmente a acção coagulante tambem não seja occasionada pelo veneno puro, mas por uma substancia de natureza enzymica, que ainda ficasse ligada ao principio toxico da bothropotoxina. Tentámos, porisso, separar a acção toxica da coagulante, usando varios methodos, taes como: passagem de corrente electrica, ultrafiltração e aquecimento. Por todas estas maneiras ficou patenteada a impossibilidade de uma separaçao destas duas acções, sendo que a bothropotoxina perde ou conserva sempre na mesma escala a toxicidez e a acção coagulante. Para documentar estas tentativas, exponhamos aqui alguns dados, referentes a:

a) Electrophorese.

Sol. de bothropotoxina a 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub>. Corrente: 110 V. Electrodo de cobre, ligaçao da corrente por intermedio de solutos de CuSO<sub>4</sub> a 10% e sol. saturado de KCl e tubos de agar-agar. Duraçao da experiencia: 2 horas. Para determinar a acção coagulante (a. c.) foi feita uma diluiçao de 1:10 e usada a technica geral; para verificar a acção toxica (a. t.) foram injectados 0,7 cc. (diluiçao de 1:1) em pombos, por via intravenosa (\*).

Sol. a) pH: 5,89

---

Liquido tirado do polo positivo: a. c. — 8'; a. t. — mata em 16'.

" " " " negativo: a. c. — 7'; a. t. — mata em 10'.

Sol. b) pH: 4,09

---

Liquido tirado do polo positivo: a. c. — 11',40"; a. t. — symptomas leves

" " " " negativo: a. c. — 12',45"; a. t. — " "

Sol. c) pH: 8,89

---

Liquido tirado do polo positivo: a. c. — 9'50"; a. t. — symptomas graves.

" " " " negativo: a. c. — 22'; a. t. — nenhum symptoma.

(\*) Para as experiencias de cataphorese o pH foi ajustado com tampões (acetato e phosphato, respectivamente) e, no liquido retirado do aparelho de electrophorese, foi ajustado novamente o pH inicial do soluto, isto é, a 5,9.

## b) Ultrafiltração.

Como ultrafiltros foram usados vasos de porcellana de BECHHOLD-KÖNIG cobertos por uma membrana, preparada de algodão polvora a 4, 6 e 8% em acido acetico glacial, endurecida em agua. O tamanho dos poros foi determinado pelo methodo de sopro por ar segundo BARUS (22) e BECHHOLD (23), sendo usado, como duplos de liquido, o alcool isobutylico saturado com agua e a agua saturada com aquelle alcool (24). Para ultrafiltração usámos sempre solutos de bothropotoxina a 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub>. As experiencias revelaram que, quando o diametro dos poros maximos é inferior a 330 m $\mu$ ., o liquido que atravessa a membrana não possui acção coagulante nem acção toxica, ao passo que membranas com porosidade mais grosseira deixam passar inalterado um liquido com acção coagulante e toxica.

## c) Aquecimento.

A bothropotoxina mostra-se bastante thermoestavel, pois seu soluto pode ser aquecido durante 5 min. a 80°C, sem a minima alteração no seu effeito coagulante ou toxico. Seu aquecimento a 75° durante 15 min. traz por consequencia um retardamento da coagulação (8' em vez de 4') e uma diminuição do poder toxico (apenas phenomenos graves passageiros em lugar de morte dentro de 8'). Seu aquecimento a 85°C durante 15 min. determina coagulação do sangue só após 30 min. e, em quantidade dobrada, não causa phenomeno algum no pombo. Sobre a influencia de temperatura ainda mais elevada podemos-nos orientar pelos dados seguintes:

## QUADRO IV

Sol. de bothropotoxina a 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub>; D. M. L. = 0.5 cc. (\*)

Acção coagulante: 5 cc. de sangue oxalatado + 1 cc. do soluto de bothropotoxina = coagulação em 5 min.

Aquecimento	Acção coagulante	Acção toxica	
		de 1 cc.	de 2 cc.
90°C 10'	10'	nem symptomas leves	symptomas graves
100°C 10'	13'	> >	> >

Cumpre mencionar que o extracto do musculo da *B. jararaca*, aquoso ou glicerinado, ou adsorvido pelo Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, tambem possui acção coagulante

(\*) O soluto foi depositado durante alguns dias; porisso, houve uma diminuição de sua acção toxica.

bastante forte sem effeito toxico, pelo que pensámos numa identidade desta substancia coagulante com a supposta impureza da bothropotoxina. Ha, porém, dois factores a contraporem-se a esta hypothese: primeiro, o extracto muscular é thermolavel, perdendo completamente a acção coagulante quando aquecido a 80° durante 15 minutos; segundo, extractos efficazes só os obtivemos durante o verão e, desde que as noites se tornaram mais frescas (10°C), não mais conseguimos isolar a substancia coagulante.

De accordo com as experiencias até agora relatadas, pode-se verificar que a acção coagulante é causada, de facto, pela *bothropotoxina*, ou pelo menos por um composto fortemente ligado a ella, cujo isolamento, em estado de pureza, ainda não foi possível. Quanto ao effeito anticoagulante dos solutos concentrados da *bothropotoxina*, somos de opinião que seja causado por uma impureza ainda retida na *bothropotoxina* e cuja quantidade seja tão diminuta, que sua actividade só possa entrar em jogo quando comparece em grande concentração. Esta opinião é baseada no facto de a *bothropotoxina* só ter effeito anticoagulante quando está presente no sangue numa concentração de 1% ou mais, enquanto, para a secreção natural, uma concentração de 0,01% e, para os solutos preparados da substancia secca, uma concentração de 0,4% já são sufficientes para impedir a coagulação.

#### Mecanismo da acção coagulante da bothropotoxina

Afim de esclarecermos o mecanismo da acção coagulante, fizemos experiencias com sangue desfibrinado; com hematias quatro vezes lavadas com NaCl a 0,9%; com solutos de fibrinogenio (\*); com solutos de fibrinoglobulina. Verificámos que a bothropotoxina só pode coagular o sangue quando este contém fibrinogenio e, portanto, prothrombina e thrombocinase; assim, *só é capaz de substituir o calcio*. As experiencias que seguem evidenciam claramente esta propriedade da bothropotoxina:

20 cc. sol. de fibrinogenio	+	1 cc. sol. de bothropotoxina	= não ha coagulação
20 cc. " " "	+	1 cc. sol. de CaCl a 2% + sol. de bothropotoxina	= não ha coagulação
20 cc. " " "	+	10 gottas de plasma oxalatado e bem centrifugado + sol. de bothropotoxina	= coagulação.

Em outra serie de experiencias a coagulação do sangue foi retardada com  $(\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sendo que, conforme foi demonstrado por CsAPÓ e por nós (25), estes saes, devido a sua acção estabilizadora sobre o fibrinogenio, impedem a coagulação durante 24 horas, quando presentes numa concentração de N/O,35 e 0,30, respectivamente. O quadro abaixo contém dados comparativos em relação ao plasma oxalatado.

(\*) Os solutos de fibrinogenio foram preparados pelo methodo de HAMMARSTEN e HEUBNER.

## QUADRO V

Concentração percentual da bothropotoxina	Tempo de coagulação sangue com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Tempo de coagulação sangue oxalatado
$2 \cdot 10^{-2}$ gm.	2' 30''	2' 20''
$1 \cdot 10^{-2}$ >	3' 50''	3' 55''
$5 \cdot 10^{-3}$ >	4' 50''	4' 30''
$25 \cdot 10^{-3}$ >	9' 30''	9' 20''
$12 \cdot 10^{-3}$ >	15' 10''	10' 15''
$6 \cdot 10^{-4}$ >	18'	13' 20''
$3 \cdot 10^{-4}$ >	47'	20'
$15 \cdot 10^{-4}$ >	160'	57'
$78 \cdot 10^{-5}$ >	470'	175'
$39 \cdot 10^{-5}$ >	660'	298'

Verifica-se por estes dados que a acção coagulante da bothropotoxina, numa concentração até 0,0025%, é igual para o sangue com e sem Ca.; em concentração menor, o sangue com calcio, mas contendo fibrinogenio estabilizado, coagula bem mais lentamente do que o sangue destituido de Ca contendo fibrinogenio em estado normal. Baseado nestas experiencias, supomos que a coagulação sanguinea devida á bothropotoxina seja uma acção composta, contendo pelo menos dois factores, dos quaes o primeiro se manifesta na substituição do calcio e o segundo, na desestabilização do fibrinogenio. Não temos ainda elementos para comprehensão do mecanismo deste phenomeno. Quanto ao calcio, a hypothese mais simples seria que a bothropotoxina liberta Ca do oxalato de calcio; verificámos, porém, que tal não acontece. Com respeito á desestabilização do fibrinogenio, dado que a bothropotoxina tambem é uma substancia colloidal, parece-nos mais provavel dar-se uma reacção colloidal entre ambas. Esta hypothese será objecto de pesquisa futura.

## RESUMO

As experiencias sobre a acção coagulante do veneno da *Bothrops jararaca* confirmaram os resultados obtidos por certos auctores com respeito ao sangue oxalatado, com a restricção de que o mesmo só causa coagulação quando presente numa concentração baixa (de 0,005% para baixo); em concentrações medias de veneno (0,02 — 0,01%), o sangue conserva-se inalterado e, em concentrações mais elevadas, produz-se hemolyse.

Foram elaborados dois processos capazes de fornecer do veneno natural uma substancia de triplo effeito toxico e coagulante. Esta substancia, chamada *bothropotoxina*, é um pó de côr amarello-esverdeada, composto tão somente de C, H

e O, não contendo grupo de hydrato de carbono com poder reductor e dando, com agua ou com alcool a 50%, solutos colloidaes fortemente espumantes. Tentativas de sua crystallização não deram resultado.

Analyses do veneno natural secco revelaram que elle contém 9,704% de nitrogenio KJELDAHL, dos quaes 8,971% cabem ás proteínas coagulaveis e 0,733, a outras substancias azotadas, principalmente peptonas; albumoses não foram encontradas. A quantidade do extracto ethereo obtido pelo methodo de SOXLETH perfiez 5,296%, sendo verificada neste extracto a presença duma substancia corante alcool - e hydro-solovel, de côr castanha, a qual, tratada pelo NaOH concentrado, se separou sob forma crystallina. A quantidade de substancias mineraes não volateis perfiaz 4,437%, dos quaes, 0,179% eram constituídos por chloro.

Tentativas feitas para separar, na *bothropotoxina*, a acção toxica da coagulante deram resultados negativos.

Foi verificado que, ao contrario da secreção natural, a *bothropotoxina* não tem effeito hemolytico.

A acção coagulante da *bothropotoxina* é considerada um phenomeno complexo, resultante no minimo de dois factores, dos quaes um se manifesta na substituição do calcio e o outro, na desestabilização do fibrinogenio.

O effeito anticoagulante dos solutos mais concentrados de *bothropotoxina* pode ser considerado como resultante de uma impureza da mesma.

#### ABSTRACT

Experiments on the coagulating action of *Bothrops jararaca* venom confirmed the results obtained by certain authors in regard to oxalated blood. Nevertheless, that venom causes coagulation only when present in a low concentration (0,05% or less); in medium concentrations (0,02 — 0,01%), it keeps the blood unaltered and, in higher concentrations, it causes hemolysis.

Two processes were developped with a view to extracting a substance of toxic and coagulating effects from the venom *in natura*. This substance, called *bothropotoxin*, is a yellow-greenish powder composed only of C, H and O, and having no carbohydrate group with reducing power and forming highly foaming colloidal solutions when either water or 50% alcohol is added thereto.

Analyses of the dried venom showed it to contain 9,704% of nitrogen, of which 8,971% are represented by coagulable proteins and 0,733 by other nitrogenous substances, chiefly peptones; albumoses were not found. The amount of ethereal extract obtained by the SOXLETH method was 5,296%, the presence of a staining brown-coloured substance, alcohol - and hydro-soluble,

being disclosed, which treated by concentrated NaOH was separated in crystalline form. The amount of non-volatile mineral substances was 4,437%, of which 0,179% was made up by chlorin.

Attempts made to separate the toxic from the coagulating action of *bothropotoxin* yielded negative results. Opposite to the natural secretion, *bothropotoxin* bears no hemolytic power.

The coagulating action of *bothropotoxin* is considered a complex phenomenon, resulting at least from two factors, one of which manifests itself in the substitution of calcium and the other, in the destabilization of fibrinogen. The anti-coagulating action borne by the more concentrated solutions of *bothropotoxin* may be due to some impurity of this substance.

#### BIBLIOGRAPHIA

1. Para litteratura mais antiga, assim como dados historicos, vide: *Martin, C. J.* — Journ. of Physiol. XV:380.1893; *Houssay, B. A. & Negrete, J.* — Rev. del Inst. Bacteriol. de Buenos Aires I:341.1918; *Houssay, B. A. & Sordelli, A.* — loc. cit. I:485.1918 e II:151.1919; *Kraus, R. & Werner, Fr.* — Giftschlangen und die Serumbehandlung der Schlangenbisse (Gustav Fischer, Jena). 1931.
2. *Holden, H. F.* — Austral. Journ. Exp. Biol. and Med. XI:1.1933.
3. *Macfarlane, R. G. & Barnett, B.* — Lancet CCXXVII:985.1934.
4. *Peck, S. M.* — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. XXIX:579.1932.
5. *Peck, S. M. & Goldberger, M. A.* — Americ. Journ. of Obstetrics and Gynecol. XXV:887.1933.
6. *Barnett, B. & Macfarlane, R. G.* — Proc. Zool. Soc. Part 4:977.1934.
7. *Arthus, M.* — Arch. internat. de Physiol. XII:369.1912 e C. R. Soc. Biol. LXXXII:414.1919.
8. *Morawitz, P.* — Deutsches Archiv f. klin. Med. LXXX:340.1904.
9. *Noc, F.* — Ann. Inst. Pasteur XVIII:387.1904.
10. *Calmette, A.* — Les Venins, Masson & Cie., Paris, 1907.
11. *Faust, E. S.* — Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. LVI:236.1907.
12. *Lacerda Filho* — Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro II:1.1878.
13. *Arthus, M., Silberminz, Stawoska, B. & Rachatt, N.* — cit. por *Houssay, B. A. & Sordelli, A.* — loc. cit. I:485.1918.
14. *Brazil, V. & Rangel Pestana, B.* — Rev. Med. S. Paulo XII:375,415,439.1909.
15. *Sammartino, S.* — These de doutoramento, Escola de Vet. Buenos Aires, 1917 — cit. por *Houssay, B. A. & Sordelli, A.* — loc. cit. II:151.1919.
16. *Houssay, B. A. & Sordelli, A.* — loc. cit.
17. *Rangel Pestana, B.* — Collect. Trabs. Inst. Butantan I:63.1901-1917.
18. *Houssay, B. A. & Negrete, J.* — loc. cit.
19. *Faust, E. S.* — loc. cit. e loc. cit. LXIV:244.1911.
20. *Riedel, F.* — Wiener klin. Wschr. VII:981.1894.
21. *Willstaetter*, — Vide H. Kraut, Methoden der Adsorption u. Elution, em: *C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen III:445-485.* (G. Thieme, Leipzig). 1929.

22. Barus — Amer. J. Science III:452.1894.
23. Bechold, H. — Zschr. f. physik. Chem. LXIV:328.1908.
24. Silbereisen, K. — Zschr. f. physik. Chem. CXLIII:157.1929.
25. Csapó, J. & v. Klobusitzky, D. — Biochem. Zschr. CLVII:354.1925.

(Trabalho da Secção de Physico-química do Instituto Butantan, apresentado à Soc. de Biologia de S. Paulo, em 8-IV 1935, recebido em março de 1935, e a ser publicado em alemão *in* Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm.. Dado à publicação em setembro de 1935).

CONTRIBUIÇÃO À MATERIA MEDICA VEGETAL DO BRASIL

Estudo pharmacognóstico de *Carica papaya L.* (Caricaceae)

WALDEMAR BECHOLD