612.31412:615.94:598.122

ESTUDOS QUIMICOS SOBRE OS VENENOS OFIDICOS

5. Determinação quantitativa dos componentes que contêm enxofre

POR

C. H. SLOTTA & W. FORSTER

Como já haviamos provado na segunda comunicação dessa nossa serie (1), uma parte do enxofre contido nos venenos ofidicos se apresenta em forma de pontes -S-S- e que são de capital importancia na atividade dos venenos. Interessava saber agora, depois de conseguida (2) a apresentação pura do veneno da cobra Cascavel (*Crotalus t. terrificus*), quais os componentes sulfurados que estivessem nele contido. No estudo que se segue, podemos demonstrar em que proporção o enxofre do veneno é distribuido entre os diversos amino-acidos com enxofre dessa proteina. Hidrolizamos Crotoxina amorta (2) com uma mistura (3) de acido clorídrico e acido formico, afim de determinar as substancias de teor de enxofre contidas no hidrolizado.

Primeiramente, examinámos o teor de cistina (-S-S-) dos hidrolizados da Crotoxina pelo metodo mencionado por Sullivan (4) por ser a cistina (-S-S-) o amino-acido sulfurado que geralmente ocorre. Êsse metodo compreende somente o amino-acido livre e não quando se acha ligado em peptidas nem os seus homologos. Com o emprego desse metodo foram apurados 13,1% de cistina (-S-S-), i. é, 87,5% do enxofre total que se eleva na Crotoxina a 4,0%. Surgiu, então, a questão quais seriam os demais componentes com enxofre que ainda existem no veneno e, para sua resolução, fizemos a seguinte preponderação, que se torna mais compreensivel por meio da seguinte tabela:

São apreendidos	por meio dos metodos de			
	Folin	Sullivan	Baernstein	
			1.ª titulação	2.ª t.
1) Cistina (-S-S-)	sim	sim	sim	não
2) Outros amino-acidos com ligação (-S-S-)	sim	não	sim	não
3) Metionina	não	não	não	sim
4) Outros amino-acidos substituidos no atomo de enxofre	não	não	sim	não
5) *Tiolactonas*	sim	não	não	sim

Enquanto o metodo de Sullivan, como anteriormente dito, só responde à cistina (-S-S-), o metodo de Folin (5), tambem muito usado, abrange ainda sistemas disulfatos-tiões. Em nosso caso, encontrámos, por meio desse metodo 13,3% de cistina (-S-S), quer dizer, no limite de erro a mesma quantidade que é achada pelo metodo de Sullivan; daí sobresai que na Crotoxina não existem outras ligações -S-S- além da cistina (-S-S-). Tambem si o enxofre aparecesse em uma ligação completamente nova a quimica das proteinas, como tiolactona, êle seria apurado pelo metodo de Folin, mas não pelo de Sullivan, de modo que se pode tambem excluir esta possibilidade, em vista desses dois teores serem praticamente iguais.

A subsequente suposição mais provavel era que, além da cistina (-S-S-) existisse ainda na Crotoxina a metionina, $CH_3.S.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH$. Para determinar isso, pudemos, de acôrdo com o metodo de Baernstein (6), proceder como segue: hidroliza-se a proteina como acido iodídrico, pelo que o grupo metila se separa do enxofre, podendo ser determinado quantitativamente. No hidrolizado, a cisteina (-SH), produzida pela ação redutora do acido iodídrico da cistina (-S-S-), permite a titulação com biodato de potassio, enquanto que a homocisteina formada da metionina, forma nesse soluto acido um anel tiolactonico, que somente se desfaz em um soluto fracamente alcalino. Alcalinizando-se, pois, com amoniaco sob certas precauções tecnicas, obtem-se o sal de homocisteina com grupo -SH livre, que combina com outro igual por dehidrogenação, formando uma ponte -S-S-, o que se produz pela adição de quantidade medida de tetrationato. Pela titulação com biodato obtem-se o tiosulfato assim formado, do que resulta com grande exatidão a quantidade de metionina no soluto de metionina empregada, 9,10 mgs.. Recuperamos, assim, em provas em branco, p. ex. de 9,15 mgs.. Essa determinação volumetrica da metionina parece-nos muito mais precisa para pequenas quantidades de proteina do que a determinação do iodeto de metila formado pela ação do acido iodídrico, com o qual diversas vezes, por exemplo no caso da insulina cristalizada, obtivemos teores por demais altos. Determinámos, por este motivo, com o metodo de titulação de

Baernstein, não só cistina (-S-S-) como tambem a metionina e encontrámos para cistina (-S-S-) 13,2, isto é, o mesmo valor como com os metodos de Sullivan e Folin. Para a metionina resultou 1,36%, o que correponde a 7,3% do enxofre na Grotoxina. Qualquer outros amino-acidos substituidos no enxofre e ainda desconhecidos, mas em todo o caso imaginaveis, teriam sido encontrados com a cistina (-S-S-), si aplicadas as condições de experiencia de Baernstein. Pois, somente a posição δ do enxofre na metionina permite a formação da cadeia tiolactonica e, possibilitando assim a determinação separada da metionina ao lado da cistina (-S-S-).

Outrossim, pode deduzir-se o seguinte: do teor da metionina que, com muita precisão, se pode determinar na Crotoxina, resulta um peso molecular minimo de 11.000; pelas determinações do peso molecular de proteinas feitas por Svedberg é muito provavel que êsse teor multiplicado por 3 ou por 6, represente o verdadeiro peso molecular da Crotoxina. Calculando-se, entretanto, com o peso molecular minimo de 33.000, o enxofre esclarecido se distribúi na proporção de 18 restos de cistina (-S-S-), para 3 de metionina. Essas cifras permitem sua subordinação, sem obrigatoriedade, as cifras fundamentais deduzidas por M. Bergmann (7) dos estudos da periodicidade de amino-acidos em proteinas, isso é nesse caso $18 = 2^1 \times 3^2 : 3 = 2^0 \times 3^1$.

Tendo, porém, a molecula de Crotoxina o peso molecular de 33.000, resulta do teor de enxofre, determinado com exatidão, de 4,0% um teor de 41 atomos de enxofre, dos quais 36 + 3 existem como cistina (-S-S-) e metionina. A analise, ainda a ser mencionada, dos componentes contendo enxofre, de um outro veneno, nos mostrou que não ha decomposição pelo metodo de hidrolise de Baernstein e que os teores de cistina (-S-S-) mais metionina, assim esclarecidos, podem corresponder, plenamente, ao teor de enxofre da analise de combustão. Tendemos, por isso, mais para a opinião que ainda existam, entre os 41 atomos de enxofre da Crotoxina, 2 em uma ligação que ainda não foi possivel reconhecer. Entretanto, deve-se salientar que aqui não se trata de um outro composto com ligação -S-S- ou -SH, nem de uma tiolactoma e nem de um tiol alquilado no enxofre.

Como demonstrámos anteriormente (1), o enxofre, contido no veneno de *Bothrops jararaca*, de ação tão diferente, tambem se apresenta como pontes -S-S- que são de capital importancia na ação. Por êsse motivo esclarecemos tambem os componentes desse veneno, os quais contêm enxofre. Acontece, porém, que o veneno botropico, apesar do adicionamento de acido formico ao acido cloridrico ou sulfurico, não pode ser hidrolizado sem que se dê forte decomposição, motivo pelo qual tivemos de abandonar a determinação da cistina (-S-S-) pelos metodos de Sullivan e Folin.

Durante a hidrolise com acido iodidrico não aparecem as dificuldades citadas, de modo que pudemos determinar bem a cistina (-S-S-) e metionina pelo

metodo de Baernstein (6). Não utilizamos o veneno crú, mas uma fração purificada, com com toda a atividade neurotoxica. Encontrámos na media 5,73% de cistina (-S-S-) e 1,08% de metionina, do que resulta um teor de enxofre de 1,75% para o veneno de *Bothrops jararaca,* enquanto que o teor medio das analises de combustão era de 1,74%.

Descrição das experiencias

Tornou-se absolutamente necessario para as analises dos venenos uma cuidadosa, porém energica secagem. Essa conseguimos somente depois que as substancias foram secadas durante duas horas a uma temperatura de 100°, sob uma pressão de 0,01 mm. sobre pentoxido de fosforo até peso constante. O teor de toxicidade não sofreu com isso. Os teores das analises em % se referem aos preparados assim obtidos, completamente livres de agua.

Com a questão de secagem dessas proteinas ativas, altamente higroscopicas, é de interesse geral, expomos as nossas experiencias, feitas na secagem de venenos sob diversas condições, em curvas de perda de peso, que certamente não requerem mais explicações. Como já achou du Vigneaud (3), no caso da insulina, os teores de enxofre podem baixar de até 0,3% si a secagem for insuficiente. Os venenos de cobra são igualmente ou talvez mais higroscopicos do que a insulina.

I. *Crotoxina amorfa, pura* ($TT = 3.000$, $TL = 165$, $TC = 0$)

1) Determinação do teor de enxofre segundo Schöberl (8).

43,793 mgs. substancia deram 15.608 mgs. de sulfato de benzidina
22,872 " " " 8,087 " " " " "

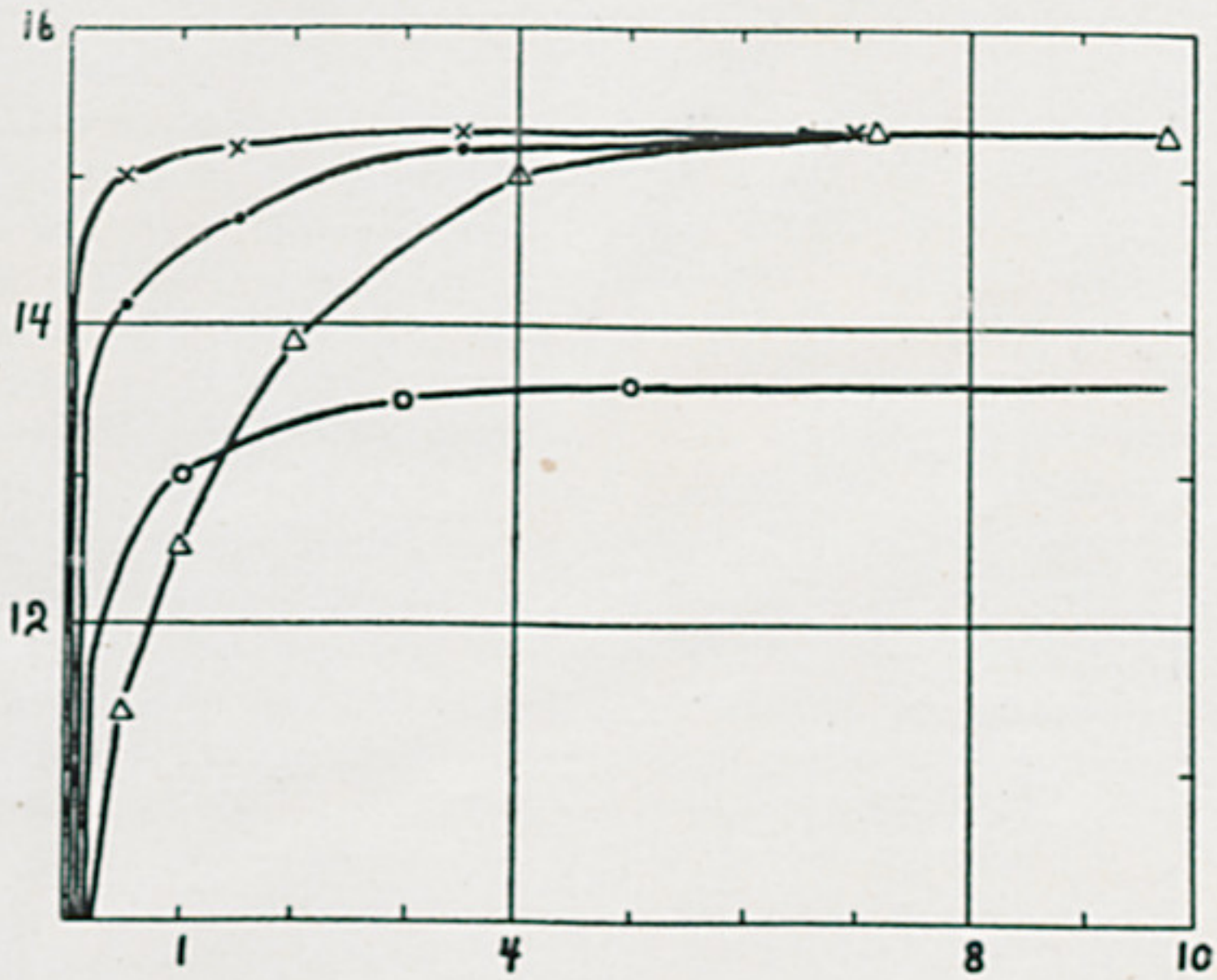
Em cada caso a substancia deixou somente vestigios de cinza.

S = 4,05; 4,02. Media: S = 4,03%.

2) Determinação dos amino-acidos que contêm enxofre.

a) Cistina (-S-S-) determinada como cisteina (-SH), conforme Folin (5) e Sulivan (4)

55,44 mgs. de substancia foram dissolvidos num balãosinho de boca esmerilhada em 5,8 ccs. de acido clorídrico concentrado; 6,2 ccs. de acido formico puro foram adicionados e, depois de adaptados a um tubo de refluxo com junta esmerilhada, aquecidos em banho de oleo durante 48 horas a uma temperatura de 130 a 140°. Depois de exames preliminares poude-se verificar que a hidrolise, após êsse tempo, era completa. Em seguida o soluto foi, a uma pressão de



Curvas de secagem do veneno de *Crotalus t. terrificus*, contendo 15,3% de humidade.

Ordenada: perda de peso em %

Abcissa: tempo de secagem em horas.

—×— Secagem no alto vacuo de 0.01 mm., a 100°C, sobre P_2O_5

—●— " " " " " 0.01 mm., a 54°C. " "

—△— " " " " " 0.01 mm., a 25°C. " "

—○— Secagem numa corrente de ar seco sob a pressão de 55 mms., a 54°C.

50 ms., evaporado à secura em banho-maria e o residuo dissolvido em 3 ccs. de agua. Depois de levar esse soluto, com a adição de sóda caustica 0,1 N, a um pH de 3,5, êle foi colocado em um balão graduado de 10 ccs..

Avaliação colorimetrica segundo FOLIN (5) — Num balão volumetrico de 25 ccs. foram colocados 1 cc. do soluto acima mais 1 cc. de acido sulfurico 0,5 N e 1 cc. de agua. Do mesmo modo tratou-se um soluto padrão de 8,071 mgs. de Cistina (-S-S-) pura, em 10 ccs. de acido sulfurico 0,5 N, do qual 1 cc. mais 2 ccs. de agua foi empregado.

A cada um desses balões foram adicionados os seguintes reagentes: a) 1 cc. de um soluto de sulfito de sodio a 10% (20 g $Na_2 SO_3.7 H_2O$ para 100 cs. dissolvidos com agua); b) depois de deixar 1 minuto: 5 ccs. de um soluto de carbonato de sodio a 18% (18 g $Na_2 CO_3$, anidro para 100 cc. dissolvidos em agua); c) 1 cc. de um soluto de sulfato de litio a 10% (11,6 g $Li_2 SO_4.H_2O$ para 100 ccs. dissolvidos em agua); d) 2 ccs. do "reagente para acido urico", segundo Folin, diluido, quanto às indicações originais, à razão de 1:6. Esse reagente fora preparado de tungstato de sodio da firma Schering-Kahlbaum ($Na_2WO_4.2H_2O$) mais uma vez por nós purificado pelas ultimas indicações de Folin (5); e) depois de agitado e estacionado durante 5 minutos: 13 ccs. de um soluto de sulfito de sodio a 3% (6 g $Na_2 SO_3.7 H_2O$ para 100 ccs. dissolvidos em agua).

Em seguida foi feita a avaliação colorimetrica com um colorimetro Dubosq de dois degraus (Leitz). Para compensar a côr propria do hidrolizado, empregou-se um soluto, feito de acôrdo com o que devia ser determinado, mas que continha 2 ccs. de agua em vez do reagente de Folin. 30 mms. de camada de soluto a ser examinado correspodiam a 27,83 mms. de camada do padrão que continha 0,807 mgs. de cistina (-S-S-). O soluto a ser determinado continha, pois, por ccs. 0,75 mgs. de cistina (-S-S-), i.é. o teor de cistina (-S-S-) do veneno era de 13,5%.

Avaliação colorimetrica segundo SULLIVAN (4) — 2 ccs. de hidrolizado, neutralizado como acima descrito, que correspondiam, portanto, a 11,09 mgs. de veneno, foram colocados em um Erlenmeyer de 25 ccs.. Simultaneamente, um soluto de 1,558 mgs. de cistiaa (-S-S-) e 5 ccs. de acido cloridrico 0,1N, destinado a soluto comparativo sofreu o mesmo tratamento, que damos a seguir.

Ao hidrolizado e ao soluto padrão foram adicionados: a) 2 ccs. de um soluto de cianeto de sodio alcalino (5 gs. cianeto de sodio para 100 cs. dissolvidos (9) com soda caustica-1N.) Depois de bem agitadas, as soluções ficaram paradas durante 10 minutos; b) 1 cc. de um soluto a 0,5% do sal de sodio do acido 4-sulfurico da nafto-quinona 1,2 recem-recristalizado. Agitou-se durante 10 segundos; c) 5 ccs. de um soluto de sulfito de sodio a 10% (20 g $Na_2 SO_3.7 H_2O$ para 100 ccs. dissolvidos com soda caustica 0,5-N. Os solutos ficaram parados durante 30 minutos; d) 1 cc. de um soluto de hodrosulfito de sodio a 2%

(2 g $Na_2 S_2 O_4$ da firma Schering-Kahlbaum para 100 ccs., dissolvidos em soda caustica 0,5 N).

Os dois solutos foram colorimetrados no aparelho mencionado, sendo que a côr propria do soluto a ser examinado foi compensada por um soluto obtido da mesma forma, que, porém, continha 1 cc. de agua em vez do reagente indicado sob b). 30 mms. da camada do soluto a ser examinado correspondiam a 27,41 mms. do soluto padrão, do que resultou um teor de cistina (-S-S-) do veneno de 13,0%.

Pela segunda vez foram, como acima dito, hidrolizados 42,12 mgs. de Crotoxina durante 48 horas. Do hidrolizado levado a 10 ccs., 2 ccs. foram empregados para a reação conforme Folin e comparados do modo descrito com 1 cc. do soluto padrão, que continha 0,807 mgs. de cistina (-S-S-), 20 mms. da camada desse soluto desconhecido correspondiam a 27,50 do soluto padrão; o teor de cistina (-S-S-) na Crotoxina é, portanto, de 13,2%. Para a reação de Sullivan foram utilizadas 2 ccs. do soluto mencionado, que foram comparados com 3 ccs. do soluto padrão, que continha 0,3115 mgs. de cistina (-S-S-). 30 mms. da camada do soluto em questão correspondiam a 35,51 mms. do soluto padrão do que resulta um teor de cistina (-S-S-) na Crotoxina de 13,1%.

b) Cistina (-S-S-) e metionina determinadas segundo Baernstein (6).

179,54 mgs. de Crotoxina foram colocados em um balãosinho com boca esmerilhada de 25 ccs. e foram conservados com acido iodídrico que continha 1% de hipofosfito de sodio, sob refluxo e condução de gaz carbonico purissimo em fervura, em banho de oleo de 150°, durante 5 horas. O hidrolizado foi, depois desta operação, concentrado a 3 ccs. e adicionado com um cristal de hipofosfito de sodio ($NaH_2 PO_2.H_2O$) e fervido durante um minuto. O balão, ainda quente, foi fechado com uma rolha esmerilhada e resfriado. Simultaneamente encheu-se um balão volumetrico de 25 ccs. com azoto purissimo e transferido para êste por um funil pequeno o hidrolizado. O balão da reação foi lavado tres vezes com acido cloridrico a 4%, livre de oxigenio e saturado com azoto, sendo que o balão foi completado com o mesmo acido a 25 ccs.. O soluto tinto de amarelo claro não continha iodo livre como mostrava a prova de amido.

Afim de determinar a cistina (-S-S-), foram colocados 10 ccs. desse soluto em um balão de 25 ccs. com junta esmerilhada e adicionados um cristal de iodeto de potassio, uma quantidade de soluto de amido e um pequeno excesso de um soluto de biiodado de potassio ($KHJ_2 O_6$). O iodo em excesso não utilizado na oxidação da cisteina (-SH) para cistina (-S-S-) foi titulado com tiosulfato 0,01 N. Em duas titulações foram necessarios 7,91 e 7,96 ccs. de soluto de biiodato de potassio, do que se pode calcular para a quantidade total da Crotoxina empregada um teor de cistina (-S-S-) de 13,2% e 13,3%, respectivamente.

Para determinar a metionina foram adicionados ao soluto incolor 3 gotas de soluto de fenolftaleina a 0,5% e 2 ccs. de soluto de tetrationato de alcali 0,01N, que havia sido feito, pouco antes, de partes iguais de soluto de tiosulfato de sodio 0,01N ($Na_2 S_2 O_3$) e biiodato de potassio ($KHJ_2 O_6$ com iodeto de potassio e um pouco de acido cloridrico diluido. Sobre o balão, com o soluto assim preparado, foi colocada uma junta esmerilhada, na qual se achava um funil conta-gotas com torneira e um tubo lateral para o vacuo. Depois de diminuida a pressão até mais ou menos 50 mms., o vacuo foi fechado e pelo funil acrescentando amoniaco concentrado, assim que o soluto tomasse uma côr vermelha forte. Depois de aberta, com todo o cuidado, a torneira do vacuo, o amoniaco em excesso evaporou, espumando. Fechado novamente o soluto vermelho foi abandonado durante 15 minutos, permitindo-se em seguida a entrada de ar pela torneira. Acidulou-se rapidamente com 10 ccs. de acido cloridrico a 10%. O tiosulfato assim formado foi titulado com um soluto de biiodato de potassio, 0,01N ($KHJ_2 O_6$). Foram utilizados 0,68 cs. de soluto de biiodato de potassio, donde se dá um teor de metionina na Crotoxina de 1,41%.

Uma segunda experiencia foi iniciada com 80,54 mgs. de Crotoxina, executada como descrito. O hidrolizado, porém, foi somente completado a 10 cs., dos quais cada 5 cs. foram utilizados para cada das duas marchas de titulação. Nas primeiras titulações foram necessarios 4,70 e 4,68 cs. de soluto de biiodato de potassio, correspondentes a 13,05 e 13,00% de cistina (-S-S-). Nas segundas titulações foram utilizados 0,38 e 0,40 cs. de biiodato de potassio, o que corresponde a 1,31 e 1,37% de metionina.

Resumo dos teores de Crotoxina assim obtidos:

S: 4,02; 4,05% (Crotoxina amorfa).
3,96; 4,03% (Crotoxina cristalizada)
Teor medio: 4,01 ± 0,05%

Cistina: 13,2; 13,5% (Folin)
13,0; 13,1% (Sullivan)
13,0; 13,1; 13,2; 13,3% (Baernstein)
Teor medio: 13,2 ± 0,3% correspondentes a 87,6 ± 2,3% do enxofre total.

Mitionina: 1,31; 1,37; 1,41% (Baernstein)
Teor medio: 1,36 ± 0,05% correspondentes a 7,2 ± 0,3% do enxofre total.

II. *Fração do veneno de* **Bothrops jararaca,** *purificada e neurotoximente de completa atividade.*

1. *Determinação do teor do enxofre total, segundo Schöberl* (8).

32,710 mgs. Subst. resultaram 4,945 mgs. sulfato de benzidina.
29,770 " " " 4,610 " " " "
Achado S = 1,72; 1,76.

2. *Determinação de cistina (-S-S-) e metionina, segundo Baernstein* (8).

198,81 mgs. de veneno foram hidrolizados como descrito para a Crotoxina, e o soluto obtido levado a 25 ccs.. Para a marcha de titulação foram utilizados 2 vezes 10 ccs. de soluto. Na titulação da cistina (-S-S-) foram necessarios 3,80 e 3,79 ccs. e na da metionina 0,55 e 0,60 ccs. biiodato de potassio, o que corresponde a um teor de cistina (-S-S-) de 5,75 e 5,73% e um teor de metionina de 1,03 e 1,12%.

RESUMO

Determina-se o teor de cistina (-S-S-) e o teor de metionina na Crotoxina, segundo os metodos de Folin, Sullivan e Baernstein que dão, respectivamente, 13,2 e 1,36%. Esclareceu-se, assim, 95% do enxofre contido na Crotoxina nos seus modos de ligação. É de supôr que, pelo peso molecular provavel de 33.000, baseado no teor de metionina, existam na Crotoxina 18 moleculas de Cistina (-S-S-) e 3 moleculas de metionina. Os 5% do teor de enxofre que faltam deveriam então pertencer a dois outros componentes contendo enxofre (10).

Uma fração do veneno *Bothrops jararaca* com o total da atividade continha 1,74% de enxofre. Essa substancia deu 5,73% de cistina (-S-S-) e 1.08 de metionina, do que se poderia calcular um teor de enxofre de 1,75%.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Methoden von Folin, Sullivan und Baernstein wird der Gehalt des Crotoxins an Cystin (-S-S-) und Methionin zu 13,2% beziehungsweise 1,36% ermittelt. Damit sind rund 95% des im Crotoxin enthaltenen Schwefels (4,01%) in ihrer Bindungsart aufgeklärt. Es ist wahrscheinlich, dass bei einem aus dem Methionin-Gehalt zu vermutenden Molekelgewicht von 33.000, im Cro-

toxin 18 Cystin (-S-S-) und 3 Methionin-Molekeln sind. Die fehlenden 5% des Schwefelgehaltes müssten 2 andeven schwefelhaltigen Molekeln angehön (10).

Eine vollaktive Fraktion des *Bothrops jararaca*-Giftes enthiel 1,74% Schwefel. Diese Substanz ergab 5,73% Cystin (-S-S-) und 1,08% Methionin, woraus sich ein Schwefelgehalt von 1,75% errechnem würde.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L.* — Mem. Inst. Butantan **11**:121. 1937.
2. *Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L.* — Mem. Inst. Butantan **12**: . 1938.
3. *Miler, G. L. & Vigneaud, V. du* — J. Biol. Chem. **118**:101. 1937.
4. *Sullivan, M. X.* — Publ. Health Rep., Washington, suppl. (78). 1929.
5. *Folin, O. & Marenzi, A. D.* — J. Biol. Chem. **83**:103. 19029.
6. *Baernstein, H. D.* — J. Biol. Chem. **106**:453. 1934.
7. *Bergmann, M. & Niemann, K.* — Science **86**:187. 1937.
8. *Schöberl, A.* — Ztsch. angew. Chem. **50**:334. 1937.
9. Trabalhámos na execução da reação de Sullivan num soluto um pouco mais fortemente alcalino que de costume, pelo que se pode evitar o emprego de tamponagem aconselhado por outros. Reconhecemo-nos gratos ao colega Sr. M. X. Sullivan pela sua indicação particular nesse sentido.
10. O peso molecular da Crotoxina é de 30500, segundo as determinações de Gralén, N. & The Svedberg — Biochemical J. **32**:1375. 1938.

(Trabalho da Secção de Quimica e Farmacologia Experimentais do do Instituto Butantan, recebido em maio de 1938.Publicado como Nota Previa, em alemão, in Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 71: 1938. Dado à publicidade em junho de 1939).