

SOBRE A FIXAÇÃO ESPECIFICA DA BOTHROPOTOXINA

I. Fixação por diversos antivenenos

POR

D. VON KLOBUSITZKY & P. KÖNIG

Um dos problemas fundamentaes de Immunologia, ainda carente de solução, é representado pela classificação que devem receber os venenos animaes, quando chimicamente purificados e livres de substancias biureticas. Devem ou não taes venenos ser considerados como verdadeiras toxinas? Nenhum dos principios activos de peçonhas animaes e preparadas em estado mais ou menos puro, taes como o Veneno de abelha (1,2), a Ophiotoxina (3), a Crotalotoxina (4), a Bufagina (5), a Bufotoxina (6), a Epeiratoxina (7), o Veneno escorpionico (8), a Arenobufagina, a Cinobufagina, a Marinobufagina, a Areno-Bufotoxina, a Cino-Bufotoxina, a Vulgaro-Bufotoxina, a Areno-Bufotenina (9,10), foi até agora analysado do ponto de vista de suas propriedades immunologicas, de sorte que seu character de toxina é posto em duvida por grande numero de pesquisadores (11,12). Já se conhece uma serie de reacções sorologicas, nas quaes um dos reagentes é constituído por substancias bem definidas e até livres de nitrogenio, como no caso das polysaccharidas e esterinas, de maneira que se poderia suppor que os venenos animaes purificados fossem dotados de propriedades antigenicas. Disso faltava, porém, até agora a confirmação experimental.

Ultimamente, um de nós (D. v. K.) se occupou da preparação, em estado puro, da substancia toxica contida na secreção das glandulas de uma especie de serpente brasileira, a *Bothrops jararaca* (WIED), tendo conseguido insular-lhe o principio activo, livre de N e com acção toxica constante (13,14). Essa substancia, que foi denominada Bothropotoxina, é um veneno typico do systema nervoso central. Injectada em pombos, de 300-400 grs. de peso, por via venosa, na dose de 0,08 mgms., manifesta sua acção approximadamente da seguinte manei-

ra (*): durante os primeiros 5-6 minutos, o animal dá a impressão de estar perfeitamente normal, observando-se no maximo rythmo respiratorio algo acelerado e menor disposição aos movimentos; depois desse prazo, occorrem, em toda a musculatura, algumas contracções clonicas que logo se transformam em tonicis; ao mesmo tempo, o animal cahe de costas e fica, durante um curto periodo, em decubito dorsal, com a cabeça apoiada ao solo, completamente immovevel; finalmente, após alguns accessos espasmodicos que se succedem rapidamente, conservando o animal a posição descripta, a morte sobrevém em poucos segundos, occasionada por paralysis do centro respiratorio. Todos esses ultimos symptomas de intoxicação, desde o primeiro espasmo até o momento da morte, duram apenas cerca de 3 minutos; o menor espaço de tempo que observámos entre a injecção e a morte foi de 8 minutos e o mais longo, de 9 minutos. Além dessa particularidade neurotoxica, a Bothropotoxina, tanto quanto se pode verificar á luz das pesquisas feitas até o presente, manifesta ainda uma acção coagulante muito fraca, a lembrar a do veneno original, o que, por varias razões, attribuímos a pequenas impurezas ainda ligadas á Bothropotoxina.

Resumiremos aqui, brevemente, os principaes pontos de nossas verificações: 1) Da secreção das glandulas venenosas conseguimos insular uma substancia altamente coagulante, mas relativamente inactiva do ponto de vista toxicologico (15); 2) 0,1 mgm. do veneno original empregado no preparo da Bothropotoxina fez coagular 5 cc. de sangue oxalatado equino dentro de 7 minutos, enquanto a mesma quantidade de Bothropotoxina só produziu a coagulação depois de 15 minutos; 3) calculando-se a acção coagulante em relação á dose minima letal (D. M. L.), que é definida no Instituto Butantan como a quantidade justamente sufficiente para matar, por via intravenosa, um pombo adulto em 20 minutos, obtem-se para o veneno integral o indice de 4 minutos e para a Bothropotoxina o de 20 minutos; 4) a Bothropotoxina, contrariamente á secreção glandular natural, não possui propriedades anti-coagulantes, nem hemolyticas (13).

Ha, portanto, toda razão para se considerar a Bothropotoxina uma substancia homogenea e especifica, do ponto de vista *toxicologico*.

Sob o ponto de vista chimico, a pureza da Bothropotoxina, conforme se depreheende dos nossos trabalhos anteriormente citados, não chegou ainda a um ponto satisfactorio. Todavia, os processos por nós empregados até agora para sua decomposição ou subsequente purificação forneceram apenas principios atoxicos, o que nos levou a atacar o problema por um outro prisma, pesquisando suas propriedades antigenicas. Trataremos aqui da sua fixação pelo antiveneno bothropico monovalente, antiveneno crotalico sul-americano e antiveneno elapinico bivalente.

(*) A acção physiologica e pharmacologica exacta da Bothropotoxina será publicada mais tarde, depois de investigada convenientemente em outra Secção do Instituto.

I. Methodo

A Bothropotoxina, quatro vezes precipitada com alcool ethylico, foi usada em soluto a 0,1%. A D. M. L. foi, em todos os casos, de 0,06 cc., isto é, 0,06 mgm. As experiencias de fixação foram feitas, ora *in vitro*, ora *in vivo*. Nas experiencias *in vitro* misturavam-se primeiro determinadas quantidades desse soluto com quantidades differentes do respectivo antiveneno ophidico; as misturas, após repouso de meia hora na estufa a 37°, eram injectadas em pombos, na veia axillar. As experiencias *in vivo* com antiveneno bothropico eram executadas de dois modos, injectando-se, em qualquer caso, o antiveneno, ou por via subcutanea, ou por via intramuscular. Assim é que, em um caso (Typo I), se injectava ao animal uma quantidade seguramente mortal, retardando-se a administração do antiveneno até o inicio da segunda phase dos symptomas de envenenamento, isto é, até que o animal tomasse o decubito dorsal. No outro caso (Typo II), a injectão do antiveneno era feita immediatamente após a injectão da toxina.

Nas experiencias com antiveneno crotalico, além desses dois casos, foram feitas experiencias nas quaes a injectão do antiveneno se praticava por via venosa. Para isso misturava-se o antiveneno com o soluto de Bothropotoxina na seringa ou então injectava-se o antiveneno numa veia axillar, e, immediatamente depois, o soluto de Bothropotoxina, na outra.

Nas experiencias com o antiveneno elapinico, por terem sido todas de resultado negativo, limitámo-nos a fazer ensaios *in vitro*.

Os antivenenos empregados foram preparados no Instituto de accordo com o methodo em uso (16,17) e depois de verificada sua actividade. Dos antivenenos bothropicos monovalentes empregados, cada cc. neutralizava 3,8, 2,4 e 2,2 mgm., respectivamente, de veneno padrão da Jararaca (*Bothrops jararaca*); do antiveneno crotalico cada cc. neutralizava 0,9 mgm. do veneno padrão da cascavel sul-americana (*Crotalus terrificus terrificus*); do antiveneno elapinico bivalente, cada cc. neutralizava 0,15 mgm. do veneno de *Micrurus corallinus* e 0,25 mgm. do de *Micrurus frontalis*.

II. Experimentação

QUADRO I

1) *Experiências com antiveneno bothropico*a) *Experiências in vitro*

Quantidade de Bothropotoxina	Volume do anti-veneno	Capacidade de fixação do antiveneno, calculada para o veneno padrão.	Evolução.
0,08mgm.	0,1cc.	0,38mgm.	Nenhum symptoma
0,10	0,1	0,22	Nenhum symptoma
0,15	0,1	0,22	Morte após 13 minutos
0,15	0,1	0,24	Morte após 15 minutos
0,20	0,1	0,22	Morte após 9 minutos

b) *Experiências in vivo*

0,08mgm.	1,0cc. (injecção retardada)	0,48mgm.	O pombo melhorou aos poucos. 1 hora após a injecção estava completamente restabelecido.
0,08mgm.	1,0cc. (injecção immediata)	0,48mgm.	Nenhum symptoma

2) *Experiências com antiveneno crotalico*a) *Experiências in vitro*

0,08mgm	0,3cc.	0,27mgm.	Nenhum symptoma
0,10	1,0	0,90	Nenhum symptoma
0,20	0,3	0,27	Morte após 9 minutos

b) *Experiências in vivo*

Antiveneno por via subcutanea

0,11mgm.	0,5cc. (injecção retardada)	0,45mgm.	Melhoras passageiras. Morte após 14 minutos
0,11mgm.	0,5cc. (injecção immediata)	0,45	Primeiros symptomas de intoxicação após 8 minutos. Morte após outros 4 minutos.

Antiveneno por via intravenosa

*Mistura feita
na seringa*

0,12mgm.	0,5cc.	0,45mgm.	Nenhum symptoma
0,13	0,4	0,36	Nenhum symptoma
0,12	0,25	0,225	Após 6 minutos, symptomas de intoxicação; após outros 4 minutos, o pombo tomava a posição dorsal, com os olhos fechados, porém restabeleceu-se aos poucos e 1 ½ hora depois estava perfeitamente normal.

*Injecções
separadas*

0,12mgm.	0,5cc.	0,45mgm.	Nenhum symptoma
0,10	0,25	0,225	Nenhum symptoma
0,15	0,25	0,225	Morte em 10 minutos.

3) *Experiencias com antiveneno elapínico*

0,10mgm.	1,0cc.	0,15 e 0,25mgm.	Morte em 4 minutos.
0,10	2,0cc.	0,30 e 0,50mgm.	Morte em 4 minutos.

III. **Discussão dos resultados**

Antes de entrar na analyse dos resultados, parece-nos necessario dizer alguma cousa sobre a differença existente entre a toxicidez da Bothropotoxina e a do veneno que é usado para a immunização e titulação dos antivenenos. A D. M. L. do veneno secco padrão de *Bothrops jararaca*, conservado no vacuo, ao abrigo da luz e da humidade, é geralmente de 0,020 mgm., ao passo que a D. M. L. do veneno secco commum chega a baixar de 0,6 mgm., esse veneno guardado em *stock*, sem maiores precauções, é usado só como antigeno na immunização de cavallos.

A D. M. L. da Bothropotoxina era, conforme dissémos, de 0,06 mgm., o veneno usado no preparo da Bothropotoxina tinha uma D. M. L. de 0,26-0,27 mgm., de sorte que a Bothropotoxina, em relação áquelle, era quatro a quatro vezes e meia mais activa, possuindo, porém, menos de um decimo da actividade do veneno padrão normal. As analyses da secreção glandular (13,18) mostram que a substancia toxica pode constituir no maximo 32,16%, portanto 1/3 do residuo secco, sendo preciso admittir que a D. M. L. do veneno padrão contenha cerca de 0,007 mgm. e a do veneno empregado no preparo da Bothropotoxina, cerca de 0,09 mgm. de substancia toxica. Theoricamente, a D. M. L. da Bothropotoxina deveria, portanto, ser de 0,09 mgm., porém ella é de facto 33% me-

nor. As possiveis causas desta divergencia, bem como a circumstancia de as intoxicações produzidas pelo veneno natural e pela Bothropotoxina apresentarem caracteres differentes, talvez por não estarem em relação directa com a fixação antigenica da Bothropotoxina, serão discutidos opportunamente (18). Apenas devemos resaltar, no momento, que a administração do veneno natural provoca, como symptoma inicial caracteristico, o vomito, que não se manifesta com a injeção de Bothropotoxina. A causa de diminuir com o tempo a toxicidez da secreção glandular por enquanto ainda não está esclarecida. Baseados em nossas experiencias sobre a acção de uma atmospheria de oxygenio (15,18), podemos affirmar que pelo menos a oxydação é responsavel por esse phenomeno. É preciso verificar-se ainda si a secreção glandular fresca não deve talvez seu maior effeito toxico a um synergismo, por parte de differentes substancias, algumas das quaes (taes como certos corpos albuminosos) são atoxicas ou pouco toxicas.

Do ponto de vista da fixação da Bothropotoxina pelos antivenenos, porém, é inteiramente indifferente que estes tenham sido preparados por immunização com uma Bothropotoxina muito ou pouco activa. Sua capacidade de fixação, calculada *para a quantidade* da Bothropotoxina, deve ser a mesma, porquanto se trata de uma substancia chimica altamente purificada e não de um complexo de substancias indefinidas e de composição variavel, como se dá com as toxinas bacterianas.

De accordo com esse raciocinio, devemos calcular a capacidade de fixação dos antivenenos segundo a quantidade de Bothropotoxina e não segundo o numero de DD.MM.LL. que possam neutralizar. Como base para as considerações a seguir estabelecemos os seguintes dados: a D.M.L. da Bothropotoxina é igual a 0,06 mgm.; a capacidade de fixação do antiveneno para com a Bothropotoxina é igual a 1/3 do seu valor em relação ao veneno natural.

Em relação ao antiveneno bothropico, as experiencias, tanto *in vitro* como *in vivo*, indicam claramente que a Bothropotoxina é por este antiveneno fixada da mesma maneira que o veneno natural da *Bothrops jararaca*. Podemos tambem reunir os dados das experiencias feitas *in vitro*, no seguinte:

QUADRO II

Quantidade de Bothropotoxina injectada	Quantidade de Bothropotoxina que permaneceu livre.	Quantidade de Bothropotoxina fixada pelo antiveneno bothropico	Evolução
0,08mgm.	0,00mgm.	0,13mgm.	Nenhum symptoma
0,10	0,03	0,07	Nenhum symptoma
0,15	0,08	0,07	Morte após 13 minutos
0,15	0,07	0,08	Morte após 15 minutos
0,20	0,13	0,07	Morte após 9 minutos

Os dados do quadro acima evidenciam que em todos os casos em que a quantidade de Bothropotoxina não fixada pelo antiveneno era inferior á D. M. L. não houve também symptomas de intoxicação, ao passo que, nos casos em que a quantidade de Bothropotoxina livre ultrapassava a D.M.L., os animais succumbiram, depois de terem apresentado graves symptomas característicos de intoxicação.

Igualmente convincentes são os resultados das experiencias *in vivo*. É desnecessario mencionar que, no caso da injeção subcutanea, a quantidade de antiveneno injectada foi maior do que a exigida para a fixação da quantidade letal de Bothropotoxina, visto como as condições relativamente precarias e lentas de absorção do soro tornam indispensavel esse excesso. Entretanto, verificámos boa e incondicional fixação em todos os casos, sem excepção mesmo daquelles em que se fez a injeção retardada de soro.

Os resultados que obtivemos com o antiveneno crotalico, ao contrario, differem de accordo com o modo de administração do especifico. Admittindo também para o veneno da cascavel que apenas 1/3 da substancia secca seja toxicologicamente activa e calculando a capacidade de fixação do soro da mesma maneira que no caso do antiveneno bothropico, resultam os seguintes dados:

QUADRO III

a) Experiencias *in vitro*

Quantidade de Bothropotoxina injectada	Quantidade de Bothropotoxina que permaneceu livre	Quantidade de Bothropotoxina fixada pelo antiveneno crotalico	Evolução
0,08mgm.	0,00mgm.	0,09mgm.	Nenhum symptoma
0,20	0,11	0,09	Morte após 9 minutos

b) Experiencias *in vivo*, injeção do antiveneno por via intravenosa.

Mistura na seringa:

0,12mgm.	0,00mgm.	0,15mgm.	Nenhum symptoma
0,13	0,00	0,13	Nenhum symptoma
0,12	0,045	0,075	Symptomas graves, restabeleceu-se depois.

Injecções separadas

0,12mgm.	0,00mgm.	0,15mgm.	Nenhum symptoma
0,12	0,045	0,075	Nenhum symptoma
0,15	0,075	0,075	Morte após 10 minutos.

Nesse quadro foram omitidos os casos em que o antiveneno foi administrado por via subcutanea ou intramuscular, pois nesses o resultado foi sempre negativo. Em algumas experiencias com injeção retardada do soro, observámos uma accentuada melhora após a administração do antiveneno, porém o estado do animal logo se aggravava de novo, sobrevindo finalmente a morte.

Em opposição a estas, que tiveram resultado negativo, todas as experiencias, tanto *in vitro* como *in vivo*, em que o antiveneno crotalico foi injectado por via intravenosa, deram resultados perfeitamente de accordo com os obtidos com a applicação do antiveneno bothropico. Só observámos divergencia nos casos em que o antiveneno crotalico era administrado durante a segunda phase dos symptomas de intoxicação, pois nesses o soro, mesmo dado por via intravenosa, só conseguiu retardar, mas nunca evitar a morte.

Brazil (19) já observara que o antiveneno de cascavel neutralizava parcialmente o veneno da *Bothrops jararaca*. Tendo calculado a capacidade de fixação dos antivenenos na base da D.M.L. dos venenos naturaes, chegou ás seguintes conclusões: um antiveneno crotalico que por cc. neutraliza 0,6mgm., portanto 600 D.M.L. do veneno crotalico, pode fixar 0,06mgm., isto é, 3 D.M.L. do veneno da *Bothrops jararaca* (*).

Em outras palavras, o antiveneno crotalico mostrou-se, segundo esse calculo, 200 vezes menos activo em relação ao veneno bothropico do que em relação ao crotalico. Como acima demonstrámos, porém, seria inteiramente errado applicar o mesmo calculo á Bothropotoxina, pois neste caso só pode servir de base a quantidade de substancia toxica existente no veneno. Si o factor determinativo fosse a D.M.L. do veneno natural empregado para titulação, o antiveneno bothropico deveria ter fixado uma quantidade muito maior da Bothropotoxina. Afim de podermos comparar os nossos resultados com os publicados por Brazil, devemos fazer a conversão ponderal de seus dados. Verifica-se, assim, que 1 cc. de antiveneno crotalico neutraliza 0,02mgm. da fracção toxica do veneno de *Bothrops jararaca*, contra 0,2mgm. da fracção toxica da peçonha de *Crotalus terrificus*, o que mostra ser o antiveneno crotalico em relação ao veneno bothropico apenas 10 e não 200 vezes menos activo. Ao contrario, os resultados por nós obtidos com a Bothropotoxina demonstram que o antiveneno crotalico, *in vitro* e por via intravenosa, é capaz de neutralizar o mesmo peso de Bothropotoxina que o antiveneno bothropico *in vivo*.

Explicamos este facto, bem como a circumstancia de ser a acção do antiveneno crotalico *in vivo*, por via intramuscular ou subcutanea, muito mais fraca do que a do antiveneno bothropico, admittindo a existencia de uma estreita relação chimica entre a Bothropotoxina e o principio letifero (neurotoxico) do veneno crotalico. Já as analyses summarias feitas por Faust em relação á

(*) Nas experiencias de Brazil a D. M. L. do veneno de *Bothrops jararaca* era igual a 0,018 mgm.; a do veneno de *Crotalus terrificus* era igual a 0,001 mgm.

Ophiotoxina e á Crotalotoxina mostraram que esses venenos devem ser quimicamente affins. Essas experiencias evidenciam a grande probabilidade de a Ophiotoxina e Crotalotoxina só se distinguirem uma da outra pela circumstancia de conter a ultima 1/2 Mol. de agua a mais do que a primeira. Imaginamos a estructura chimica da Bothropotoxina e da substancia toxica do veneno crotalico como si seus nucleos sejam identicos.

Essa hypothese sobre a existencia de uma affinidade chimica é apoiada pelo caracter neurotoxico de ambas as substancias. Além disso, cumpre notar que, em relação ao modo de agir em grandes doses, a Bothropotoxina parece approximar-se muito mais do veneno da cascavel do que do veneno da jararaca. Injectando-se uma quantidade superior, p. ex. 10 a 15 vezes, á D.M.L. dos venenos naturaes de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus*, verifica-se que o veneno da primeira mata instantaneamente, isto é, em poucos segundos, ao passo que o da outra especie só manifesta sua acção toxica decorridos 10-15 minutos. A Bothropotoxina está, neste particular, entre esses dois extremos, porquanto na dóse de 1,2mgm. (isto é, vinte vezes a D.M.L.) só produz a morte depois de 3 minutos.

Em relação á constituição da Bothropotoxina por ora só podemos adiantar que ella contém um ou varios grupos de COOH, os quaes podem facilmente ser methylizados (18). A Bothropotoxina methylizada dá reacção neutra e, do ponto de vista toxicologico, é completamente inactiva. Admittindo-se que de facto exista, como acima dissemos, uma affinidade chimica entre a Bothropotoxina e a substancia toxica do veneno crotalico, é facil imaginar-se que os anticorpos especificos, isto é, aquelles que reagem só com essas substancias toxicas em condições favoraveis, taes como nas experiencias *in vitro* e na applicação intravenosa, apresentam igualmente capacidade de fixação em relação a ambos.

O antiveneno elapínico polyvalente mostrou-se absolutamente inactivo. Esta circumstancia indicaria que o principio toxico dos venenos elapínicos, do ponto de vista chimico, se afastaria mais das substancias toxicas da Bothropotoxina e do veneno crotalico, apesar de terem acção toxica algo semelhante, embora com affinidade para o systema nervoso sympathico, segundo se deprehe de das diversas publicações feitas por outros technicos do Instituto Butantan (20). Esta hypothese provavelmente, tão cedo não terá confirmação, visto não dispormos de *stock* de veneno elapínico sufficiente para fins de preparação e analyses, dada a minima productividade das glandulas veneniferas das *Elapideas* locaes. A differença chimica existente entre os venenos elapínicos, a Bothropotoxina e a substancia toxica do veneno crotalico, estaria, de resto, de accordo com a disposição desses tres grupos de serpentes na Zoologia, pois tanto *Bothrops*, como *Crotalus* são generos solenoglyphos e pertencem á Familia *Crotalidae*, ao passo que *Micrurus* (syn. *Elaps*) é proteroglypho e faz parte da Familia *Elapidae*.

Investigamos presentemente si a Bothropotoxina tem ou não propriedades antigenicas, produzindo antitoxina especifica.

RESUMO

As experiencias nas quaes se investigou a fixação da Bothropotoxina pelos antivenenos monovalentes bothropico e crotalico e pelo bivalente elapinico permitem as seguintes conclusões:

1. O antiveneno bothropico neutraliza a Bothropotoxina, tanto *in vitro* como *in vivo* por via intravenosa, intramuscular ou subcutanea, proporcionalmente ao peso.

2. O antiveneno de cascavel sul-americana neutraliza a Bothropotoxina tambem *in vitro*, em proporção com o peso.

3. O mesmo antiveneno só neutraliza a Bothropotoxina *in vivo*, proporcionalmente ao peso, quando administrado por via intravenosa.

4. O antiveneno elapinico não revelou capacidade fixadora relativamente á Bothropotoxina.

A' luz desses resultados communicados é provavel que haja certa affinidade chimica entre a Bothropotoxina e a substancia toxica do veneno de cascavel.

ABSTRACT

The following conclusions may be drawn from the experiments in which there was investigated the fixation of Bothropotoxin by the bothropic, crotalic and elapinic antivenins:

1. Bothropotoxin is neutralized, either *in vitro*, or *in vivo*, proportionately to the weight by the specific bothropic antivenin by the intravenous, intramuscular and subcutaneous channels.

2. It is also neutralized *in vitro* proportionately to the weight by the South American crotalic antivenin; *in vitro* it is neutralized only when that antivenin is given intravenously.

3. In the light of these experiments it appears that Bothropotoxin is somehow related to the toxic principle of the rattlesnake venom.

BIBLIOGRAPHIA

1. Langer, J. — Arch. exp. Pathol. Pharmakol. XXXVIII: 381. 1897.
2. Flyry, F. — Loc. cit. LXXXV: 319. 1920.
3. Faust, E. S. — Loc. cit. LVI: 236. 1907.
4. Faust, E. S. — Loc. cit. LXIV: 244. 1911.
5. Abel, J. J. & Macht, D. I. — Pharm. Exp. Ther., III: 319. 1911.
6. Wieland, H. & Weil, F. J. — Ber. deutsch. Chem. Ges., XLVI: 3315. 1913.
7. Walbum, L. E. — Zschr. f. Immunitätsf. XXIII: 565, 623. 1915.

8. Flury, F. — Arch. exp. Pathol. Pharmacol. XCVI: 1923. Supplemento.
9. Chen, K. K., Jensen, H. & Chen, A. L. — Pharm. Exp. Ther. XLIX: 1. 1933.
10. Chen, K. K. & Chen, A. L. — Loc. cit. XLIX: 516. 1933.
11. Kraus, R. & Werner, Fr. — Giftschlangen und die Serumbehandlung der Schlangenbisse, pag. 124-125. G. Fischer, Jena, 1931.
12. Sachs, H. — in Kolle und Wassermann, Hbuch der pathog. Mikroorganismen, III: 84, G. Fischer Jena & Urban & Schwarzenberg, Berlin-Wien, 1931.
13. von Klobusitzky, D. — Mem. Inst. Butantan IX: 259. 1935. et Arch. exp. Pathol. Pharmacol., CLXXIX: 204. 1935.
14. von Klobusitzky, D. — Mem. Inst. Butantan X: 201. 1936 et Arch. exp. Pathol. Pharmacol. CLXXX: 479. 1936.
15. von Klobusitzky, D. & König, P. — Mem. Inst. Butantan X: 223. 1936 et Arch. exp. Pathol. Pharmacol. CLXXXI: 387. 1936.
16. Brazil, V. — Rev. Med. de São Paulo — XII: 301. 1909
17. Amaral, A. do — Collect. Trab. Inst. Butantan, II: 85 (1918) 1927.
18. von Klobusitzky, D. & König, P. — Mem. Inst. Butantan et Arch. exp. Pathol. Pharmacol. (a ser publicado).
19. Brazil, V. — Rev. Med. de São Paulo — X: 457. 1907.
20. Brazil, V. & Pestana, R. Rangel — Rev. Med. de São Paulo — XII: 375, 415, 439, 1909. Amaral, A. do — Contrib. Harvard Inst. Trop. Biology & Med. II: 16. 1925 et in Jordan & Falk — The Newer Knowledge of Bacteriol. & Immunol.: 1071. Chicago University Press. 1928.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan recebido em dezembro de 1935 e publicado em alemão in Zschr. f. Immunitätsforsch. LXXXVII: 202. 1936. Dado á publicidade em maio de 1937).