

ESTUDO QUANTITATIVO DA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO  
ENTRE O ANTIVENENO CROTÁLICO E UMA FRAÇÃO  
PURIFICADA DO VENENO DA CASCAVEL NEOTRÓPICA  
(*CROTALUS T. TERRIFICUS*) (\*)

POR OTTO G. BIER

(Do Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Em trabalho anterior (1), apresentamos alguns dados quantitativos referentes ao N precipitado de uma quantidade constante de antiveneno crotálico em presença de quantidades crescentes do veneno correspondente. Verificou-se, então, que o decurso da reação é muito semelhante ao que se observa no sistema toxina-antitoxina diftérica, não tendo sido possível, entretanto, calcular a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno, a qual só pode ser avaliada indiretamente, admitindo-se a hipótese de que a fração do veneno precipitado correspondia á *crotoxina* de Slotta *et al* (2), existente na proporção de 60% do veneno bruto.

Prosseguindo nesta ordem de pesquisas, são referidos no presente trabalho os resultados das análises dos precipitados formados pelo antiveneno crotálico mediante a adição de quantidades crescentes de uma fração purificada, electroforeticamente homogênea, do veneno da *C. terrificus*.

MATERIAL E MÉTODOS

*Purificação do veneno.* Para a purificação do veneno foi utilizado um processo baseado na precipitação em pH próximo do ponto isoelétrico (4.4 a 4.6), tal como o usado por Slotta & Fraenkel-Conrat (2) para o preparo da *crotoxina* amorfa.

1 g. de veneno crotálico seco, antigo, do estoque do Instituto Butantan, foi dissolvido em 12 ml de sol. N/10 de HCl, do que resultou um soluto opalescente,

---

(\*) Trabalho realizado no Dept. of Medicine & Biochemistry, College of Physicians & Surgeons, Columbia University, New York, com a ajuda de uma bolsa da "John Simon Guggenheim Memorial Foundation".

ao qual se adicionaram 84 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Após uma noite a 0°C separou-se por centrifugação o precipitado existente e ao sobrenadante, cujo pH era 4.37, adicionou-se suficiente sol. N/1 de NaOH para elevar o pH a 4.6 (electródios externos imersos na solução). Adicionando-se 2 ml de álcool etílico e resfriando-se o soluto por imersão do frasco em água com gelo picado, desenvolveu-se imediatamente abundante precipitação. Depois de uma noite na geladeira, foi o precipitado separado por centrifugação em câmara fria e dissolvido em 10 ml de sol. 4% de NaCl, com a adição de gotas de sol. N/10 de NaOH, de maneira a assegurar um pH final próximo de 7.0.

A seguir foi o soluto transferido para um tubo de celofane e dialisado contra 500 ml de sol. 4% de NaCl tamponada com fosfatos a pH 7.4, com mudança diária do líquido de diálise, durante 4 dias, a 0°C. O soluto dialisado, após centrifugação enérgica em centrífugo de ângulo, deixou separar apenas um pequeno resíduo insolúvel e um líquido sobrenadante perfeitamente límpido. Teor de N (micro-Kjeldahl): 1.44 mg por ml, ou seja, em proteína, 0.9%.

*Verificação da pureza da fração isolada.* O soluto acima foi analisado electroforéticamente em aparelho tipo Tiselius (3): apenas 1 componente foi observado.

*Determinação da toxicidade.* Feita mediante a injeção intraperitoneal em camundongos de 15-20 g. Nestas condições, a nossa solução de "crotoxina" (\*) mostrou uma D.L.M. compreendida entre 0.11 e 0.055 de gama, ao passo que uma solução de veneno bruto se mostrou capaz de matar os camundongos em dose próxima de 0.25 de gama. Convém salientar que tais determinações prescindem de rigor pois são baseadas em pequeno número de animais e é pertinente lembrar que os valores acima registrados não podem ser comparados aos observados por Slotta & Szyszka (4), que utilizaram a via subcutânea.

*Análise dos precipitados específicos.* Quantidades crescentes de "crotoxina", representadas por 1 ml de diferentes diluições foram adicionadas a uma série de tubos contendo 1 ml de sôro anti-crotálico (antiveneno do Instituto Butantan, cavalo n.º 213; 10 ml — 9 mg de veneno). Após 24 horas ou mais de permanência na geladeira, foram os precipitados separados por centrifugação em centrífuga refrigerada e lavados três vezes com porções de 3 ml de água fisiológica gelada.

---

(\*) Por economia de expressão a palavra "crotoxina" será usada para denotar a fração purificada do veneno crotálico referida no presente trabalho. A identidade entre esta fração e a proteína obtida em estado cristalino por Slotta *et al.* requer, todavia, verificações adicionais.

As determinações de N foram feitas por uma modificação do método micro-Kjeldahl, recebendo-se a amônia acarretada por uma corrente de vapor d'água em solução de ácido bórico com indicador e titulando-se diretamente com HCl N/70. Análises em duplicata, tolerando-se apenas diferenças de 10 a 15 gamas.

RESULTADOS

Pode-se ver na Tabela I que quantidades de "crotoxina" compreendidas entre 450 e 644 gamas deram valores de N precipitado praticamente iguais, isto é, com diferenças compreendidas dentro dos limites do erro experimental. Os tubos correspondentes a 700, 800 e 900 gamas de "crotoxina" não deram valores satisfatórios para as análises em duplicata, o que se deve, sem dúvida, ao fato que, na zona de inibição por excesso de antígeno, a precipitação não é completa após uma noite de permanência na geladeira.

Com efeito, os sobrenadantes dos tubos correspondentes a 800 e 900 gamas eram distintamente opalescentes, e assim permaneceram mesmo quando se prolongou a 2 horas o tempo de centrifugação.

TABELA I

*Floculação quantitativa do soro crotálico 213 por quantidades crescentes de "crotoxina", após uma noite a 0°C.*

"Crotoxina"		N/70 HCl		N precipitado por 1 ml de soro	N-antiveneno	Ratio N-antiveneno N-veneno
proteína	N					
gamas		ml		gamas	gamas	
450	72	4.94	4.90	984	912	12.6
500	80	5.08	5.14	1022	942	11.8
550	88	5.06	5.00	1006	918	10.4
600	96	4.96	4.92	988	892	9.3
700	112	4.75	4.37			
800	128	2.93	2.04			
900	144	.16	.40			

Uma segunda série de determinações foi, por isso, efetuada deixando-se completar a precipitação durante oito dias na geladeira (tabela II).

TABELA II

*Floculação quantitativa do soro crotálico 213 por quantidades crescentes de "crotoxina", após 8 dias a 0°C.*

"Crotoxina"		N/70 HCl		N precipitado por 1 ml de soro	N-antiveneno	Ratio N-antiveneno N-veneno
proteína	N					
gamas		ml		gamas	gamas	
50	8	0	0	0		
100	16	0	0	0		
150	24	.02	.02	40		
200	32	.11	.08	190		
300	48	3.29	3.34	663		
400	64	4.55	4.56	911	847	13.2
600	96	4.90	4.84	974	878	9.15
700	112	4.56	4.60	916	804	7.18
800	128	3.74	3.82	756		
900	144	1.73	1.66	339		

## DISCUSSÃO

Os resultados combinados das experiências referidas nas tabelas I e II vêm resumidos no gráfico N.º 1. A precipitação prolongada na geladeira, durante 8 dias permitiu estabilizar os valores de N-precipitado na zona de inibição por excesso de antígeno (700, 800 e 900 gamas de "crotoxina") e, presumivelmente, também na zona de inibição por excesso de anticorpo (150, 200 e 300 gamas). Os valores correspondentes aos pontos próximos da zona de equivalência (400 e 600 gamas) formam uma série coerente nas duas séries de experiências e, no que concerne a um ponto comum determinado em ambas as séries (600 gamas), os valores obtidos para o N precipitado (988 e 974 gamas) estão compreendidos dentro dos limites de erro do método analítico empregado.

Há bom fundamento para afirmar-se que a zona de equivalência para o antiveneno estudado é muito próxima de 500 gamas de "crotoxina" per 1 ml de soro. Com efeito, o máximo de N precipitado se observou com 500 e 550 gamas de "crotoxina" e, por outro lado, determinações feitas usando-se uma quantidade constante de veneno (1 ml de uma solução contendo 45 gamas de "crotoxina") em presença de quantidades variáveis de antiveneno, mostraram um ótimo de floculação, segundo Ramon, após um tempo de incubação de 20

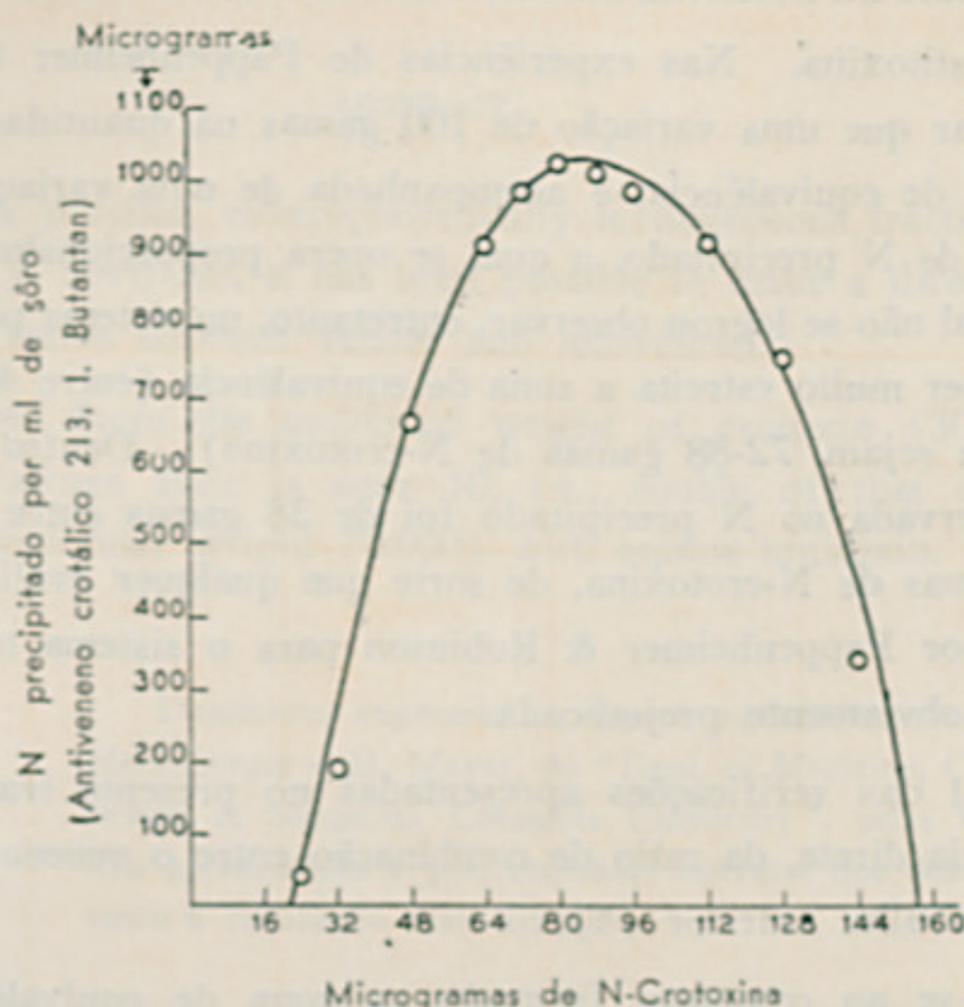


GRÁFICO N.º 1

minutos á temperatura de 56°C, nos tubos correspondentes a 0,08 e 0.1 de soro. Tomando-se como valor médio, 0,09 ml de soro para 45 gamas de "crotoxina", cada ml de soro corresponderá a  $\frac{45}{0,09} = 500$  gamas de "crotoxina".

Verificações de toxicidade nos sobrenadantes foram feitas mediante a injeção de 0.5 ml no peritônio de camundongos de 15-20 g: ausência de "crotoxina" livre nos sobrenadantes correspondentes a 150, 400 e 600 gamas; morte imediata do animal injetado com o sobrenadante do tubo contendo 900 gamas de "crotoxina".

Mesmo em se admitindo, porém, uma zona de equivalência mais extensa, entre 450 e 600 gamas, as ratios observadas variam apenas entre 12.6 e 9.3 (ou 9.15) e confirmam, pois, as observações feitas anteriormente com soluções de veneno bruto (1).

No presente trabalho tais ratios foram calculadas diretamente dos valores de N dosados numa solução de "crotoxina" electroforeticamente homogênea.

Não foi possível, a exemplo do que fizeram Pappenheimer & Robinson (5) com a toxina diftérica, determinar por via imunológica a homogeneidade do antígeno utilizado, a partir dos valores de N precipitados de uma quantidade

constante de antitoxina. Nas experiências de Pappenheimer & Robinson foi possível observar que uma variação de 100 gamas na quantidade de N-toxina, dentro da zona de equivalência, é acompanhada de uma variação total de 100 gamas no teor de N precipitado, a qual se opera proporcionalmente á variação do antígeno. Tal não se logrou observar, entretanto, no sistema por nós estudado, em virtude de ser muito estreita a zona de equivalência (entre 450 e 550 gamas "crotoxina", ou sejam, 72-88 gamas de N-crotoxina). Dentro de tais limites, a variação observada no N precipitado foi de 38 gamas entre 72-80 e de 16, entre 80-88 gamas de N-crotoxina, de sorte que qualquer avaliação no sentido daquela feita por Pappenheimer & Robinson para o sistema toxina-antitoxina diftérica ficou obviamente prejudicada.

O essencial das verificações apresentadas no presente trabalho é a confirmação, por via direta, da ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno sugerida em trabalho anterior (\*).

Atribuindo-se ao composto formado na zona de equivalência a composição molecular  $GA_2$ ; ao antiveneno, o pêso molecular de 180.000 (o mesmo da antitoxina diftérica, não digerida, de cavalo) e á "crotoxina", o pêso molecular de 30.500 (\*\*), a ratio esperada é de  $(2 \times 180.000) : 30.500 = 11.8$ , que foi exatamente aquela observada no ponto de equivalência.

#### RESUMO E CONCLUSÕES

1. Usando uma fração purificada, electroforeticamente homogênea, do veneno da *Crotalus t. terrificus*, foi possível determinar diretamente a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno crotálico.

2. Como se podia esperar, em virtude do pêso molecular da "crotoxina" (30-33000), tal ratio é próxima de 10, isto é, dupla daquela observada para a toxina diftérica (pêso molecular, 70.000).

---

(\*) Uma revisão dos cálculos apresentados em (1) leva a uma pequena correção, em virtude de se ter atribuído o valor de 0.78 mg (e não de 0.88 mg) á quantidade de veneno crú contida per ml do soluto de veneno empregado naquelas experiências. Tal correção modifica apenas ligeiramente os valores obtidos para a ratio na zona de equivalência, os quais persistem muito próximos de 10, sem alterar, portanto, as conclusões apresentadas.

(\*\*) Segundo as verificações de Gralén & Svedeberg (6).

ABSTRACT

1. By using a purified, electrophoretically homogeneous fraction from the venom of *Crotalus t. terrificus*, it has been possible to make a direct evaluation of the combining ratios between venom and antivenom.

2. As expected from the molecular weight of crotoxin (30-33000) the ratio at the equivalence zone is near 10, i.e., double of that observed for diphtheria toxin (molecular weight 70.000) with equine antitoxin.

Desejamos expressar os nossos agradecimentos aos Drs. M. Heidelberger e M. Mayer, do "Dept. of Medicine, College of Physicians & Surgeons, Columbia University", pelas valiosas sugestões apresentadas e pelo constante interesse que demonstraram durante a realização deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. Bier, O. G. — Estudo quantitativo da reação de floculação entre o veneno e o anti-veneno crotálico, *Memórias do Instituto Butantan*, 18:27-32, 1945.
2. Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L. — Estudos químicos sobre os venenos oídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel, *Memórias do Instituto Butantan*, 12:505-512, 1939.
3. Bier, O. G. & Moore, D. — Resultados não publicados.
4. Slotta, C. H. & Szyszka, G. — Estudos químicos sobre venenos ophidicos. 1. Determinação de sua toxicidade em camundongos, *Memórias do Instituto Butantan*, 11:109-119, 1937.
5. Pappenheimer, A. M. Jr. & Robinson, E. S. — Quantitative study of Ramon diphtheria flocculation reaction, *J. Immunol.*, 32:291-300, 1937.
6. Gralén, N. & Svedeberg, T. — The molecular weight of crotoxin, *Biochem. J.*, 32:1375-1377, 1938.

