

## A INFLUENCIA DA TEMPERATURA SOBRE OS PRINCIPIOS TOXICO, COAGULANTE E PROTEOLITICO DO VENENO DA *BOTHROPS JARARACA*

POR

LAURA C. TABORDA

Ao iniciarmos algumas experiencias em torno da separação dos principios toxico, coagulante e proteolitico do veneno da *Bothrops jararaca* deparamos com varias divergencias entre os nossos resultados e os de alguns outros pesquisadores no tocante à ação da temperatura sobre este veneno.

Assim é que ao se referir a ação do calor sobre as soluções de veneno em face da sua atividade toxica, diz Calmette (1), que os venenos de *Lachesis* (hoje *Bothrops*) já seriam atenuados à temperatura de 65° C, embora dependendo esta atenuação do tempo de aquecimento e que por aquecimento a 70°C perdia a ação dissolvente sobre a gelatina e a fibrina.

HOUSSAY, SORDELLI e NEGRETE (2) afirmam que os venenos de diversas cobras, dentre as quais o da *Bothrops jararaca* (*L. lanceolatus*), diminuem subitamente suas atividades toxica, coagulante e lipolitica entre 60 e 70°C, dependendo da especie e que por aquecimento a 80° ou 90°C reaparecem as propriedades do veneno, embora atenuadas. Segundo Noc (3), o aquecimento a 80°C durante 30' em tubo fechado, destroe o poder proteolitico do veneno da *Bothrops jararaca* bem como de outros venenos.

VITAL BRAZIL e RANGEL PESTANA (4), no estudo da ação do calor sobre os venenos, advertem que devemos mencionar a qualidade do veneno, o tempo durante o qual se aquece e o grau de diluição com que se opera.

Em solução 1‰ em NaCl 8‰ verificaram que o veneno de *Bothrops jararaca* perde a sua toxicidade a 70°C bem como o seu poder proteolico.

Referindo-se, porém, à ação do calor sobre o veneno seco, diz NOGUCHI (5) ser esta muito pequena, podendo ser aquecida a 130°C sem perder a toxicidade.



Por esta pequena exposição, síntese da escassa literatura que pudemos encontrar sobre a ação da temperatura em face das mais importantes atividades do veneno da *Bothrops jararaca*, vemos que muito pouco ainda existe sobre o assunto e que as opiniões dos diversos investigadores não são muito concordantes.

A importancia desta ação sobre um complexo enzimo-proteico como o veneno, é, entretanto, de tal monta, que resolvemos estudá-lo, em primeiro lugar, com o fim de estabelecer uma diretriz mais segura para o nosso problema de fracionamento.

Verificamos então a ação do calor sobre os principios toxico, coagulante e proteolitico do veneno, quer sêco, quer em solução, chegando a resultados que nos levam a afirmar que grande numero de fatores influe nesta ação.

Além da qualidade do veneno (de diferentes especies dentro do mesmo genero e diferentes extrações), do tempo de aquecimento, e, do grau de diluição em que se opera, como observam muito bem VITAL BRAZIL e RANGEL PESTANA (4), outros fatores têm influencia como: o modo de aquecimento, a maneira como foi dessecado o veneno (no caso de não se usar veneno fresco), o pH da agua em que foi dissolvido, para não falar de maiores variações de pH que não entraram nas cogitações deste trabalho.

Si aquecermos a solução de veneno a fogo direto, as suas atividades diminuem mais rapidamente com o aumento de temperatura que si o fizermos em banho maria.

O veneno dessecado em alto vacuo apresenta-se mais homogeneo e resistente à temperatura e as atividades toxica, coagulante e proteolitica num "stock" são bem mais concordantes do que as de um "stock" de veneno dessecado em estufa a 37°C. Observamos tambem que, si dissolvermos o veneno em aguas distiladas cujos pH sejam diferentes, as suas atividades toxica, coagulante e proteolitica sofrem tambem variações.

O nosso trabalho foi realizado com um veneno dessecado em estufa a 37°C de um grande "stock" e, em diversas porções que temos utilizado para varios fins, achamos sempre resultados diferentes para os tres principios em questão.

Para eliminar esta causa de erro, fizemos, de uma só vez, a solução para todo o nosso trabalho.

Apenas para os aquecimentos acima da temperatura de ebulição, precisamos usar uma outra solução.

Esta foi a razão por que organizamos um quadro à-parte com estes resultados (Quadro IV).

Para o aquecimento do veneno seco, utilizamos veneno dessecado em estufa a 37°C (Quadro III) e tambem em alto vacuo (Quadro IV).



## PARTE EXPERIMENTAL

### a) **Aquecimento do veneno seco**

Este aquecimento foi feito com veneno seco em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e em alto vacuo.

De ambos pesamos 0,22 mgs. de veneno para cada prova, colocamos em capsula e aquecemos em estufa a  $130^{\circ}$ ,  $140^{\circ}$ ,  $150^{\circ}$ ,  $160^{\circ}$ ,  $170^{\circ}$  e  $180^{\circ}$  durante uma hora.

Deixamos esfriar, juntamos 20cc. de agua bidistilada pH 6,2 para ter uma solução a 1% e procuramos dissolver o veneno tanto quanto possivel, pois à medida que aumentamos a temperatura, mais difficil se torna a dissolução.

Para separar os residuos insoluveis que são também tanto maiores quanto mais elevada a temperatura, centrifugamos o todo durante 30' e, na solução, dosamos as actividades, toxica, coagulante e proteolitica pelos seguintes processos: (Quadros I e II).

*Actividade toxica:* Em primeiro lugar adicionamos NaCl ao liquido filtrado de cada prova na proporção de 8,5 ‰, isto é, na do sôro fisiologico.

Determinamos a D. M. L. por injeção endovenosa em pombos, usando sempre o volume de 2 cc. e observando a técnica preconizada por ARMANDO TABORDA (6).

Em linhas gerais, a técnica é a seguinte: em pombos adultos de uma determinada raça e cuja diferença de peso não seja superior a 10 gs., por ex., entre 250 e 260 gs., injetam-se 2 ccs. da solução cuja toxicidade se deseja dosar e verifica-se a dose que matou o pombo em 10', com uma diferença de mais ou menos 1'.

Injetam-se então com esta dose mortal mais cinco pombos e verificam-se os tempos de morte dentro dos limites já citados (de mais ou menos 1 minuto). Si mais 4 pombos morrem dentro do limite a dose injetada é a D.M.L..

Quando fôr necessario usar diferentes raças faz-se mister observar a equivalencia entre elas para eliminar a causa de erro devido á diferença de resistencia entre as raças.

*Actividade coagulante:* Tambem para esta prova adicionamos NaCl ao liquido filtrado na proporção de 8,5 ‰ para evitar a hemolise. Determinamos então a quantidade de veneno expressa em gama ( $\gamma$ ) capaz de coagular exatamente em 10 minutos e na temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , a mistura de 2,5 ccs. de sangue oxalato de cavalo, na concentração de 0,21% mais 0,5 cc. de soro fisiologico, considerando o sangue coagulado ao primeiro aparecimento do coagulo (7).



Expressamos em mgs. os resultados nos Quadros. Nos Graficos I e II empregamos logaritmos de  $\frac{\text{mgs.}}{1000}$  — ou  $\gamma$

*Atividade proteolitica:* Medimos a atividade proteolitica, usando a mesma tecnica que no trabalho sobre a "Protease do veneno da *Bothrops jararaca*" (8).

Como o pH otimo de atividade da protease deste veneno é 8, segundo nossas determinações, trabalhamos somente neste pH.

A tecnica usada foi a de IYENGAR, SEHRA & MUKHERJEE (9) com ligeiras modificações. Usamos como *substratum* uma solução de caseinato de sodio a 2% e realizamos a proteolise da seguinte forma:

Num tubo graduado de 10 ccs. colocamos 5 ccs. de caseinato, ajustado ao pH 8 com NaOH N/10, juntamos 2 ccs. de "buffer" pH 8, 1 cc. da solução do veneno e completamos a 10 cc. com H<sub>2</sub>O bidistilada, pH 6,2.

Assim, a concentração total do caseinato é de 1% e do veneno 0,1%.

Retiramos inicialmente 2 ccs. do todo, e precipitamos com 5 ccs. de acido tricloroacetico a 10%, filtramos e dosamos o nitrogenio não proteico inicial por micro-Kjeldahl. Juntamos então ao tubo de proteolise 0,05 cc. de toluol como antisseptico e incubamos em estufa durante 24 horas a 35°C, a temperatura otima que determinamos para esta protease. Ao fim deste tempo, retiramos novamente 2 ccs. do todo, precipitamos por 5 ccs. de acido tricloroacetico a 10%, filtramos e dosamos o aumento do nitrogenio não proteico.

#### b) Aquecimento de solução

Em nossas experiencias empregamos veneno de *Bothrops jararaca* dessecado em estufa a 37°C, em solução 1% em agua bidistilada pH 6,2 ao invés de em solução 8,5% de NaCl com o fim especial de abstrair de nossas experiencias a ação do NaCl sobre a atividade proteolitica do veneno.

Como a solução é usada imediatamente, não ha causa de erro com a precipitação das globulinas do veneno pela agua distilada e que se observa mais ou menos 6 dias após a dissolução. Medimos então as suas atividades toxica, coagulante e proteolitica iniciais pelos processos já descritos.

Tomamos 50 ccs. desta solução para cada prova, aquecemos em banho-maria só até atingir as temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90°C, e, até a ebulição (mais ou menos 98°C em São Paulo) e em cada uma destas temperaturas por 5, 10, 15 e 30 minutos, completando com H<sub>2</sub>O bidistilada aquelas em que houve modificação de volume. A partir de 60°15' observamos uma turvação pela coagulação das proteínas.



Para as provas a 100°, 110° e 120°C usamos uma outra solução (tambem 50 ccs. para cada prova) e aquecemos só por 15' em autoclave pelas dificuldades que apresenta a retirada imediata do material.

Centrifugamos cada prova durante 30', filtramos e verificamos as suas atividades toxica, coagulante e proteolitica pelos metodos atrás citados.

### DISCUSSÃOS DOS RESULTADOS

Pelas nossas experiencias, pudemos constatar que a influencia da temperatura sobre o veneno de *Bothrops jararaca* depende de varios fatores, como já dissemos. NOGUCHI já observara que a ação do calor sobre o veneno seco era muito pequena, podendo ser aquecido a 130°C sem perder a toxicidade. Realizamos este aquecimento durante 1 hora com veneno dessecado em estufa a 37°C (a 130°C em estufa) e observamos, tal como NOGUCHI, que o veneno de Jararaca nada perdeu na sua atividade toxica e nem tambem na coagulante e na proteolitica. Aquecemô-lo ainda a 140°, 150°, 160°, 170° e 180°C por 1 hora (Quadro I).

QUADRO I

<i>Temperatura</i>	<i>Poder toxico (mgs. veneno)</i>	<i>Poder coagulante (mgs. veneno)</i>	<i>Poder proteolitico (mg. N%)</i>
Ambiente	0.062	0.005	121
130°C	0.063	0.005	121
140°C	0.109	0.005	108
150°C	0.110	0.008	107
160°C	20.000	1.000	78
170°C	20.000	1.800	45
180°C	—	—	5

+ Tempo fixo — 1 hora.

Verificamos, entretanto, que a dissolução do veneno (em agua bidistilada pH 6,2), depois de aquecido, é bem mais dificil, e, tanto mais quanto mais elevada a temperatura, devido, provavelmente, a uma desnaturação das proteínas inertes e a sua côr vai se tornando cada vez mais escura, passando do amarelo vivo até ao marrom.

A 180°C, finalmente, a parte mais soluvel é a corante, deixando insolúvel o residuo de substancia marrom. Este soluto feito do veneno após aquecimento a 180°C, por 1 hora, não é toxico ao pombo (2 ccs. por via venosa) nem coagulante e nem proteolitico. Já, porém, com o veneno dessecado em alto vacuo



realizamos aquecimentos a 170° e 180°C por 1 hora, notando maior resistencia deste, até 170°C (Quadro II).

QUADRO II

<i>Temperatura</i>	<i>Poder toxico</i> (mgs. veneno)	<i>Poder coagulante</i> (mgs. veneno)	<i>Poder proteolitico</i> (mg. N%)
170	16.000	0.800	11
180	—	—	8

+ Tempo fixo — 1 hora.

Verificamos ainda que este veneno embora seja inativado tambem a 180°C apresenta maior facilidade na dissolução e uma coloração apenas amarelo-carregada, sem o aspecto de veneno queimado tal como observamos no veneno dessecado em estufa a 37°C.

Em se tratando entretanto de soluções de veneno, a influencia da temperatura já se faz sentir desde 40°C (Quadro III), dependendo do tempo de aqueci-

QUADRO III

TEMPERATURAS	PODER TOXICO (mgs. veneno)					PODER COAGULANTE (mgs. veneno)					PODER PROTEOLITICO (mgs. N. %)				
	0.069					0.005					137				
	Só até atingir	5'	10'	15'	30'	Só até atingir	5'	10'	15'	30'	Só até atingir	5'	10'	15'	30'
40° C	0.070	0.072	0.102	0.104	0.112	0.007	0.007	0.008	0.009	0.009	137	121	112	108	102
50° C	0.048	0.128	0.130	0.185	0.188	0.008	0.011	0.013	0.015	0.021	135	133	133	105	104
60° C	0.200	0.570	0.600	0.772	1.000	0.015	0.400	0.500	0.500	0.500	125	111	109	106	105
70° C	1.900	2.000	3.200	3.600	4.000	0.035	0.050	0.500	0.500	0.600	117	35	29	28	24
80° C	2.000	3.400	5.000	8.200	14.300	0.055	0.260	0.500	0.600	1.000	28	18	18	18	10
90° C	2.000	3.600	8.000	10.000	20.000	0.120	0.700	0.800	1.000	2.500	25	14	12	8	5
Ebulição	2.000	4.500	9.500	18.000	20.000	0.160	1.500	1.800	2.000	3.500	21	12	12	10	7

mento, conquanto apresente algumas anomalias quanto à perda progressiva de atividade em função do aumento de temperatura e do tempo de aquecimento.



Assim é que no Grafico I, na curva em que expressamos as atividades do veneno, após aquecimento só até atingir as diversas temperaturas, observamos uma ativação do poder toxico a 50°C e logo a 60°C uma atenuação acentuada e a 70°C uma queda brusca desta atividade que, então, pouco se altera até à ebulição.

Grafico I

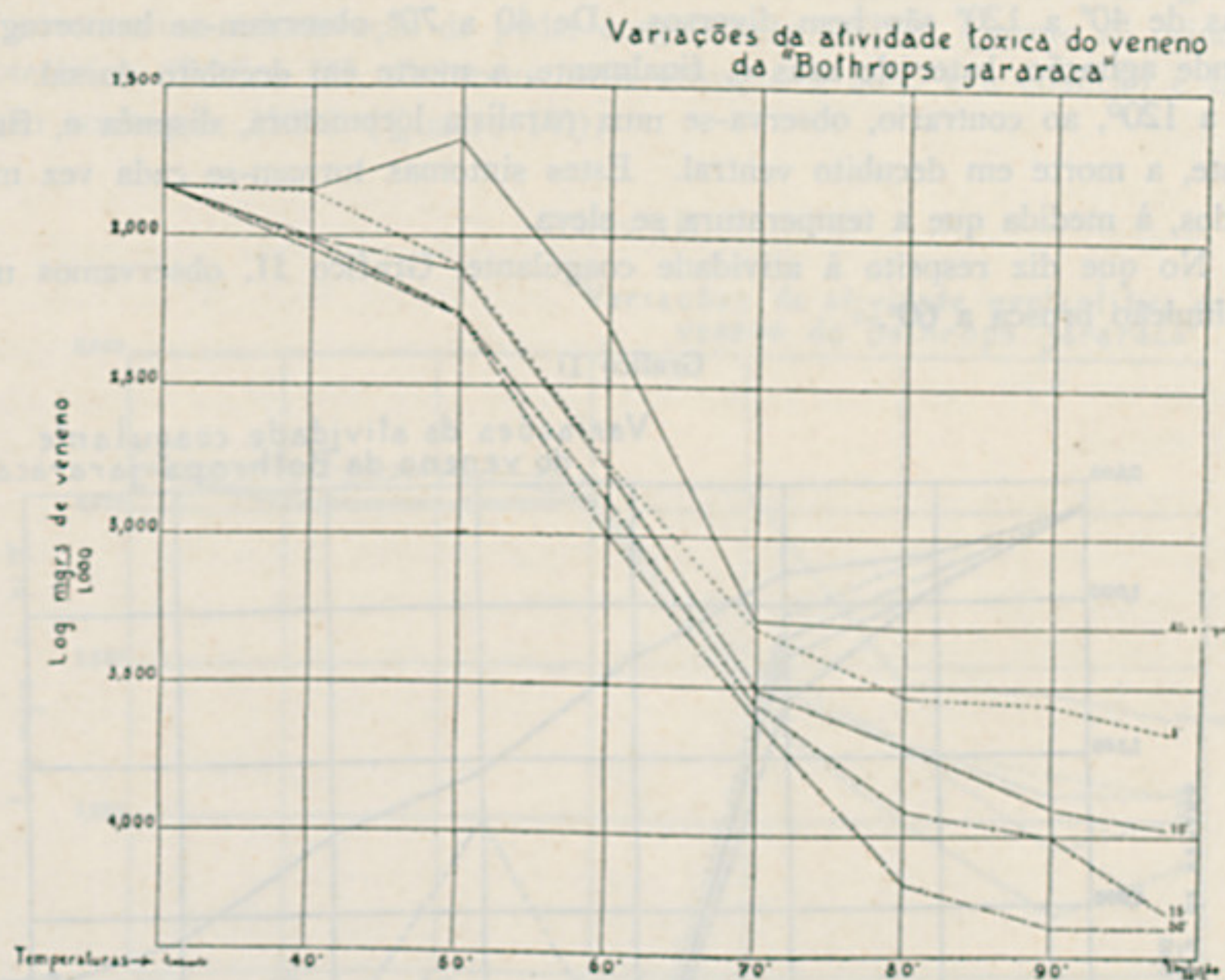


Grafico I

A perda total da toxicidade só se dá a 110°C por aquecimento durante 15' (Quadro IV).

QUADRO IV

Temperatura	Poder toxico (mgs. veneno)	Poder coagulante (mgs. veneno)	Poder proteolitico (mg. N%)
Ambiente	0,051	0,002	134
100°C	19,500	2,500	7
110°C	—	—	2
120°C	—	—	—

+ Tempo fixo — 15'.



Acreditamos, apesar de termos trabalhado em condições diferentes, que VITAL BRAZIL & RANGEL PESTANA (4), ao constatarem uma perda da atividade toxica deste veneno a 70°C, referiam-se não a uma perda total, mas, justamente a esta queda brusca de atividade que também observamos nesta temperatura.

Julgamos interessante consignar aqui, não obstante fora da alçada deste estudo, que os sintomas mortais nos pombos injetados com estas soluções aquecidas de 40° a 120° são bem diversos. De 40 a 70° observam-se hemorragias, grande agitação, bater de azas e, finalmente, a morte em decubito dorsal. De 70° a 120°, ao contrario, observa-se uma paralisia locomotora, dispnéa e, finalmente, a morte em decubito ventral. Estes sintomas tornam-se cada vez mais nitidos, à medida que a temperatura se eleva.

No que diz respeito à atividade coagulante. Grafico II, observamos uma diminuição brusca a 60°.

Grafico I)

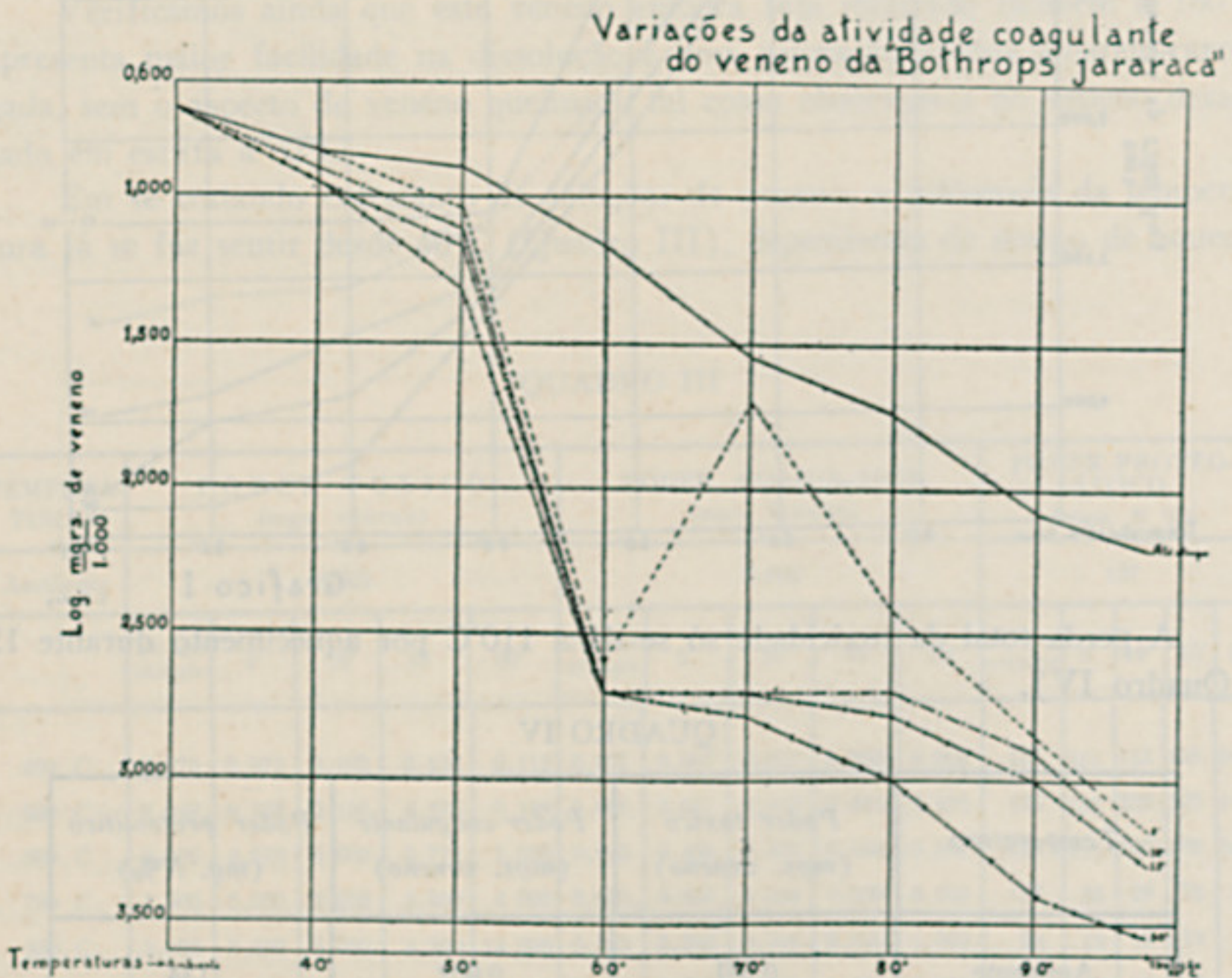


Grafico II

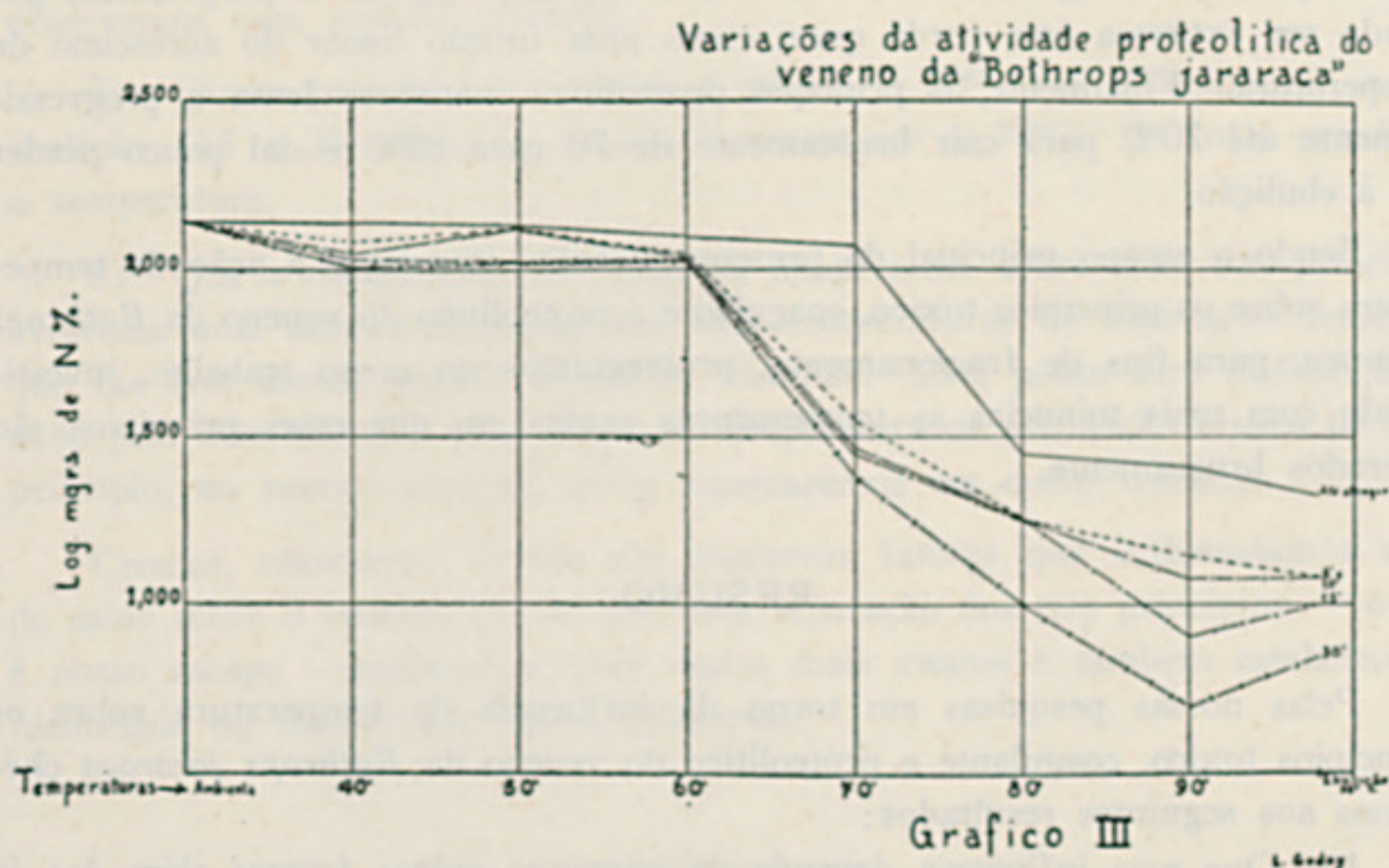
HOUSSAY, SORDELLI & NEGRETE (2) já haviam também constatado uma perda subita das atividades toxica e coagulante entre 60 e 70°C. Esses autores falam, entretanto, do reaparecimento destas propriedades, embora atenuadas, do



veneno por aquecimento a 80 ou 90°C. Em nossas experiencias, mesmo por ebulição durante 30', o veneno não perdeu totalmente nenhuma de suas atividades, entretanto, não pudemos tambem observar uma ativação dos poderes toxico ou coagulante por aquecimento a 80 ou 90°C.

Obtivemos entretanto uma notavel ativação do poder coagulante a 70°C e uma pequena ativação da toxicidade a 50°C, como já dissemos. No Quadro IV constatamos a inativação do poder coagulante a 110°C. Quanto ao principio proteolitico, Grafico III, obtivemos uma ativação a 50°C e à ebulição e inativação tambem a 110°C (Quadro IV).

Grafico III



Está fóra de duvida que a atenuação das diversas atividades é função tambem do tempo de aquecimento.

Observamos no Quadro III que o veneno aquecido só até atingir à temperatura de 40°C, por exemplo, é toxico para o pombo com 0 mg. 070, enquanto que com um aquecimento à mesma temperatura por 30' são necessarios 0 mg. 112 de veneno para matar o pombo.

Já o poder coagulante, conquanto haja sofrido tambem uma atenuação esta foi mais branda, passou de 0 mg. 007 por aquecimento só até atingir a 40°C para 0 mg. 009 após aquecimento a 40°C durante 30'.

O poder proteolitico sofreu uma atenuação mais acentuada do que o coagulante. Passou de 137 mgrs. N% para 102 mgrs. N% nas mesmas condições anteriores.



Além dos fatos já citados, devemos ainda frisar, quanto à influencia da temperatura sobre o veneno da *Bothrops jararaca*, que todas as atividades sofrem uma atenuação com o aumento de temperatura, salvo nos casos já citados e que é função do tempo de aquecimento. A atividade toxica cai bruscamente de 50 para 70°C, a coagulante de 50 para 60°C e a proteolitica de 60 para 70°C, exceto com o aquecimento só até atingir às diversas temperaturas em que observamos a queda brusca da atividade proteolitica a 80°C.

Aliás, a comparação das curvas referentes às temperaturas só até atingir, mostra-nos claramente que a temperatura age de modo diverso sobre estes tres principios. O principio toxico permanece inalteravel até 40°C, ativa-se a 50°C e cai bruscamente até 70°C e, praticamente, nada perde até à ebulição (98°C).

O principio coagulante sofre uma desnaturação regular e progressiva, podendo ser expressa esta perda quasi como uma função linear do acrescimo de temperatura. Finalmente, o principio proteolitico inativa-se lenta e progressivamente até 70°C para cair bruscamente de 70 para 80°C e daí pouco perder até à ebulição.

Sendo o escopo principal do presente trabalho investigar a ação da temperatura sobre os principios toxico, coagulante e proteolitico do veneno da *Bothrops jararaca*, para fins de fracionamento, prosseguimos no nosso trabalho, investigando com mais minucias as temperaturas exatas em que esses principios são alterados bruscamente.

## RESUMO

Pelas nossas pesquisas em torno da influencia da temperatura sobre os principios toxico, coagulante e proteolitico do veneno da *Bothrops jararaca* chegamos aos seguintes resultados:

1) Que essa influencia depende de inumeros outros fatores além dos já observados por Vital Brazil e Rangel Pestana (qualidade do veneno, tempo de aquecimento e grau de diluição), isto é:

- a) do modo como foi dessecado o veneno, si em estufa a 37°C ou em alto vacuo a baixa temperatura;
- b) do pH da agua em que foi dissolvido;
- c) do modo como foi aquecido — si a fogo direto ou indireto;
- d) si o aquecimento foi realizado sobre o veneno seco ou em solução.

2) Que o veneno dessecado em estufa a 37°C e aquecido seco só é totalmente inativado à temperatura de 180°C.



3) Que o veneno dessecado em estufa a 37°C e em solução 1% em água bidistilada pH 6,2 (como realizamos todo o nosso trabalho) é inativado totalmente à temperatura de 110°C.

4) Que, nas soluções, a influência da temperatura já se faz sentir sobre os princípios tóxico, coagulante e proteolítico a partir de 40°C, dependendo do tempo de aquecimento.

5) Que o princípio tóxico é ativado a 50°, num aquecimento só até atingir essa temperatura, a 60°C sofre uma atenuação e a 70°C uma queda brusca desta atividade, nada mais perdendo até a ebulição.

6) Que o princípio coagulante diminui bruscamente a 60°C, mas a 70°C observamos uma notável ativação.

7) Que o princípio proteolítico é ativado a 50° (5 e 10 minutos), e por ebulição (15 e 30 minutos), caindo bruscamente a 70°C. É mais resistente à temperatura.

8) Que a comparação das ações da temperatura sobre estes três princípios evidencia uma notável diferença nas suas temperaturas de atenuação brusca, o que faz crer serem aquelas entidades distintas. Este ponto será melhor elucidado pela determinação mais exata da temperatura de atenuação brusca de cada princípio, no veneno integral, como mostraremos em outro trabalho.

Creemos, entretanto, devido aos inúmeros fatores que influenciam a ação do calor sobre o veneno, que só por uma separação dos três princípios — o que é nosso escopo — poderemos obter dados mais exatos e também estabelecer a identidade ou diversidade destes princípios.

#### ABSTRACT

Our experiments studying the effect of the temperature on the toxic, clotting and proteolytic principles of the *Bothrops jararaca* venom led us to the following results:

1. That this effect depends on various other factors, besides those already stated by Vital Brazil and Rangel Pestana (quality of the venom, heating period and degree of dilution), that is:

a) the method of dehydration of the venom, if in the drying oven at 37°C or at low temperature and high vacuum;

b) the pH of the water in which it has been dissolved;



- c) the method of heating — if applying direct or indirect heat;
  - d) if the heating of the venom has been carried on in dry state or in solution.
2. That the venom dehydrated in the drying oven at 37°C. and heated in dry state loses its activity completely only at 180°C.
  3. That the dehydrated venom in the drying oven at 37°C. and in 1% aqueous solution of bi-distilled water at pH 6.2 (as employed in all our experiments) is completely inactivated at 110°C..
  4. That, when in solution, the temperature effect influences the toxic, clotting and proteolytic principles from 40°C. on, depending on the heating period.
  5. That the toxic principle is activated at 50°C. heating being ceased as soon as this temperature is reached; at 60°C. it undergoes a decrease and at 70°C. an abrupt drop occurs, no other alteration being observed until the boiling point.
  6. That the clotting principle activity drops suddenly at 60°C., at 70°C. a remarkable activation has been noticed when heated for 5 minutes.
  7. That the proteolytic principle is activated at 50°C. (5 and 10 minutes) and at the boiling point (15' and 30') and suffers a sudden drop at 70°C.. It is more thermo-resistant.
  8. That a comparison of the effects of the temperature on these three principles shows a noticeable difference at the temperatures at which a sudden drop of their activity is observed, what makes us believe that these three principles are distinct entities. This fact will be better elucidated on determining the exact temperature at which each principle in the whole venom undergoes an abrupt decrease, as we shall show in another paper.

We believe, however, that on account of the numerous factors that influence the effect of the heat on the venom, only by a separation — our scope — we shall be able to secure exact data and also establish an identity or diversity of these principles.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen über den Temperatur-Einfluss auf die toxischen, koagulierenden und proteolytischen Wirkungen des Giftes der "Bothrops jararaca" führten uns zu nachstehenden Schlussfolgerungen:



1. Dieser Einfluss hängt ausser denen, schon von Vital Brazil und Rangel Pestana beobachteten (Qualität des Giftes, Erhitzungszeit und Verdünnungsgrad) noch von vielen anderen Faktoren ab, die da sind:

a) Trocknungsweise, ob bei 37°C im Trockenschrank oder bei niedriger Temperatur im Hochvakuum;

b) Die Wasserstoffionenkonzentration des Wassers, in dem das Gift gelöst wird;

c) Die Erhitzungsweise, ob direkt oder indirekt;

d) Ob die Erhitzung eines trockenen oder eines sich in Lösung befindenden Giftes erfolgt.

2. Ein bei 37°C im Trockenschrank getrocknetes Gift wird, wenn als Trockensubstanz erhitzt, erst bei 180°C vollständig inaktiviert.

3. Ein bei 37°C im Trockenschrank getrocknetes Gift wird, wenn in 1% Lösung in bi-destiliertem Wsser (pH 6,2) erhitzt wird (unsere Untersuchungen sind so ausgeführt worden) bei 110°C vollständig inaktiviert.

4. In Lösungen ist der Temperatur-Einfluss auf die toxische, koagulierende und proteolytische Wirkung bei 40°C bemerkbar, jedoch abhängig von der Erhitzungszeit.

5. Die toxische Wirkung wird bei 50°C aktiviert, falls bis zu dieser Temperatur erhitzt wird; bei 60°C erleidet die Aktivität eine Verminderung und bei 70°C fällt sie plötzlich, ohne bis zur Erreichung der Siedetemperatur einen weiteren Verlust zu erfahren.

6. Die koagulierende Wirkung fällt plötzlich bei 60°C und aktiviert sich bemerkenswerter Weise bei 70°C, wenn 5 Minuten erhitzt wird.

7. Die proteolytische Wirkung wird bei 50°C (5 und 10 Minuten) und bei Siedetemperatur (15-30 Minuten) aktiviert, fällt plötzlich bei 70°C und ist temperaturbeständiger.

8. Da die Vergleichung des Temperatur-Einflusses auf die drei Wirkungen deutlich einen bemerkenswerten Unterschied in der plötzlichen Verminderung der Aktivität durch die Temperatur zeigt, glauben wir, dass es sich um verschiedene Prinzipien handelt. In weiteren Untersuchungen werden wir die genauen Temperaturen der plötzlichen Verminderung der Aktivität jeder dieser drei Wirkungen im Gesamt-Gift bestimmen und so diesen Punkt besser aufklären.

Da die Wirkung der Temperatur auf das Gift von vielen Faktoren beeinflusst wird, nehmen wir an, nur durch eine Trennung der drei Wirkungen —



unser Ziel — genauere Angaben zu bekommen und die Gleichheit oder Verschiedenheit dieser Wirkungen festzustellen.

## BIBLIOGRAFIA

1. Calmette, A. — Les venins: 16 e 215.1907.
2. Houssay, B. A.; Sordelli, A. & Negrete, J. — Rev. Inst. Bact. Bs. Aires 1(5):565.1918.
3. Noc, F. — Ann. Inst. Pasteur 18(1):387.1904.
4. Brazil, Vital & Rangel Pestana, B. — Coletanea de Trabs. Inst. Butantan 1:151.1901-17.
5. Noguchi, H. — Cit. in Phisalix, Marie — Animaux Venimeux et Venins 2:478.1922.
6. Taborda, Armando — Nota previa apresentada à Soc. de Biologia de S. Paulo, sessão de 8-2-940 (Comunicado pessoal do autor).
7. Taborda, Armando — Memorias Instituto Butantan 13:431.1939.
8. Taborda, Armando & Taborda, Laura C. — Trabalho apresentado à Soc. de Biologia de S. Paulo, sessão de 8-2-940.
9. Iyengar, N. K.; Schra, K. B. & Mukerjee, B. — Indian J. of Med. Res. 26(2):487.1938.

(Trabalho da Secção de Quimica e Farmacologia Experimentais, apresentado à Soc. de Biologia de S. Paulo em 8-2-940. Dado à publicidade em dezembro de 1940).