

DOSAGEM COMPARADA DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS  
GLANDULARES E DO VENENO PURO DE *PHONEUTRIA*  
*NIGRIVENTER* (Keyserling), 1891 (\*)

POR WOLFGANG BÜCHERL

(*Laboratório de Zoologia Médica, Instituto Butantan*)

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes humanos, provocados pela picada de *Phoneutria nigriventer* (\*), da família *CTENIDAE*, subfamília *CTENINAE*, costumam ser classificados pelos médicos clínicos em casos leves, de média gravidade, gravíssimos e fatais.

São nove os casos mortais, humanos, documentados por médicos competentes.

Vital Brazil e Jean Vellard (1) referem-se a 1 caso de morte de um homem de 40 anos, ocorrido em Itanhaém e relatado pelo Dr. Novais; de um menino de 7 anos que morreu 17 horas depois de picado e cujo caso foi publicado pelo Dr. Luiz Guimarães (2); mais um acidente, ocorrido em Jaú e relatado pelo Dr. Paulo Martins.

J. Vellard (3) comenta o acidente fatal de um menino de 10 anos, morto meia hora depois de picado. O fato foi relatado pelo Dr. Francisco Gusmão; o de uma moça, de Taubaté, que morreu 20 horas depois.

O facultativo Francisco Gusmão comunicou mais 3 casos de morte, ocorridos em Franca, dois de escravos de um fazendeiro e o terceiro de um preto adulto, que teve morte já depois de algumas horas após o acidente.

Flávio da Fonseca (4), interpretando os boletins de acidentados, enviados continuamente ao Instituto Butantan, encontrou um caso de morte apesar da soroterapia.

Entre os casos reconhecidamente *gravíssimos* e que devem somar a muito mais do que os fatais mencionados, cita o próprio Vellard (3) dois, por ele mesmo observados e que traduzem a resposta dramática do organismo humano à peçonha deste aracnídeo.

---

Entregue para publicação em 7.XI.53.

\*) *Phoneutria nigriventer* parece-nos idêntica a *Ph. fera*, como será demonstrado oportunamente.

Casos de *média gravidade* e *leves* são enumerados às *centenas*, tanto nos boletins sanitários, enviados ao Instituto, como tratados pelo próprio Hospital que o Butantan mantém para socorrer os acidentados por animal peçonhento.

Em face dêstes acontecimentos, não hesitaram Vital Brazil e seu colaborador Jean Vellard (5) em realizar experiências de laboratório, as mais variadas, tanto com a aranha *Phoneutria fera* como com *Phoneutria nigriventer* (por êles chamadas *Ctenus ferus* e *Ctenus nigriventer*, respectivamente). Estas pesquisas se estendiam durante os anos de 1925 e 1926; partiam de picadas diretas em animais de laboratório, de extratos de venenos, de venenos puros, em soluções e culminaram com a fabricação de um *sôro específico anti-ctenídico*.” (\*)

Pelo presente trabalho, pretende-se recapitular, de um lado, o que já foi feito pelos grandes mestres Vital Brazil e Jean Vellard e, por outro, quer-se contribuir para uma melhoria dos processos do doseamento das peçonhas, da própria imunização e da titulação dos sôros específicos.

## 2. OBTENÇÃO DAS GLÂNDULAS E DO VENENO PURO DE PH. NIGRIVENTER

Para a obtenção das glândulas inteiras, cheias de peçonha, segue-se ainda hoje o processo descrito em 1925 por Brazil e Vellard e que consiste em narcotizar as aranhas vivas; segurar com pinça denteada as bases das queliceras e, descrevendo-se um movimento para cima, puxar as mesmas. Obtêm-se, então, as duas glândulas presas às queliceras apenas pelo canal eferente do veneno.

Pode-se, então, separar as glândulas e triturá-las, sózinhas ou mesmo juntamente com as queliceras, em gral de vidro, adicionando-se, como solvente, água destilada com cloreto de sódio a 0,85%, em pH acidificado, neutro ou alcalino.

Quando se pretende trabalhar com grande número de glândulas, retiram-se estas, como foi descrito, e guardam-se em glicerina pura, a 3.º C de temperatura.

O processo do esmagamento total da glândula inteira, com ou sem os ferrões, fornece necessariamente extratos que, além da peçonha, contêm quantidades variáveis e incontroláveis de elementos estranhos, celulares, musculares, da quitina, etc..

Por êste motivo, almejaram já os próprios Brazil e Vellard por um método que permitisse obter sómente a peçonha, em estado tão puro quanto pos-

---

(\*) Sugerimos a substituição do nome “Soro anti-ctênico” pela de “anti-ctenídico” para incluir também o gênero *Phoneutria*.

sível e isento de substâncias proteiniformes estranhas. Idearam e realizaram, já em 1926, o seguinte processo: Extraíam-se as glândulas da maneira costumeira; lavavam-se as mesmas em água; secavam-se na estufa e quando sêcas, pesavam-se. Depois, imergiam-se em salina e após embebimento, espremiam-se de leve com um bastonete de vidro, indo o veneno naturalmente dissolver-se na salina; retiravam-se os envólucros vazios; secavam-se e repesavam-se. A diferença das duas pesadas dava a quantidade exata da peçonha obtida, conhecida através do volume determinado de líquido solvente.

Algum tempo mais tarde, modificou Jean Vellard (3) um detalhe deste processo, isto é, substituiu a expressão com bastonete pela secção da glândula com pequeno bisturi, conservando as duas pesadas.

A bem dizer, os pesquisadores obtiveram o veneno puro, mas apenas em soluções. As duas pesadas, uma vez com a glândula cheia, outra vez com ela vazia, também poderiam ter sido fontes de insegurança; finalmente, não se podia com este método fazer estoque de veneno puro, o que constituía certamente o inconveniente maior.

Em todo o caso, verificaram os autores que a média de veneno puro, por indivíduo, era em *Phoneutria fera* em torno de 4 mg e em *Phoneutria nigriventer* perto de 3,2 mg.

Elaborámos um *processo novo* que permite colher o veneno absolutamente puro, sem prejudicar a aranha, de maneira que a mesma pode ser "reextraída" cada 10 ou mesmo cada 5 dias, dando novamente uma determinada quantidade de peçonha.

Com duas pipetas longas, unidas em seus extremos por um tubo de borracha fina e elástica, antes lavado, esterilizado e completamente seco, irritam-se as aranhas, mantidas e alimentadas em pequenos viveiros; estas, dotadas de índole agressiva, não tardam a morder no tubo de borracha, perfurando-o com seus ferrões e depositando em seu interior duas gótas de veneno. Com um capilar colhe-se a peçonha, por ventura aderente à superfície externa do tubo, que se passa então à outra aranha, até que o interior do mesmo apresente bastantes gótas de veneno líquido. Desliga-se um terminal e assopra-se o veneno sobre uma placa rasa, antes bem lavada e seca. Finalmente espreme-se o resto da peçonha, por ventura aderente às paredes internas do tubo, sobre o mesmo vidro.

Seca-se o veneno em dessecador, em vácuo. Quando bem seco, pesa-se o veneno sobre um vidrinho de relógio, antes exatamente tarado. Obtém-se assim o veneno puro, em estado seco, exatamente ponderável em miligramas e que pode ser guardado em vácuo, sobre cloreto de cálcio, em ambiente escuro

ajuntando-se ao estoque a colheita de outras fracções da mesma peçonha, obtida por novas extrações das mesmas aranhas.

Este processo de *obtenção de veneno puro, seco*, além de permitir a estocagem e a colheita de maiores quantidades, possibilita igualmente *titulações experimentais rigorosas e reproduzíveis*, bem como *imunizar cavalos com a peçonha isenta de proteínas estranhas*.

Com este processo conseguimos, desde 11 de Junho até 4 de Novembro, obter em torno de 130 miligramas de veneno seco de *Phoneutria nigriventer*.

Nos meses de frio (Junho até Setembro) temos colhido as seguintes médias em miligramas, por aranha:

quantidade mínima .....	0,03 mg;
quantidade média .....	0,44 mg;
quantidade máxima .....	1,84 mg.

A *quantidade máxima individual* varia bastante, principalmente em dependência da *temperatura e alimentação*. Sobreindo nos meses de Outubro e Novembro uma onda de calor prolongada, com a média de temperatura em torno de 23 °C que deverá ser considerada como "ótima" para estas aranhas, pudemos colher as seguintes quantidades máximas individuais:

em 26 de Outubro .....	3,10 miligramas;
em 3 de Novembro .....	4,00 " "
em 4 de Novembro .....	5,00 " "
em 31 de Outubro .....	8,00 " "

A média também se tem elevado consideravelmente, ficando em torno de 1 mg — 1,7 mg.

É verdade que, no afã de averiguar o "quantum" de veneno seco que uma aranha poderia eventualmente inocular em picadas repetidas, temos insistido com cada aranha, de maneira que ela picasse *diversas vezes* no tubo de borracha, mas mesmo assim deve-se ter presente que sempre se tratou sólamente de picadas diretas, isto é, de quantidades de peçonha que uma aranha é capaz de largar e inocular numa ou mais picadas.

Compreende-se agora perfeitamente a justeza das afirmações de antigos experimentadores de que no *verão* a peçonha era mais ativa do que no *inverno*. Não é mais ativa (como veremos depois), mas é inoculada em maior quantidade, revestindo-se lógicamente de maior gravidade os acidentes humanos, ocorridos no verão.

### 3. PREPARO DOS SOLUTOS VENENÍFEROS

#### a) *Extratos glandulares*: (Tabela I)

Com as glândulas totais, extraídas de aracnídeos vivos, Vital Brazil e Jean Vellard (1 e 5) prepararam os seguintes extratos:

*Extrato A*: — 1 — 2 glândulas em 0,5 cc de sol. fisiológico, empregado para experiências de atividade com ou sem prévia filtração por papel; pH ácido (em torno de 5).

*Extrato B*: — 1 — 2 glândulas totais em 0,5 cc de *água de cal*; pH em torno de 8; empregado depois de filtração por papel.

No intuito de repetir as experiências dos dois grandes mestres e pioneiros, preparamos, entre outros, os seguintes solutos:

*Extrato G*: — 1 glândula fresca em 1 cc de sol. fisiológico, em pH 5 e empregado depois de filtração por papel.

*Extrato H*: — 1 glândula em 1 cc de sol. fisiol., mas com pH em torno de 8 e filtração por papel.

*Extratos I-J-K*: — Glândulas guardadas durante 10 a 40 dias em glicerina com pH em torno de 5, a baixa temperatura ( $3^{\circ}$  C), eram retiradas da glicerina, trituradas em gral, adicionando-se sol. fisiológico na proporção de 1,5 cc para 1 glandula; deixava-se macerar e centrifugava-se. Ao resíduo adicionava-se novamente 1,5 cc de sol. fisiol. por glândula; houve nova maceração e centrifugação; o resíduo recebia novamente 1,5 cc de sol. fisiol. e fez-se a terceira centrifugação; o resíduo foi redissolvido pela quarta vez com sol. fisiol. e mais uma centrifugação foi feita.

Como resultado obtivemos solutos veneníferos, com *dissolução completa* da peçonha, independentemente do pH. A filtração por papel era dispensável.

O Soluto I foi feito com sôro fisiológico em pH 8; soluto J apresentava pH 5 e o soluto K pH 6,5. Os tres solutos não mais eram concentrados nas proporções dadas por Brazil e Vellard e imitadas por nós nos solutos G e H, mas feitos nas proporções de 1 glândula em 6 cc de solvente, com 4 lavagens e centrifugações, em 3 níveis diferentes de pH.

Brazil e Vellard tinham principiado suas experiências com *Phoneutria* (*Ctenus* dêles), fazendo picar diretamente animais de laboratório, principalmente camundongos, que morriam rapidamente em consequência da picada.

Querendo repetir esta experiência com solutos glandulares, imaginavam que êstes solutos deveriam ser *concentrados* o mais possível, para que os resultados pudessem ser comparados ao efeito da picada direta. Fizeram, portanto,

solutos supersaturados, em que uma grande parte da peçonha, não dissolvida, permanecia sobre o papel de filtro.

b) *Solutos com o veneno puro:* (Tabela II)

Vital Brazil e Jean Vellard (1 e 5) e mais tarde Vellard (3) fizeram pelo método descrito um soluto do veneno puro:

*Soluto C:* — Soluto de veneno puro (calculado em mg pela diferença das duas pesadas da glândula cheia e vazia), feito em volume conhecido de sôro fisiológico.

Com o nosso veneno seco, puro, exatamente ponderável fizemos, também em sôro fisiológico, os solutos D, E e F, o primeiro em pH ácido, o segundo em pH neutro e o terceiro alcalino, para a verificação da influência do pH diferente sobre a solubilidade da peçonha pura. As nossas três soluções foram feitas na proporção de 1 mg de veneno seco para 6 cc de líquido solvente, com 4 lavagens e 4 centrifugações; sem filtração.

#### 4. TITULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS SOLUTOS GLANDULARES E DO VENENO PURO:

a) *Solutos glandulares:* — (Tabela I)

Brazil e Vellard tinham determinado, conforme o costume daquela época, a dose mínima mortal, estabelecendo ainda que o animal (camundongo) deveria morrer dentro de 1 hora após a injeção. Nós determinamos sempre a dose 50% mortal, obedecendo a técnica, descrita por Reed e Muench (6).

Embora se possa admitir, com uma certa base de aproximação, que a dose mínima mortal seja o dôbro da média mortal, há a considerar ainda, que, em se trabalhando com solutos glandulares, provenientes, portanto, de glândulas trituradas com uma quantidade de peçonha variável de aranha, não é possível, a rigor, repetir-se uma experiência.

Um outro agravante consiste no fato de Brazil e Vellard terem empregado poucos animais apenas, sanado pelas nossas titulações com várias dezenas de camundongos, do mesmo peso.

O interesse de um confronto entre as titulações de Brazil e Vellard e as realizadas por nós, pode visar, portanto, apenas aos seguintes problemas:

Um solvente aquoso ácido ou neutro dificultaria a solução completa da peçonha?

Esta solução se daria melhor em ambiente alcalino?

Deveriam empregar-se soluções o mais possível concentradas e filtradas; ou seria melhor usar diluições maiores, com esgotamentos diversos dos resíduos e centrifugação?

Poderiam preparar-se solutos ativos com glândulas, guardadas durante meses em glicerina, em temperatura de 3°C?

Haveria a possibilidade de estabelecer-se um confronto de atividade entre os solutos glandulares (recentes ou glicerinados) e a peçonha pura, seca, exatamente ponderável e titulável?

Tabela I:

*Soluto A:* — Dose mínima mortal por grama de camundongo, por via intramuscular 0,04 glândula (Brazil, Vellard).

*Soluto G:* — Dose média mortal, subcutânea, por gr. de camundongo = 0,004 glândula.

O soluto A era límpido; o G se apresentava opalescente.

Solutos feitos com o resíduo, que ficou no papel de filtro, ainda matavam camundongos, o que prova que a peçonha não se tinha dissolvido senão apenas pela metade, mais ou menos.

A mínima e média mortal podem ser consideradas como coincidentes nestes dois ensaios (sem rigorismo científico), com solventes ácidos.

*Soluto B:* — Dose mínima mortal por gr. de camundongo, intramuscular = 0,005 glândula; Soluto alcalino, filtrado por papel (Brazil e Vellard).

*Soluto H:* — Dose média mortal por gr. camundongo, subcut. = 0,001 glândula.

O soluto B era fortemente opalescente. Mesmo muito concentrado, permitiu melhor solubilidade da peçonha, em comparação aos solutos A e G. Os pesquisadores não dosaram o resíduo sobre o papel de filtro, nem mencionam se houve ou não tal resíduo.

O soluto H era opalescente; ficou um resíduo sobre o papel de filtro que, após solução em solvente alcalino, ainda matava camundongos.

Os quatro solutos, que são perfeitamente comparáveis em atividade, provam, portanto, que não é tanto o pH que interfere na solubilidade-se bem que a alcalinidade do solvente ajude realmente a melhor solubilização — mas sim a concentração e filtração por papel.

Esta afirmativa é satisfatoriamente confirmada pelos solutos I, J e K, em que se fizeram 4 dissoluções dos resíduos da peçonha e se centrifugava

cada vez. Independentemente de pH neutro, ácido ou alcalino, conseguiram-se soluções 100 % das peçonhas, com médias mortais por gr. de camundongo via subcutânea, em torno de 0,0007 glândula (pH 8); 0,0008 glândula (pH neutro).

Mesmo após as 4 lavagens, ficou em cada soluto um pequeno resíduo (restos celulares e musculares, etc.). Este foi também retomado e redissolvido, mas as titulações destes resíduos não revelavam mais toxicidade alguma para camundongos, mesmo em concentrações grandes.

Os três solutos foram feitos com glândulas guardadas por longo tempo em glicerina, a frio, o que prova ser este modo de estocagem bastante aproveitável.

A concordância das titulações da dose 50% mortal dos três solutos e sua maior atividade em comparação aos solutos A, B, G, e H são novos indícios da boa solubilidade, independentemente do pH.

Não nos sentimos capacitados em afirmar se a atividade um pouco maior do soluto I (pH alcalino) deva ser interpretado como em dependência do pH. Cremos que isto não se dê e que esta ligeira variação deva antes ser atribuída a que aquelas glândulas tinham realmente maior quantidade de peçonha.

A titulação do solvente, em pH 8, não revelou toxicidade alguma, por via subcutânea.

v) *Venenos puros:* — (Tabela II)

*Soluto C:* — 0,0005 mg = Dose mínima mortal por gr. de camundongo, por via venosa (Vellard);

0,0025 mg = Dose mínima mortal por g. de camundongo por via intramuscular (Vellard);

*Solutos D, E, F:* — 0,00035 mg = Dose 50% mortal por g. de camundongo via venosa;

0,0007 mg = Dose 50% mortal por g. de camundongo via subcutânea.

Os nossos três solutos com veneno puro, seco, exatamente ponderável em mg, revelaram solubilidade 100%, pelo método de 4 lavagens e centrifugações e com diluição final das soluções-mães de 1 mg para 6 cc de solvente; demonstraram ainda que a solubilidade independe do pH do solvente. A surpreendente concordância das titulações revela que o veneno puro, seco e comodamente estocável, tem sempre a mesma atividade e constitui o ideal em peçonhas aracnídicas. Os três solutos se apresentavam límpidos, sem um traço de opalescência.

Fica demonstrado novamente que se pode obter relativa concordância entre as titulações de Vellard (mínimas mortais) e as nossas (médias mortais).

## 5. IMUNIZAÇÃO COM SOLUTOS GLANDULARES E SOLUTOS DE VENENO PURO

A primeira imunização foi feita por V. Brazil, em 1925, em um carneiro. Num período de 13 dias praticaram-se 12 injeções subcutâneas diárias de um soluto glicerinado de glândulas totais, injetando-se ao todo 84,98 glândulas.

O sôro obtido neutralizava 1 mínima mortal.

Numa outra imunização de um 2º carneiro injetaram-se em 13 semanas 268,42 glândulas, mais 296 mg de veneno puro (em solução), chegando o sôro a neutralizar 0,6 mg de peçonha de *Phoneutria nigriventer*. (O mesmo animal foi injetado simultaneamente com peçonha de *Lycosa erythrogynatha* = *L. raptoria* de Brazil e Vellard).

Um terceiro carneiro finalmente recebeu 114 mg de veneno puro, em 8 semanas de injeções (3 injeções semanalmente) hipodérmicas, protegendo 1 cc do sôro contra 0,6 mg de veneno puro.

Um quarto carneiro recebeu em 9 semanas 239 mg de veneno puro por via intradérmica, neutralizando 1 cc do sôro 0,8 mg de peçonha.

Atualmente imunizam-se no Instituto Butantan cavalos com triturados de glândulas totais, glicerinadas a 40%, neutralizando 1 cc do sôro 1 d.l.m. da peçonha em cobaio.

Creamos ser possível começar-se agora com a imunização com a peçonha pura, seca, exatamente ponderável e que, completado o ciclo imunizatório, permitirá uma aferição rigorosa do poder neutralizante do sôro por cc em relação ao veneno puro e seco, o que significará um novo passo avante na boa qualidade do sôro anticatenídico do Instituto Butantan.

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os solutos de glândulas totais feitos por Brazil e Vellard em água de cal eram mais ativos do que os em sôro fisiológico. Os primeiros eram fortemente opalescentes e os últimos límpidos. Concluíram, então, os pesquisadores que a opalescência seria sinal de atividade ou do grau da solução da peçonha no solvente.

Como nós tivéssemos obtido solutos opalescentes também em meio ácido e neutro, parece que a opalescência nada tem a ver com a atividade. Os solutos de peçonha pura são sempre límpidos e, ao mesmo tempo, ativíssimos, apresentando a mesma dose 50% letal, quer pela via venosa quer pela via subcutânea.

A opalescência dos solutos glandulares é devida à suspensão no líquido de elementos celulares, musculares, etc. macerados em geral juntamente com o veneno.

O pH alcalino ajuda realmente a melhor solubilização da peçonha, principalmente quando se fazem solutos muito concentrados. Mas as nossas experiências têm-nos ensinado que é melhor dissolver tanto a peçonha pura como os triturados glandulares, até 4 vezes, centrifugando-se cada vez em lugar da filtração por papel. A primeira solubilização pode ser feita em meio levemente alcalino; as seguintes, em ambiente neutro. O soluto final deverá ser sempre na proporção de 1 mg de veneno seco para 6 cc de soluto ou 1 glândula para 6 cc.

A glicerina levemente ácida, a frio, constitui um bom meio de conservação das glândulas totais.

A concordância relativa das nossas titulações, tanto das glândulas totais como do veneno seco, com as de Brazil e Vellard nos põem à vontade para render homenagem ao alto critério e rigor científico dos dois mestres.

Preparando-se os solutos glandulares, quer de glândulas recém-extraiadas, quer guardadas em glicerina, a frio, em pH em torno de 5, com 4 "lavagens" sucessivas e centrifugações, consegue-se não sómente solubilizar completamente a peçonha (em pH inicial 8, depois 6,5), mas estes solutos apresentam uma atividade aproximadamente igual, e tanto mais uniforme, quanto maior tiver sido o número de glândulas.

Apesar das substâncias proteiniformes estranhas, que se obtêm nos solutos glandulares e que determinarão também a formação de anti-corpos estranhos, pode-se, imunizar com glândulas totais, desde que se tenha inicialmente um estoque de várias centenas e se proceda à titulação do sôro ou com veneno ou com glândulas que tenha a mesma atividade inicial.

A titulação dos sôros com veneno puro, seco, será sempre preferível.

Temos visto que a dose 50% mortal por grama de camundongo, por via subcutânea é, respectivamente, 0,0007 mg de peçonha seca e 0,0007 de glândula total. Por outro lado, temos obtido pelas picadas das aranhas no tubo de borracha valores entre 1, 2, 3, 4, 5 e num caso até 8 mg de veneno seco. Nos meses de frio, deverá estar a média de veneno seco por aranha em torno de 1 mg e, na época quente, de 2, 5-3 mg. Nunca, porém, se poderão excluir casos de picada, em que sejam injetadas as quantidades máximas acima ditas.

7 mg de veneno seco constituem a dose 50% letal para 10 kg de camundongo ou sejam 500 camundongos em picada direta ou por via subcutânea e 1.000 camundongos em injeção venosa.

Se se quisesse admitir que o organismo humano tenha apenas a mesma sensibilidade em face deste veneno que o do camundongo, deveríamos encarar a possibilidade de, nos meses de calor, em que as aranhas injetam muito mais peçonha do que no inverno, verificarem-se casos muito graves, principalmente em crianças de pouco peso.

Consequentemente deveriam também 5 cc do sôro antitoxicônico neutralizar pelo menos 5 mg de veneno seco ou seja 1 mg por cc.

Comparando a atividade da peçonha pura com os solutos glandulares, vemos que seriam necessárias 70 glândulas para produzirem o mesmo efeito de 7 mg de veneno seco. Deduz-se pois que a *média de veneno puro, por aranha*, está em torno de 2 mg. enquanto que as *quantidades mínimas e máximas individuais* deverão naturalmente variar entre 0 e 8 mg.

Não se pode concluir daí que, se por ventura fôssem necessárias, em média, 500 glândulas para imunizar um cavalo, então seriam necessários 500 mg de veneno seco, puro para obter o mesmo efeito imunitário, porque não se tem realmente a garantia de que as glândulas estavam cheias ou mais ou menos vazias de veneno.

Na imunização com veneno puro é mister proceder-se a ensaios, com diferentes sangrias e dosagens do poder neutralizante do sôro. Certamente poderá iniciar-se a imunização com a dose de 0,1 mg de veneno seco, dobrando-se esta dose cada 4.<sup>o</sup> dia.

O fato de um carneiro, imunizado com 114 mg de veneno, não ter fornecido sôro muito mais concentrado do que o que recebeu 239 mg demonstra a necessidade de se fazerem diversas sangrias de controle.

A velha questão de serem as peçonhas mais ativas no verão do que no inverno, também está resolvida com a obtenção do veneno seco. Este apresenta sempre a mesma atividade e independe das variações climáticas. O que não independe destas é a quantidade da peçonha, que é realmente muito maior nos meses quentes.

Tudo isto tem seu valor e deve ser tomado em consideração, pois o problema da *Phoneutria nigriventer* tende a estender-se também a outros países, como o Uruguai, onde foi confirmado por Costa (7) e MacKinnon (8); a Argentina (9) e a própria Alemanha. Neste último país capturaram-se várias dezenas de *Phoneutria nigriventer*, vindas com as remessas de bananas e espalhadas pelos armazéns dos portos de Hamburgo e Bremen (10).

## 7. CONCLUSÃO

O melhor processo de solubilizar completamente a peçonha pura, seca, ou os macerados glandulares de *Phoneutria nigriventer* consiste em dissol-

ve-los em água destilada com NaCl a 0,85%, em 4 operações seguidas. Na primeira dissolve-se na solução alcalinizada (pH em torno de 7 ou 8) e nas outras 3, em pH neutro. A filtração por papel é substituída por centrifugação. A proporção do veneno ou da glândula em relação ao solvente deve ser de 1 mg de veneno para 6 cc ou 1 glândula para 6 cc de solvente.

Na imunização de cavalos com peçonha pura ou com glândulas inteiras há a considerar o seguinte:

Imunizando-se com glândulas totais, obter-se-á um sôro com uma série de anticorpos estranhos, inúteis na soroterapia, provenientes de substâncias protéicas celulares, glandulares, etc., misturadas com a peçonha (fator da "opalescência" dos solutos glandulares); na titulação dos sôros, que deveriam neutralizar pelo menos 1 mg de veneno seco por cc, deveria substituir-se a d.l.m., feita em cobaios, pela DL<sub>50</sub>% feita em grande número de camundongos; para obter-se maior rigor científico deveriam as titulações ser feitas com veneno puro, seco; quando feitas com extratos glandulares, deveriam êstes ser titulados antes e depois.

Sempre será preferível, desde que se tenha bastante veneno seco, imunizar com êste, principiando-se com 0,1 mg. que corresponderia, em média, a 0,1 glândula e que seria a dose 50% mortal, mais ou menos, para 140 gramas de camundongo.

Do ponto de vista de acidentes humanos, ficam plenamente confirmados os casos, denominados na clínica de "leves", de "média gravidade", "gravíssimos" e "fatais".

Nos meses ou nos climas frios, uma *Phoneutria nigriventer* poderá inocular nas picadas diretas quantidades de peçonha que oscilam entre 0,03 mg (média mínima) até 1,84 mg (média máxima). A média mínima provocaria os "casos leves"; a média máxima, os "casos de média gravidade". A quantidade média mesmo inoculada no inverno estaria em torno de 0,438 a 0,7 ou 1 mg. Esta porção formaria o grosso dos casos clínicos leves ou de média gravidade, naturalmente agravados, quando a vítima fôr de pouco peso ou de natureza mais sensível.

O quadro clínico sofre uma alteração brusca no verão ou nos climas com temperatura constantemente quente. Por este tempo a média mínima já estaria em torno de 0,3 mg; a média, no sentido exato da palavra, já se elevaria para 2 ou 2,5 mg e a média poderia estar em torno de 3 mg de veneno puro.

A sintomatologia clínica já refletiria, por este tempo, intoxicações de média gravidade até gravíssimas (com comprometimento geral do sistema neuro-vascular profundo e periférico: suores, calefrios, perturbações visuais até cegueira, vômitos, paresias, anúria, além da dor local sempre presente.)

Este aspecto clínico, naturalmente, só pode ser considerado normativamente. Há os casos extremos, individuais. Individuais por parte da agressora (a aranha) que pode, num caso determinado, não injetar veneno algum ou injetar, em picadas repetidas 4-5 ou mesmo 8 miligramas; individuais também pelo lado da vítima (a pessoa), que pode ser criança na mais tenra idade, com pouco peso, ou pessoa adulta, ou sadia ou fraca; pouco ou muito sensível, etc..

Na prática clínica, portanto, podem decorrer anos, sem que haja um só caso fatal; mas também poderiam verificar-se seguidamente diversos casos fatais, na ausência da soroterapia específica.

Fóra da profissão e, portanto, incompetentes, apontamos ao especialista apenas o que poderia acontecer, verificada a atividade assombrosa da peçonha de *Phoneutria nigriventer*, perfeitamente comparável à de *Crotalus terrificus terrificus* do Brasil. Cabe a ele a tarefa árdua e cheia de responsabilidade de averiguar se deve ou não empregar o sôro num determinado caso.

Creemos poder dar o conselho, sem pretender entrar por seára alheia, que entre nós, durante o verão, apresentando o paciente sintomas de intoxicação geral (sistema nervoso) e tendo decorrido apenas pouco tempo desde o acidente, é de bom aviso administrar-se o sôro anti-ctenídico, especialmente, quando a vítima fôr uma criança.

Temos visto, em animais de experiência, que depois de 24 horas, a toxina já está quase totalmente eliminada, de maneira que a soroterapia, decorrido um dia, talvez não tenha mais indicação.

#### 8. SUMÁRIO

O presente trabalho procura apresentar uma repetição das pesquisas feitas por Vital Brazil e Jean Vellard e trazer uma contribuição nova principalmente no tocante às titulações e o preparo dos extratos das glândulas totais e da peçonha pura de *Phoneutria nigriventer*.

Fica demonstrado, segundo já tinham observado Brazil e Vellard, que as concentrações dos solutos glandulares, na proporção de 1 glândula por cc de solvente e filtração por papel, não favorecem a solubilidade da peçonha, que fica sobre o papel de filtro, principalmente quando os solutos são ácidos.

Também os solutos concentrados alcalinos deixam grande parte da peçonha sobre o filtro.

A solubilidade da peçonha pura ou dos macerados glandulares se torna perfeita, quando se praticam 4 redissoluções dos resíduos e se substitui a filtração por centrifugação. O ph alcalino favorece a melhor solução, mas é indispensável.

Glândulas estocadas em glicerina pura, a 3°C, conservam toda a sua atividade por meses.

As doses 50% mortais por grama de camundongo são:

- 0,0007 glândulas por via subcutânea;
- 0,0007 mg de veneno puro, seco, por via subcutânea;
- 0,0003 mg de veneno puro, seco, por via venosa.

Por via venosa a peçonha age rapidamente, morrendo o animal dentro de meia hora a 1 hora e meia e começando a eliminação já depois deste tempo, para completar-se em 12 horas, mais ou menos.

Injetando-se a peçonha por via subcutânea, principiam os sintomas de intoxicação dentro de 10 a 15 minutos; agravam-se após outros 15 minutos a 1 hora, podendo os animais falecer ainda dentro de 3 a 5 horas. A eliminação da peçonha é completa em 24 horas.

Através do processo de obtenção do veneno puro, por picada direta de aranha, mantidas vivas no laboratório, são estabelecidas as seguintes quantidades em mg que as aranhas podem injetar em picada:

- máximas individuais: — 3, 4, 5, 6 até 8 mg; (no verão); 1, 8 mg no inverno;
- médias: — 0, 4-0, 7-1 mg no inverno e 2-2, 5 mg no verão ou climas quentes;
- mínimas: — 0, 03 mg no inverno e 0,3 no verão.

Nos processos imunitários aponta-se a conveniência de os sôros serem titulados com veneno puro, devendo preferir-se como animal de controlo o camundongo, substituindo-se as mínimas pelas doses 50% letais; indica-se ser ideal imunizar-se com o próprio veneno puro. O poder neutralizante do sôro anti-ctenídico deveria ser expressado em mg de veneno seco, puro e o mesmo deveria neutralizar pelo menos 1 mg de peçonha por cm<sup>3</sup>.

Demonstra-se que acidentes humanos fatais, devidos a picadas por *Phoneutria nigriventer*, são realmente muito raros, mas que podem verificar-se, devendo o clínico examinar a sintomatologia geral do paciente, seu peso, o tempo decorrido entre o acidente e o tratamento, etc., para capacitar-se se deve ou não empregar o sôro específico.

Demonstra-se que a "opalescência" dos solutos glandulares nada tem a ver com a atividade dos mesmos, isto é, que esta é devida à suspensão no soluto de substâncias celulares, etc..

Confirmam-se as pesquisas realizadas por V. Brazil e J. Vellard no tocante a solutos concentrados ácidos, alcalinos e em relação à atividade do veneno puro.

Agradecimento:

Ao sr. José Navas apresentamos nossos agradecimentos pelas coletas de veneno seco das aranhas vivas.

Somos gratos à farmacêutica, da. Nicolina Pucca, pelos prestimosos serviços nas titulações dos solutos veneniferos.

Agradecemos igualmente às srtas. Laurinda Pucci e Luzia Seabra a colaboração prestada.

SUMMARY

Based on the studies of Vital Brazil and Jean Vellard on the action of the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, a new technic is described for preparing an extract by using dried pure venom and poison glands.

In the light of the conclusions of the above mentioned authors, the more concentrated solutions, in acid as well as in neutral and alkaline media — in the proportion of 1 gland to every cc followed by filtration through a filter paper—are not radiable, as a great part of the venom is retained on the filter.

To obtain complete solution of pure venom and of poison glands, 4 consecutive solutions are required, each followed by centrifugation.

The final extract should be in the proportion of 1 mg of dried venom or 1 poison gland, to 6 cc of liquid. It is convenient to make the first solution at an alkaline pH, although the other 3 solutions may be neutral to litmus.

Poison glands retain their full activity, when stored during months in pure glycerina, at 3°C.

The mean lethal dose per gram of mouse is as follows:

0,0007 gland .....	subcutaneously,
0,0007 milligram of dried venom .....	subcutaneously,
0,0003 milligram of dried venom .....	intravenously,

When injected intravenously the poison acts rapidly. Death occurs in mice within half to one and a half hours. After this time the elimination sets in, becoming more or less complete in 12 hours.

On subcutaneous injections, the first symptoms of intoxication are seen within 10 to 15 minutes, increasing up to 30 to 60 minutes with the animals succumbing usually 2 to 5 hours afterwards. The elimination of the venom in the survivors is complete in 24 hours.

200 adults and 600 young specimens of *Phoneutria nigriventer* are kept alive in the author's laboratory. Their venom is extracted every 2 weeks in summer and monthly in winter.

The quantities of dried venom, from a single adult spider, are as follows:

- a) In winter-time: 0,2 — 1,8 mg ..... maximum;  
 0,4 — 1,0 mg ..... mean;  
 0,03 — 0,1 mg ..... minimum.
- b) In summer time: 3,0 to 5,0 and even 8,0 mg ..... maximum;  
 2,0 — 2,5 mg ..... mean;  
 0,3 — 1,0 mg ..... minimum.

The specific *anti-ctenidic serum* should be standardized with pure venom rather than with gland-extracts, its neutralizing power being expressed in mg.

An efficient anti-ctenidic serum should neutralize 1 mg of dried venom per cc or 70 lethal doses ( $LD_{50}$ ), on mice, subcutaneously.

Fatal accidents in human beings seem to occur only occasionally, even in the São Paulo region, on the Brazilian East coast and in the other South-and Central American countries, being still rarer in winter or cold climates. However, death may be possible (9 fatal cases having been observed).

Physicians are, therefore, advised to treat every case individually according to the age and weight of the victims, their susceptibility, symptoms of intoxication and principally the time which has elapsed since the accident, in order to judge if serum therapy is warranted.

#### ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit werden die Erforschungen und Giftbestimmungen, die Vital Brazil und Jean Vellard, an der Spinne *Phoneutria nigriventer* vorgenommen hatten, nachgeprüft. Andererseits werden wesentliche Verbesserungen dargelegt, die es gestatten, sowohl das trockene Reingift wie auch das in den Giftdrüsen enthaltene Gift, exakter zu bestimmen.

Es wird gezeigt, wie schon Brazil und Vellard gefunden hatten, dass sowohl konzentrierte Drüsengiftlösungen wie auch Reingiftlösungen (1 mg Reingift oder 1 Giftdrüse zu nur 1 ccm Lösungsmittel), mit nachfolgendem Abfiltern, das Gift nicht nur nicht ganz zur Lösung bringen, sondern dass auch sehr viel Gift auf dem Filterpapier bleibt.

Dies ist besonders der Fall, wenn das Lösungsmittel sauer reagiert. In alkalischem Medium ist die Lösung etwas besser, aber auch bei weitem nicht vollständig.

Um eine vollständige Lösung sowohl der Reingifte als auch der mazerierten Giftdrüsen zu erhalten, empiehlt es sich, als Lösungsmittel physiologische Kochsalzlösung zu verwenden. Die Hauptsache jedoch ist, dass man das Gift mindestens viermal zur Lösung bringt und immer hernach abzentrifugiert. Das erst Mal löst man am besten bei pH Werten um 8 herum; die weiteren

Rückstände dann in neutraler Lösung. Das Endverhältnis von Reingift oder Giftdrüsen zur Lösungsmenge sollte 1:6 sein, also 1 mg oder 1 Drüse auf 6 ccm Lösungsmittel.

In schwach sauerem Glycerin aufbewahrte Giftdrüsen verlieren bei einer monatelangen Konservierung bei 3° C nicht an Wirksamkeit.

Die 50 %ig tödlichen Dosen dieses Giftes liegen pro Gramm Maus:

- bei 0,0007 Giftdrüse, subkutan;
- bei 0,0007 mg Reingift, subkutan;
- bei 0,0003 mg Reingift, intravenös.

Nach intravenöser Einverleibung kommt das Gift sehr rasch zur Wirksamkeit und die Mäuse sterben schon nach einigen Minuten bis spätestens 90 Minuten. Nach dieser Zeit setzt schon die Giftausscheidung ein und diese ist nach ungefähr 12 Stunden komplett.

Bei subkutaner Einspritzung findet man die ersten Intoxikationsanzeichen schon nach 10 bis 15 Minuten. Sie werden immer schwerer, allgemeiner und bösartiger innerhalb der nächsten 15 Minuten bis zu 1 Stunde. Nach 3 bis 5 Stunden können immer noch einige Tiere sterben; dann beginnt die Ausscheidung, die nach 24 Stunden auch beendet ist.

Diese giftigsten Spinnen Brasiliens werden in unserem Laboratorium zu Hunderten lebendig gehalten. Jede Woche oder jede zweite Woche wird ihnen das Gift abgenommen. Dabei bedienen wir uns eines dünnen, elastischen Gummischlauches, dessen Enden an zwei langen Glaspipetten befestigt sind. Da *Phoneutria nigriventer* sehr angriffslustig ist, beißt sie einmal oder auch mehrere Male in den Schlauch, wobei ihr Gift im Innern desselben deponiert wird und dann bequem auf ein Glas gebracht werden kann. Es wird in Vakuum getrocknet und kann so als weißlicher Staub monatelang im Vakuum über Kalziumchlorit aufbewahrt werden.

Nach dieser Methode haben wir folgende mengenmäßige Werte pro Spinne erhalten:

größte individuelle Mengen: — 3; 4; 5; 6 und sogar 8 mg im Sommer;  
1, 8 mg im Winter;

mittlere Menge: — 0,4 bis 0,7-1 mg im Winter und 2-2,5 mg im Sommer;  
Mindestmenge: — 0,03 mg im Winter und 0,3 mg im Sommer.

Die gleichen Dosierungsversuche im Tierversuch beweisen, dass das Trocken-gift sowohl im Winter wie im Sommer die gleiche Wirksamkeit hat. Damit kommen wir auch auf den Grund, warum ältere Forscher immer gemeint haben, in den heißen Jahreszeiten seien die Spinnen giftiger als in den kalten. Sie sind immer gleichgiftig, nur haben sie in den heißen Sommermonaten mehr Gift als in den kalten Jahreszeiten.

Bei der Titulierung der durch Pferdeblut gewonnenen spezifischen Seren ist es zu empfehlen, dass man zur Bestimmung der Serumwerte Trockengift verwendet, statt des mehr oder weniger unkontrollierbaren Giftdrüsensextraktes. Am besten ist es natürlich, wenn genügend Reingift vorhanden ist, dass man die Pferde mit Reingift immunisieren kann.

Reingiftlösungen sind immer wasserklar. Die "Opaleszenz" der durch Drüsenzerreibung erhaltenen Lösungen steht mit der Wirksamkeit in keiner Beziehung, wie Brazil und Vellard angenommen hatten, sondern ist vielmehr der Ausdruck, dass neben dem Gifte auch Zell- und Muskelsubstanzen mit in Suspension oder Lösung gingen. Da diese ebenfalls eiweissartiger Natur sind, dürften die damit gewonnenen Seren viele unnütze Antikörper enthalten, die für die Therapie unerwünscht sind.

Die Titulierung der Seren sollte in Bestimmungen der 50 % tödlichen Dose an Mäusen geschehen, statt der bis jetzt angewandten mindest tödlichen Dose an Meerschweinchen, weil die Mäuse billiger sind und vor allem in grösseren Mengen zur Verfügung stehen und weil man bei diesen Tieren relativ weniger des so wertvollen Trockengiftes verbraucht.

Die Neutralisierungskraft des spezifischen Serums sollte in mg ausgedrückt werden und ein gutes Serum sollte wenigstens pro ccm 1 mg Trockengift neutralisieren.

Wenn man unsere Erfahrungen über die beim Biss in den Gummieschlauch zu verschiedenen Jahreszeiten abgeschiedenen Giftmengen auf die menschliche Therapie überträgt, so kommt man zu dem Schlusse, dass menschliche Todesfälle durch den Biss von *Phoneutria nigriventer* zu ganz grossen Seltenheiten gehören dürften, dass sie aber immerhin im Bereich des Möglichen stehen. Bisher sind 8-9 von Ärzten beglaubigte Todesfälle, auch erwachsener Menschen im Staat São Paulo vorgekommen.

Da, wie wir gesehen haben, die eingespritzten Giftmengen grossen Schwankungen unterworfen sind, muss es immer dem behandelnden Arzte anheimgestellt bleiben, festzustellen, ob Lebensgefahr vorhanden ist und ob es nötig ist, Serum zu spritzen. Ist das Allgemeinbefinden des Patienten gestört, machen sich Sehstörungen, Pulsbeschleunigung, Schüttelfrost und Übelkeit, etc., bemerkbar und ist der Patient ein Kind mit wenig Gewicht und ist erst eine sehr kurze Zeit zwischen dem Bisse und der Behandlung verflossen, so ist die spezifische Serumbehandlung unbedingt angezeigt.

Zum Schlusse zeigt diese Arbeit noch auf die Möglichkeit hin, dass die giftigste Spinne Brasiliens, *Phoneutria nigriventer*, auch in Uruguay, Argentinien vorkommt, ja selbst schon bis nach Hamburg und Bremen mit den Banansexporten Lateinamerikas verschleppt worden ist, dass es sich also empfiehlt,

wenn die betreffenden Länder wenigstens ein kleines Serumdepot, das aus Butantan zu beziehen wäre, halten würden.

LITERATURA:

1. *Brazil, V. & Vellard, J.* — Mem. Inst. Butantan 2: 5-78, 1925.
2. *Guimarães, J. L.* — Gazeta Clin., São Paulo, N.<sup>o</sup> 1, 1916.
3. *Vellard, J.* — Le Venin des Araignées. Masson, Paris, 1936.
4. *Fonseca, Fl.* — Animais Peçonhentos. Inst. Butantan, S. Paulo: 262-275, 1949.
5. *Brazil, V. & Vellard, J.* — Mem. Inst. Butantan, 3: 243-299, 1926.
6. *Reed, L. J. & Muench, H.* — Am. J. Hyg. 27: 493-497, 1938.
7. *Costa, R. S.* — Anal. Inst. Hig., Montevideo, 3: 57-66, 1949.
8. *Mackinnon, J. E., & Witkind, J.* — Aracnidismo necrótico. Anal. Faculd. Med. Montevideo, 38: 75-100, 1953.
9. *Ibarra Grasso, A.* — Arañas e Araneismo — La Semana Medica — Tomo Cincozentenario, (2): 763-793, 1944.
10. *Schmidt, G.* — Über die Bedeutung der mit Schiffsladungen in Deutschland eingeschleppten Spinnentiere — Anzeiger für Schädlingsk, 26: 97-105, 1953.

GLÂNDULAS

TABELA I

SOLUTOS GLANDULARES TITULADOS

DOSES MÍNIMAS MORTAIS  
 DOSES 50% MORTAIS  
 DOSES MORTAIS  
 POR GRAMA DE CAMUNDONGO.  
 VIA SUBCUTÂNEA

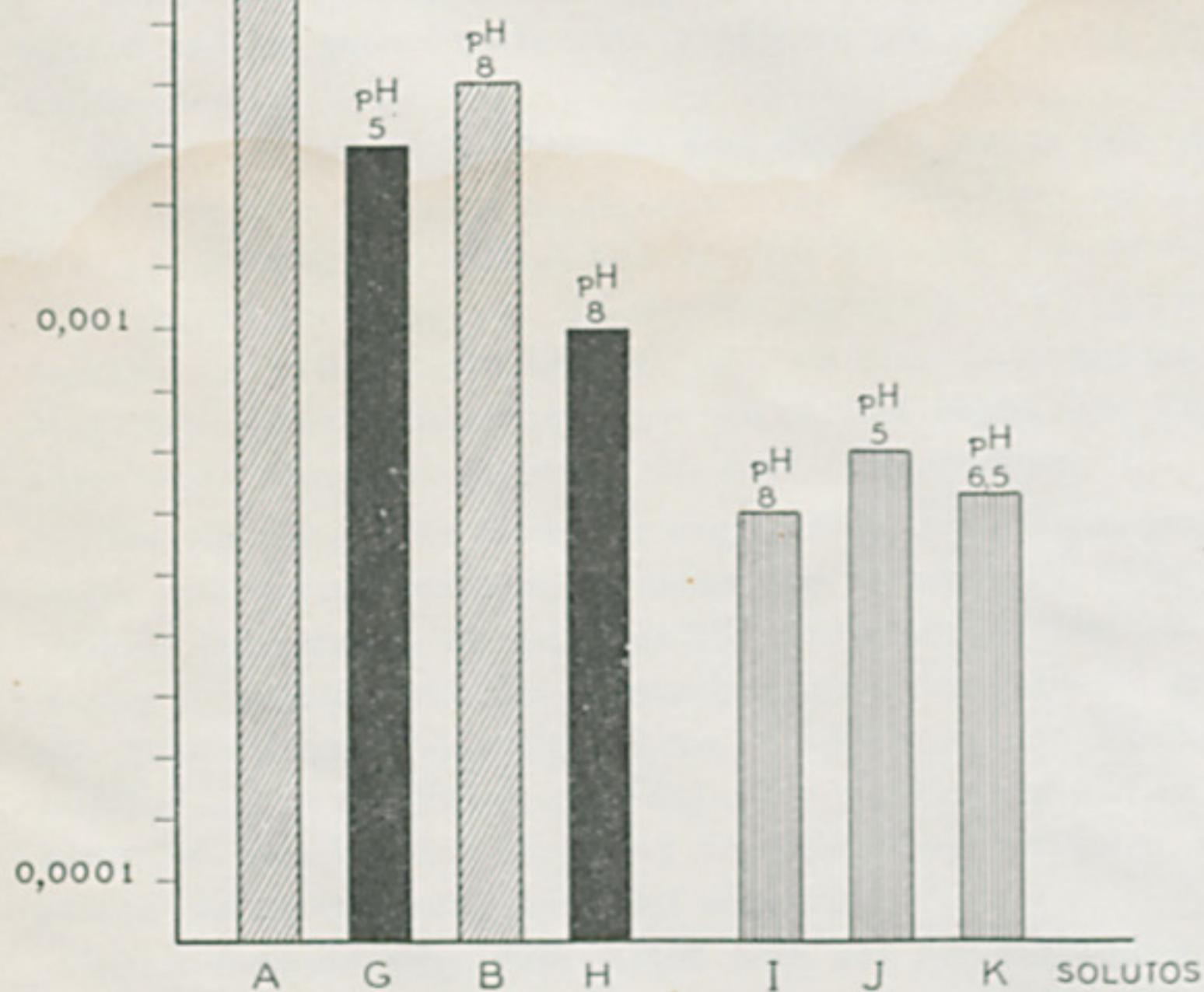


TABELA II  
SOLUTOS DE VENENO PURO

