

minerais sólidos ou dissolvidos no seu ambiente no sistema terapêutico, juntam-se os efeitos da ação química das substâncias minerais, que é de natureza catalítica, ou seja, que aumenta a ação de outras substâncias, sem ser capaz de agir sozinha. A ação anagotoxica é devida ao efeito de ação catalítica exercido sobre certas toxinas, que são neutralizadas ou desativadas.

## PODER ANAGOTOXICO DAS AGUAS DE SÃO PEDRO SOBRE ALGUNS VENENOS OFIDICOS

POR

FAVORINO PRADO JUNIOR & J. B. ARANTES

Nestes últimos anos, os hidrologos têm posto em evidencia as propriedades específicas de certas águas minerais. Para alguns parece ser de natureza catalítica, tal é a ação alterante das águas de Vichy sobre a água oxigenada, assinalada, em 1911, por Glénard, e ativação das diastases, sob o nome de poder zimostenico, estudado por Loeper, Mougeot & Aubertot (6).

Certos toxicos de constituição química desconhecida ou quasi desconhecida, como as toxinas, venenos vegetais, alcaloidicos, podem ser transformados em compostos químicos desprovidos completamente de toxicidade.

Billard (1) assinalou o nitido poder inativante "in vitro" das águas de Chatel-Guyon, sobre o veneno de vibora. Em mais de 20 provas realizadas sobre as águas d'Auvergne, esse autor observou nitido poder anagotoxico sobre diversos venenos.

Perrin & Cuénot (9) mostraram o poder anagotoxico das águas de Bussang (fontes "Grande Salmade" e "Petite Salmade") sobre o sulfato de esparteina. Usando como animal reativo as larvas de *Culex*, esses autores verificaram o poder anagotoxico das águas de "La Bourboule" em face da picrotoxina, bem como as águas de Bussang e de numerosas fontes de Vichy.

Entre nós, Vital Brazil (16), trabalhando com as águas de Poços de Caldas, Pocinhos do Rio Verde e Lambari, demonstrou indiscutivel poder anagotoxico dessas águas, em face da peçonha da Cascavel (*Crotalus terrificus*) "in vivo", sobre o organismo do pombo e sobre a toxina difterica.

Diante de um fenomeno assim geral, procura-se uma explicação satisfatoria.

Violle & Giberton (15) foram os primeiros a demonstrar experimentalmente, que o poder anagotoxico dumha água mineral é atribuido unicamente a certos sais que nela estão dissolvidos. A radioatividade e o estado coloidal não têm nenhuma qualidade antagonica propria. Numa água com poder anago-

toxico, pode-se colocar sempre em evidencia um ou muitos sais que lhe conferem esse poder.

Assim é que Violle & Giberton revelaram o poder anagotoxico do cloreto de calcio em face dos sais de cobre e do sulfato de esparteina.

Perrin & Cuénot mostraram a atividade dos bicarbonatos de ferro, de magnesio e de calcio, que contem as aguas de Bussang, em face do sulfato de esparteina; do carbonato de magnesio, que existe na maior parte das aguas alcalinas, sobre a picrotoxina.

Como agirá a agua para proteger o organismo contra esses toxicos, é um problema somente resolvido por inumeras hipoteses empiricas. Cremos que, futuramente, desse empirismo sairá a solução definitiva dessa ação misteriosa das aguas minerais, haja visto as palavras de Claude Bernard: "Dans sa marche à travers les siècles, la médecine, constamment forcée d'agir, a tenté d'innombrables essais dans le domaine de l'empirisme et en a tiré d'utiles enseignements".

Billard (2) que utilizou sobretudo toxicos de composição química complexa ou mesmo desconhecida, atribue toda atividade das aguas anagotoxicas a certos ions livres do complexo eletrolítico hidromineral. Pensa ele, que esses ions, mais rapidamente difusíveis que o toxico ao qual está misturado, se fixam eletivamente sobre os órgãos sensíveis, tornando-os refratários à impregnação toxica posterior. Para Billard, o toxico de nenhum modo é alterado pela adição dum eletrolito anagotoxico.

Baseado em novas experiencias, Perrin & Cuénot, em 1930, emitiram uma hipótese em contrario. Para eles, o poder anagotoxico seria resultado de uma reação química, mais ou menos nítida, dum ação reciproca do eletrolito ativo sobre o toxico correspondente, com a produção dum corpo novo, seja solúvel e atoxico ou seja toxico, mas insolúvel. Em favor de sua teoria, esses autores citam o fato das aguas bicarbonatadas serem anagotoxicas para uma solução acida, havendo formação de um corpo novo, um sulfato, por exemplo, com abaixamento de taxa acidimétrica por desprendimento de gas carbonico. Em aguas minerais com poder anagotoxico mínimo ou nulo, o toxico é transformado em um corpo novo, menos toxico, ou é transformado somente em parte.

Verificou Billard que, certas substâncias consideradas toxicas, podem, em certas ocasiões, funcionar como anagotoxicas. É o caso do sulfato de esparteina, que em dose toxica, misturado "*in vitro*" com o veneno de *Vipera aspis*, em vez de reforçar sua ação, tem um nitido poder anagotoxico. Segundo Marie Phisalix (7), o veneno de *Vipera*, inoculado sob a pele na dose de 0.5 a 1 miligrama, determina a morte de uma cobaia em menos de 10 horas. Doses muito superiores a essas, misturadas "*in vitro*" com o sulfato de esparteina, são inocuas. J. Weill explica esse fenômeno, atribuindo à esparteina, que é um veneno curarizante, um aumento da cronicidade muscular.

Em suma, para Perrin & Cuénot, o poder anagotoxico é um fenômeno químico extremamente geral; os produtos atóxicos originados são do mesmo tipo que a anatoxina de Ramon, formada pela associação formol-toxina; ou semelhante à criptotoxina de Vincent, obtida pelo contacto prolongado da toxina com o palmitato de sódio. Havendo águas minerais anagotóxicas da toxina tetânica, da toxina difterica, da falina, do veneno de *Vipera*, deve-se deduzir, que nessas águas existem sais minerais antidotos químicos desses tóxicos.

Leon Binet, Georges Weller & Eugène Robillard (4), constataram o poder anagotoxico do glutation e compostos sulfidrilados, em face do veneno de *Cobra*, chegando as cobaias a suportar até 50 doses mortais de veneno, quando misturados a esses elementos. Explicam esses autores o modo de ação dos compostos sulfidrilados sobre o veneno de *Cobra*, dizendo que o glutation e esses compostos agem como redutores, transformando os grupamentos — SS — do veneno em grupamentos — SH.

Maurice Renaud (11) mostrou, em seus trabalhos, que o veneno de *Cobra* forma, com as soluções coloidais de sabões (seja óleato de sódio, seja palmitato de sódio), complexos nos quais a toxicidade se atenua rapidamente e acaba por desaparecer ao fim de certo tempo, suportando os animais injeções até 60 DML de veneno. Esses complexos veneno-sabões, desprovidos de toxicidade, guardam seu poder antigenico específico. A neutralização do veneno de *Cobra* pelos sabões necessita um contacto prolongado de 4 a 6 horas, em uma solução pouco concentrada. Netter, Thomas & Freser constataram a ação antivenenosa da bile sobre o veneno de *Cobra*, explicando a sua ação pela formação de sabões, daí a inocuidade do veneno por via digestiva (12-13).

Pelo exposto, verifica-se a dificuldade que existe em saber, qual o ion ou grupo de ions que têm um poder neutralizante sobre um determinado veneno, e como será essa ação. Devemos ter sempre em mente as palavras de Mouriquand, Michel & Milhaud (8), que afirmam, não dever nunca relacionar as propriedades de uma água mineral, unicamente aos elementos minerais que ela encerra.

Temos hoje a firme convicção de que não existe um veneno de origem orgânica para o qual não se possa encontrar uma água mineral capaz de inativá-lo (Billard).

Princípio aceito por todos pesquisadores é o de que uma água mineral pode ser nitidamente anagotóxica para um determinado veneno e não ser para outro. Esse fato foi confirmado por Billard com várias águas. As águas de "La Bourbole" são anagotóxicas para a toxina tetânica e não são para outras toxinas; a de "Saint-Nectaire" são anagotóxicas para a toxina difterica e as de "Mont-Dore" para o sulfato de esparteina.

Um de nós teve ocasião de verificar o mesmo com as aguas minero-medicinais de São Pedro. A agua da fonte "Gioconda" mostrou nitido papel protetor em presença da picrotoxina (10), enquanto que as aguas das fontes "Juventude" e "Almeida Salles" se mostraram anagotoxicas em face da toxina tetanica (3).

É necessário ter-se cuidado na prescrição das aguas minerais, porque não sabemos dizer qual o grupo de aguas que terão um poder anagotoxico e qual será o grau desse poder. Mesmo após longas experiencias, determinada a fonte que suprime a ação de certo toxico, estamos longe de saber qual é o eletrolito inativante e qual o ion que tem ação. Assim, em face de uma determinada molestia, é necessário verificar si a agua a ser usada tem um poder anagotoxico, pois, muitas vezes, elas possuem um terrivel poder agotoxico (aumenta a toxicidade).

Com o fim de pesquisar o poder anagotoxico das aguas de São Pedro sobre diversos venenos ofídicos, utilizamos como animal reativo o pombo, por ser muito sensível ao veneno e de uma sensibilidade constante, motivo pelo qual é este animal utilizado para o doseamento de soro ofídico neste Instituto. Os pombos usados, com um peso constante (mais ou menos 300 gs.), eram injetados por via venosa, com a mistura veneno + agua mineral, depois de permanecerem em contacto por 30 minutos à temperatura de 37 graus centígrados. Usamos uma tecnica contraria à de Billard, quando estudou a ação do veneno de *Vipera* misturado com agua mineral de Chatel-Guyon. Esse autor usava a via peritoneal, e cobaias de pesos variaveis.

As aguas minerais usadas por nós não tinham mais de 48 horas de colhidas na fonte, pois as aguas muito envelhecidas perdem seu poder anagotoxico. Vital Brazil verificou com as aguas do Rio Verde, que estas perdem seu poder anagotoxico após 9 dias de colhidas na fonte.

Dividimos nossas experiencias em duas series. Numa, usamos o veneno de Cascavel (veneno crotálico), e na outra, o veneno de Jararaca (veneno botrópico).

**Primeira serie:** O veneno de Cascavel (*Crotalus terrificus*) usado tem como dose mínima letal (DML) 0,0015 de miligramas (DML é a dose que mata um pombo de 300 gs. em 24 horas). Numa primeira parte injetamos 4 DML (0,006 de mgs.) para cada grupo de 3 fontes, bem como para as testemunhas, feitas com agua potável e soro fisiológico. Numa segunda parte, injetamos 2 DML (0,003 de mgs.) nas mesmas condições que na primeira parte. Tanto para as testemunhas, como para as aguas em experiência, misturamos "*in vitro*" a dose de veneno diluído em 1 cc. de soro fisiológico com 1 cc. da agua em estudo, que permanecia em contacto por 30 minutos a 37 graus centígrados.

RESUMO DAS EXPERIENCIAS COM O VENENO CROTALICO

No. do pombo	Peso em gs.	Dose em mgs.	Tempo 1.º sintomas em horas	Tempo da paralisia em horas	Tempo da morte.	Aguas usadas
88	286	0,006	1,11'	1,18'	2,49'	Fonte "Gioconda"
89	302	0,006	2,11'	2,37'	após 3hs.	Fonte "Juventude"
90	312	0,006	1,25'	1,39'	" "	Fonte "Alm. Salles"
91	320	0,006	0,49'	0,55'	2,8'	Test. soro fisiol.
92	300	0,006	1,8'	1,15'	2,20'	Test. agua potav.
93	335	0,003	1,52'	2,32'	3,30'	Fonte "Gioconda"
94	326	0,003	—	—	Sobrev.	Fonte "Juventude"
95	327	0,003	3,13'	3,33'	após 4hs.	Fonte "Alm. Salles"
96	335	0,003	1,45'	2,24'	" "	Test. soro fisiol.
97	311	0,003	2,9'	2,22'	" "	Test. agua potav.

No quadro acima, a 3.<sup>a</sup> coluna indica a dose recebida pelo pombo, em miligramos (0,006 de mgs. correspondente a 4 DML, e 0,003 de milígramo correspondente a 2 DML); a 4.<sup>a</sup> coluna indica o tempo decorrido entre a injeção veneno + agua e o aparecimento dos primeiros sintomas; a coluna seguinte nos dá o tempo entre a injeção do veneno e o aparecimento da paralisia; finalmente, a 6.<sup>a</sup> coluna indica o tempo decorrido entre a injeção e a morte do pombo.

Observamos que com 4 DML (0,006 de mgs.), o pombo injetado com a mistura veneno+agua da fonte "Juventude" foi o que mais resistiu, só morrendo após 3 horas de injetado. Depois da fonte "Juventude", a fonte "Almeida Salles" foi a que apresentou maior poder anagotoxico em face do veneno crotalico. O pombo injetado com essa agua seguramente morreu primeiro que o pombo injetado com a agua da fonte Juventude, pois os fenomenos paraliticos apareceram muito antes. Com 2 DML (0,003 de mgs.), o pombo injetado com veneno+agua da fonte "Juventude", não apresentou sintomas. Nas testemunhas, os fenomenos paraliticos se manifestaram mais cedo, tendo esses pombos seguramente morrido antes do pombo injetado com a agua da fonte "Almeida Salles".

*Segunda serie:* Usamos o veneno botropico (*Bothrops jararaca*), cuja dose minima letal é de 0,030 de miligramos (dose que mata um pombo de 300 gs. mais ou menos em 20 minutos). Nessa segunda serie, como na primeira,

usamos os mesmos métodos de diluição e de injeção. Os pombos foram injetados com 2 DML (0m060) e com 1,5 DML (0m045). O resultado obtido foi o seguinte:

No. do pombo	Peso em gs.	Dose em mgs.	Tempo 1º sintomas em minutos	Tempo de morte em minutos	Aguas usadas
8	307	0,060	2'	4'	Fonte "Gioconda"
9	314	0,060	16'	22'	Fonte "Juventude"
12	322	0,060	7'	10'	Fonte "Alm. Salles"
10	280	0,060	3'	5'	Test. c/sôro fisiológico
11	276	0,060	immediatos	3'	Test. c/água potável.

Observamos que com 2 DML os pombos injetados com a água da fonte "Juventude" foram os que mais resistiram, passando de 20', tempo em que se considera a dose mínima letal para o veneno botrópico. Repetimos essas mesmas experiências, com os mesmos métodos, usando 1,5 DML (0,045 de mgs.) tendo o pombo injetado com a mistura veneno+água sulfurosa (fonte "Juventude"), suportado muito bem, sem qualquer sintoma.

Ensaios iniciados por nós, com o veneno da coral (*Micrurus corallinus*), demonstraram também um nítido poder anagotóxico da fonte "Juventude", e em segundo plano, da fonte "Almeida Salles".

Fato comprovado por vários pesquisadores, entre nós por Vital Brazil, é o de que, à medida que a água mineral envelhece, perde seu poder anagotóxico. As águas por nós usadas não tinham mais do que 48 horas de colhidas. Para provar esse fato, deixamos envelhecer na geladeira, pelo espaço de 10 dias, uma garrafa de água da fonte "Juventude". Findo esse prazo, a água perdia seu cheiro sulfídrico característico e sua cor. Com a mesma técnica, usada anteriormente nos outros experimentos, injetamos um pombo de 313 gs. com uma mistura dessa água, mais 0m003 (2 DML) de veneno crotálico. Após 1h.30' de injetado, o pombo apresentou paralisia, morrendo após 2 hs. 13' de injetado, o que prova ter a água perdido todo poder anagotóxico. Com essa mesma dose, e com água nova, o pombo não apresentou sintomas.

Ao que atribuir o papel protetor da água mineral, sobre esses venenos ofídicos. Cada hidrologo interpretaria esse poder por um prisma diferente, baseado em suas teorias.

Billard acharia que os íons do complexo eletrolítico hidromineral, mais difusível do que o veneno, se fixariam eletivamente sobre os órgãos sensíveis e os tornariam refratários à impregnação posterior do veneno.

Perrin & Cuénot atribuiriam essa ação a uma reação química do eletrolito ativo sobre o veneno, com a produção de um corpo novo solúvel e atóxico ou de um corpo tóxico, mas insolúvel.

Para Renaud haveria a formação de sabões com a água mineral que inativaria o veneno.

Binet, Weller & Robillard achariam que os compostos sulfidrilados da água sulfurosa da fonte "Juventude", agiriam como redutores, transformando os grupamentos — SS — do veneno em grupamentos — SH. Esta interpretação assemelha-se aos trabalhos de Slotta & Fraenkel-Conrat, que, trabalhando com a neurotoxina do veneno crotálico, assinalaram a presença e a importância dos grupamentos — SS — na molécula da neurotoxina.

De todas as hipóteses, nos parece mais razoável atribuir esse poder anagotoxico a um fenômeno de oxido-redução do veneno, pelos compostos sulfidrilados da água mineral, hipótese já bem discutida por um de nós e Büller Souto, explicando a ação inativante dessa mesma fonte sobre a toxina tetânica (3).

## CONCLUSÕES

1. A água alcalino-sulfurosa da fonte "Juventude" de São Pedro revelou poder anagotoxico em relação ao veneno de Cascavel (*Crotalus terrificus*), de Jararaca (*Bothrops jararaca*), e ao de Coral (*Micruurus corallinus*).
2. O pombo injetado com uma mistura feita "in vitro" de 1 cc. de veneno diluído em soro fisiológico, mais 1 cc. de água da fonte "Juventude", suportou 2 DML de veneno crotálico e 1,5 DML de veneno botrópico.
3. Os pombos injetados com 4 DML de veneno crotálico e 2 DML de veneno botrópico, mais 1 cc. de água da fonte "Juventude", resistiram por mais tempo que as testemunhas.
4. Esse efeito parece ocorrer por conta de um fenômeno de oxido-redução do veneno, pelos compostos sulfidrilados da água.
5. A água da fonte "Juventude", após o envelhecimento por 10 dias, tendo perdido sua cor e cheiro característico, não protegeu o pombo injetado com 2 DML de veneno crotálico. Depois de envelhecida a água perde seu poder anagotoxico.
6. A água cloro-bicarbonatada-sódica da fonte "Almeida Salles" apresentou fraco poder anagotoxico sobre os venenos ofídicos experimentados.
7. A água cloro-sulfatada-sódica da fonte "Gioconda" é destituída de poder anagotoxico sobre os venenos experimentados.

8. As aguas minerais em experiencia eram utilizadas até 48 horas depois de colhidas na fonte.

### CONCLUSIONS

1. The alkaline-sulphurous water of the fountain "Juventude", in São Pedro, seems to show a distinct anagotoxic power in regard to the venom of the rattlesnake (*Crotalus terrificus*), of *Bothrops jararaca* and of *Micrurus corallinus*.
2. The pigeon injected with a mixture prepared *in vitro* with 1 cc. of venom diluted in saline, and 1 cc. of water of the fountain "Juventude", resisted to 2 DML of the venom of *Crotalus terrificus* and to 1.5 DML of the venom of *Bothrops jararaca*.
3. The pigeons injected with 4 DML of crotalic venom, 2 DML of bothropic venom and 1 cc. of the water of the fountain "Juventude" survived longer than the test animals.
4. This effect seems to be due to a oxydo-reduction phenomenon of the venom, caused by the sulphidrilated compounds of the water.
5. The water of the fountain "Juventude", after standing for 10 days and consequently loosing its colour and characteristic odor, has not protected a pigeon injected with 2 DML of crotalic venom. After standing the water loses its anagotoxic power.
6. The chloric-bicarbonated-sodaic water of the fountain "Almeida Salles" seems to present weak anagotoxic power in regard to the examined ophidic venoms.
7. The chloric-sulphurated-sodaic water of the "Gioconda" fountain is destituted of anagotoxic power against the examined venoms.
8. The mineral waters under experience were used within 48 hours after having been collected at the fountain.

### BIBLIOGRAFIA

1. Billard, G. — Pouvoir anagotoxique de eaux de Chatel-Guyon sur le venin de vipère — C. R. Soc. Biol. 94:1140.1926.
2. Billard, G. — Pouvoir anagotoxique des quelques eaux minérales d'Auvergne sur certaines neurotoxines — Presse Médicale 35:113.1927.
3. Büller Souto, A. & Prado Junior, F. — Poder anagotoxico das aguas de São Pedro sobre a toxina tetanica — II.º Congr. Nac. de Hidro-Climatismo, 1940.

4. Binet, L.; Weller, G. & Robillard, E. — Nouvelles expériences concernant l'action exercée "in vitro" sur le venin, de *Cobra*, par le glutathion et quelques composés sulphydrilés — C. R. Soc. Biol. 131:954.1939.
5. Chaves, B. — Aguas de Lambaré :29.1932.
6. Loepér, M.; Mougeot A. & Aubertot, V. — Le pouvoir zymosthénique des eaux minérales — Presse Médicale 35:241.1927.
7. Phisalix, Marie — Animaux Venimeux et venins — Masson & Cie. 2:547.1922.
8. Mouriquand, G.; Michel, P. & Milhaud — Action comparée de l'eau de Vichy (Grande Grille) et d'une solution bicarbonatée équivalente sur le cobaye carencé — C. R. Soc. Biol. 94:65.1926.
9. Perrin, M. & Cuénod, A. — La larve de *Culex*, réactif biologique. Mesure du pouvoir anagotoxique — Paris Médical 87:317.1933.
10. Prado Junior, F. — Poder anagotoxico das aguas de São Pedro, em face da picrotoxina — II.º Congresso Nac. de Hidro-Climatismo, 1940 et Brasil Medico 54: 716.1940.
11. Renaud, M. — Immunisation contre le venin de *Cobra* par les complexes venin-savons — C. R. Soc. Biol. 103:143.1930.
12. Renaud, M. — Pouvoir neutralisant des savons sur le venin de *Cobra* — C. R. Soc. Biol. 99:496.1928.
13. Renaud, M. — Savons et venin de *Cobra* — Bull. Inst. Pasteur 26:1114.1928.
14. Souza Lopes, Renato — Aguas minerais do Brasil — Edit. Livr. Francisco Alves, 1931.
15. Violle, P. L. & Giberton, A. — Les eaux minérales milieux antitoxiques — Presse Médicale 37:943.1929.
16. Brasil, Vital cit. por Souza Lopes (14) e Benicio Chaves (5).

(Trabalho da Secção de Imunologia do Instituto Butantan. Apresentado ao II.º Congresso Nac. de Hidro-climatismo e dado à publicidade em dezembro de 1940).

200 m above the last point of the old road. Rock 5000 ft. east of 3  
501 oval 2.

B. The upper limestone exposures were made at the same time as  
the middle limestone exposures — E. about 5000 ft. above the old  
road to probably at least 1000 ft. above the "Turtle" in  
5001. See III laid out in D — lithologies

C. 5000 ft. above the last — A sand 2  
in top of upper limestone layer at the bottom of the valley. It  
5001. 140 ft. thick sand — yellowish.

D. The upper limestone layer at the bottom of the valley. It  
5001. 500 ft. thick — yellowish-green — very thin  
shells, very few shrimps found — probably a N. shell. It seems to be  
A. D — lower part of the shrimps abundant shells are found

above the sand 2. This layer is about 200 ft. thick & has greenish-yellow  
shells in sand, and a yellowish lime shell — bivalves  
abundant and some small irregular fragments of corals — the  
shrimps abundant but few small fragments still — see  
5001. 20 ft. thick sand

E. The upper limestone layer at the bottom of the valley.  
successively thicker at the top to give a series of terraces — M. lime 2  
5001. 100 ft. thick lime shell — yellowish.

F. 500 ft. above the last limestone layer at the bottom of the valley — M. lime 2.  
The cliff seems to be due to a combination of 5001. 100 ft. thick  
5001. 100 ft. thick lime shell — yellowish — M. lime 2.  
This lime 2 is followed by a thin layer of sand — which contains a few  
shrimps and some small irregular fragments of corals — the  
shrimps abundant but few small fragments still — see  
5001. 20 ft. thick lime shell — yellowish.

G. The upper limestone layer at the bottom of the valley.  
successively thicker at the top to give a series of terraces — M. lime 2.  
The cliff seems to be due to a combination of 5001. 100 ft. thick  
5001. 100 ft. thick lime shell — yellowish — M. lime 2.  
This lime 2 is followed by a thin layer of sand — which contains a few  
shrimps and some small irregular fragments of corals — the  
shrimps abundant but few small fragments still — see  
5001. 20 ft. thick lime shell — yellowish.

H. The upper limestone layer at the bottom of the valley.  
successively thicker at the top to give a series of terraces — M. lime 2.

I. The upper limestone layer at the bottom of the valley.  
successively thicker at the top to give a series of terraces — M. lime 2.

J. The upper limestone layer at the bottom of the valley.  
successively thicker at the top to give a series of terraces — M. lime 2.