

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

II. Methodo aperfeiçoado para o preparo de Bothropotoxina

POR

D. VON KLOBUSITZKY

Ha pouco tempo, na contribuição I desta serie de artigos, descrevemos dois processos por nós elaborados para o preparo de "bothropotoxina", partindo de secreção das glandulas veneniferas da *Bothrops jararaca* (WIED), especie brasileira de serpente crotalidea (1). Haviamos originalmente reservado a Contribuição II para os resultados das analyses quantitativas da Bothropotoxina. Todavia, nesse intervallo, terminámos dois trabalhos, de collaboração com o nosso collega, dr. Paul König, sobre as propriedades immunologicas da Bothropotoxina; por isso resolvemos fazer a presente nota sobre o novo methodo, usado na obtenção daquelle producto.

A Bothropotoxina preparada pelos dois processos primitivos era tres vezes mais activa do que o veneno original. Já naquella occasião, porém, fizemos notar que nenhum dos dois methods devia ser considerado perfeito, porquanto o rendimento de um delles era muito reduzido e o do outro, muito variavel. Além d'isso, ambos os processos eram bastante complicados, de maneira a se tornar sua applicação talvez difficil na mão de outros investigadores. Todavia, o motivo principal de termos procurado um methodo melhor, foi o facto de termos agora, König e nós, conseguido insular da secreção venenosa da referida serpente uma substancia altamente coagulante, mas toxicamente inactiva (2), o que estava em contradicção com nossas experiencias anteriores, segundo as quaes existe um estreito parallelismo entre a acção coagulante e a acção toxica da Bothropotoxina. Era, portanto, necessario tentar, pela modificação do methodo de preparo, obter uma Bothropotoxina cujas propriedades estivessem de accordo com esse novo facto.

Com o tempo conseguimos elaborar um processo muito simples que, não só torna possível um rendimento maior, mas cujo producto final é 4 a 4,5 vezes mais neurotoxico, embora seja 5 vezes menos coagulante do que o veneno original, segundo verificámos pelo estudo comparativo de sua D. M. L. e de sua acção coagulante sobre o sangue equino oxalatado (1). Esse processo é o seguinte: Do veneno secco prepara-se, com NaCl a 8%, um soluto a 2%, que se deixa em seguida passar através de um papel de filtro commum. O filtrado, transparente e livre de residuos cellulares, assim obtido, é aquecido, com a maior rapidez possível, em banho-maria, agitando-se constantemente, até 60°C; addiciona-se-lhe em seguida soluto de HCl a 5% até se formarem grossos flocos de albumina: para 500 cc. do filtrado cerca de 12-14 cc. de soluto acido. Continua-se então o aquecimento até 75°C, sendo o soluto conservado durante 5' nessa temperatura. Decorrido esse tempo, o soluto é resfriado o mais rapidamente possível e filtrado na geladeira, através de filtro de pregas. Por meio desta coagulação pelo calor são afastados todos os corpos albuminosos typicos, de maneira que se torna superflua uma segunda precipitação — conforme anteriormente se fazia com soluto de hydroxydo de ferro colloidal e que por vezes occasionava grandes perdas de substancia activa.

Ao filtrado agora livre de albumina, porém contendo productos de decomposição de proteínas, addiciona-se soluto de N/1 NaOH de maneira que a reacção fique apenas ligeiramente acida. O precipitado, que acarretou consideravel quantidade de substancia activa, é lavado no refrigeratorio com alcool absoluto e em seguida (ainda no refrigeratorio) deixado em repouso no vacuo. Após 24 horas, o residuo, cuja maior parte é representada por corpos albuminosos desnaturados, é lavada com pouca agua (a 1/10 de volume inicial do soluto) a 37°C e filtrado na geladeira. Este segundo filtrado, que é tambem livre de albumina, é addicionado ao primeiro. Quando se quer immediatamente continuar o trabalho, acrescenta-se ao filtrado total cinco vezes seu volume de alcool ethylico absoluto e deixa-se o precipitado depositar durante a noite na geladeira. Quando não se faz empenho de continuar logo o trabalho, o filtrado é reduzido a 1/5-1/8 do volume primitivo por meio de ultrafiltração, porém, será preciso notar que o diametro dos poros maximos deve ser inferior a 330 μ (1). Terminada a ultrafiltração, a membrana do ultrafiltro deve ser fragmentada e bem lavada com agua a 37°, addicionando-se então essa agua da lavagem ao ultrafiltrado, que é novamente accrescido de 5-6 vezes seu volume de alcool e deixado por 24 horas na geladeira.

Esta primeira precipitação pelo alcool constitue um aperfeiçoamento essencial relativamente ao processo antigo. Enquanto pelos methodos anteriores as substancias existentes no filtrado e com reacção de biureto positiva tinham de ser removidas por meio de uma cautelosa precipitação com soluto de acido metaphosphorico a 10%, com este processo ellas se conservam dissolvidas. A gran-

de vantagem dessa modificação evidencia-se principalmente quando se trabalha pelo processo rapido.

O deposito formado pela precipitação com alcool, que, além de outras substancias, contém "bothropotoxina", é dialysado e electro-dialysado, conforme ficou dito na descripção dos processos anteriores. Terminada a electro-dialyse, o soluto de Bothropotoxina é filtrado através de papel. O soluto puro, assim obtido, é então collocado no tubo centrifugador, adicionado do quintuplo de seu volume de alcool e centrifugado; despeja-se a seguir alcool ethylico e dissolve-se a Bothropotoxina na menor quantidade possivel de agua, afim de se poder depois precipitar novamente com alcool. Este processo é repetido pelo menos tres vezes. Após a ultima centrifugação, o precipitado é deshydratado, no secador, no vacuo e sobre H_2SO_4 . Como consecuencia da repetida precipitação com alcool o peso constante é attingido em 48 horas. Rendimento: pouco superior a 10%.

A substancia secca, assim obtida, apresenta-se tambem em forma de pequenas plaquetas amarello-esverdeadas, iguaes ás que se obtinham pelos methodos anteriormente descriptos, e, como estas, livres de azoto, halogeneos, phosphoro e ferro. A D. M. L. do veneno original de *stock* era de 0,26-0,27 mgm., para o pombo adulto por via venosa, ao passo que a da Bothropotoxina preparada pelo methodo novo é de 0,055-0,060 mgm. Sua acção coagulante é consideravelmente inferior á do veneno original: a dose minima letal deste ultimo coagula em 4 minutos 5 cc. do sangue equino oxalatado, enquanto a da Bothropotoxina produz o mesmo effeito em 20 minutos.

Devemos, finalmente, accentuar que este methodo só fornece bons resultados quando, na coagulação pelo calor, se toma o especial cuidado de fazer um aquecimento rapido. Si o aquecimento fôr executado lentamente ou si a desproteinização for feita de um modo incompleto por algum motivo, como, por exemplo, sob um pH muito alto ou muito baixo, não se poderá obter pelo methodo descripto um precipitado alcoolico isento de nitrogenio, tornando-se, assim, indispensavel a desvantajosa flocculação já mencionada, pelo acido metaphosphorico.

RESUMO

Descreve-se uma modificação dos dois processos anteriormente publicados para o preparo de Bothropotoxina, partindo-se do veneno secco, de *stock*, da especie *Bothrops jararaca* (WIED). Segundo se queira trabalhar rapidamente ou se deseje proceder com vagar, esta nova technica offerece duas variações, qualquer das quaes dá maior rendimento do que os processos anteriores; além disso, a Bothropotoxina por ella obtida é quatro vezes e meia mais toxica e cinco vezes menos coagulante, do que o veneno inicial.

ABSTRACT

A modification is described of the two previously developed processes for the preparation of Bothropotoxin from ordinary dried venom of *Bothrops jararaca* (WIED). The new technic which offers two variations, one for rapid and the other for slow results, gives a higher yield than either one of the previous processes, the Bothropotoxin obtained thereby being 4,5 times more toxic and 5 times less coagulating than the original poison.

BIBLIOGRAPHIA

1. von Klobusitzky, D. — Mem. Inst. Butantan IX: 259. 1935 et Arch. f. exp. Path. u. Pharm. CLXXIX: 204. 1935.
2. von Klobusitzky, D. & König, P. — Mem. Inst. Butantan X:223. 1936 et Arch. f. exp. Path. u. Pharm. CLXXXI: 387. 1936.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan, recebido em dezembro de 1935 e publicado em alemão in Arch. f. exp. Path. u. Pharm. CLXXX: 479. 1936. Dado á publicidade em maio de 1937).