# ESTUDOS QUÍMICOS SOBRE OS VENENOS OFÍDICOS (\*)

6. Composição da Crotoxina (\*\*)

POR K. SLOTTA & J. PRIMOSIGH

Em 1938, isolou-se a substancia neurotóxica e hemolítica do veneno crotálico com uma proteina uniforme (1), contendo 13,2% de cistina e 1,36% de metionina (2). O peso molecular desta proteina, determinado na ultracentrifuga foi de 30.000 (sedimentação e difusão) ou 30.500 (equilíbrio de sedimentação) (3). Pelo ensaio electroforético da crotoxina foi possivel comprovar a uniformidade desta proteina cristalizada (4). Experiencias de inativação da crotoxina com reagentes específicos para certos grupos mostram a grande sensibilidade da molécula (5).

Neste trabalho procura-se determinar quais os amino-ácidos que compõem esta proteína. Para isto usamos a cromatografia em papel (6) metodo mais indicado, porque torna possível uma análise completa com quantidades mínimas de substância.

Acerto das técnicas — Preliminarmente fizemos experiências com misturas de amino-ácidos puros e depois com hidrolisados de insulina cristalisada, cuja composição é bem conhecida. Estas experiências preliminares eram necessárias, pois que os valores de R<sub>t</sub> (isto é, a relação entre a distância percorrida pelo amino-ácido e a distância percorrida no papel pelo solvente) não são constantes, mas variam conforme a concentração dos amino-ácidos, número dos componentes (6), pH do hidrolisado em experiência (9), (13), e saturação da atmosfera da câmara cromatográfica (13); este último ponto é especialmente importante em experiência com fenol, onde influi muito a quantidade de amoníaco usado para a neutralização dos amino-ácidos.

Estudando misturas cada vez mais complexas de amino-ácidos puros podemos observar, confirmando assim a eficiência da nossa técnica, que com 2 cromatogramas mono-dimensionais, um com butanol-ácido acético e outro com fe-

Entregue para publicação em 14-4-51.

<sup>(\*)</sup> Os primeiros cinco trabalhos foram publicados nas Memórias do Instituto Butantan 11:109, 121, 133, 1937; 12:505, 573, 1938.

<sup>(\*\*)</sup> O presente trabalho foi realizado no Departamento Científico da Ind. Farm. Endochímica S/A.

nol + água, todos amino-ácidos comuns na natureza podem ser identificados, com exceção de valina + metionina e leucina + isoleucina que com estes solventes não podem ser separados.

Por exemplo: o cromatograma mono-dimensional com butanol + ácido acético (fato que pode ser observado na fotografia n.º 2), — que para melhor separação dos amino-ácidos básicos deixamos percorrer 40 horas, — tornou possível a identificação dos seguintes amino-ácidos: cistina, lisina, histidina, arginina, alanina, prolina, tirosina, valina + metionina, fenilanina e leucina + iso-leucina. Nêste cromatograma, contudo, o ácido aspártico, a glicina e a serina formam uma mancha única (ns. 2, 4 e 5 da fig. 2), o mesmo acontecendo com o ácido glutâmico e treonina (ns. 3 e 6 da fig. 2).

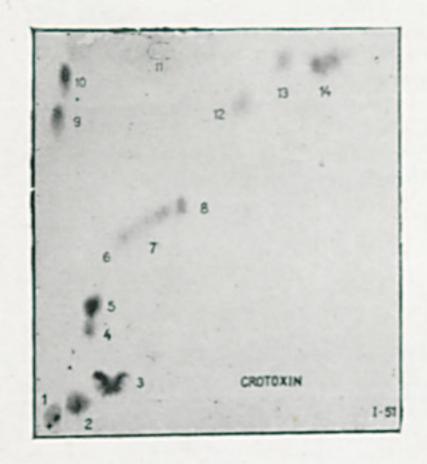
Com fenol + água podem ser separados os amino-ácidos que no cromatograma anterior ficam agrupados, isto é, o ácido aspártico, a glicina e a serina de um lado, e o ácido glutânico e a treonina do outro. A cromatografia em fenol + água permite a identificação da oxiprolina que aparece separada entre alanina e tirosina com um  $R_f = 0,50$  e pode ser identificada usando a isatina numa reação específica recentemente publicada (14).

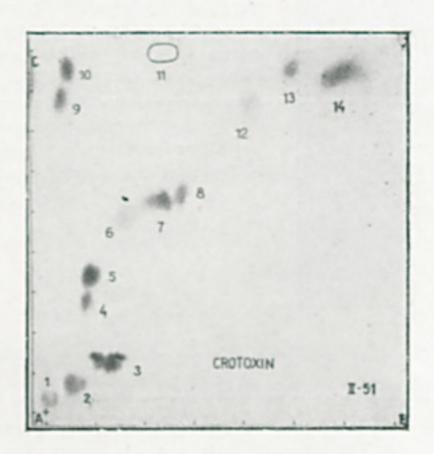
Para a separação dos conjuntos valina + metionina, e leucina-isoleucina precisa-se de dois outros cromatogramas mono-dimensionais. A separação da mistura valina-metionina é possível com colidina; assim aparece a valina, com um  $R_t = 0.55$ , separada de todos os outros amino-ácidos. Com este método, todavia, a metionina junta-se com a mancha fenilamina + leucinas e não pode ser identificada. Esta separação pode ser conseguida cromatografando prèviamente quantidade maior de hidrolisado com a mistura butanol + ácido acético numa zona com largura de alguns centímetros. Marca-se a área que contém a valina + metionina, corta-se, elui-se com água distilada e, após concentração do eluido, faz-se a cromatografia com colidina ou com butanol sec. + metil-etil-cetona (12). Este problema foi simplificado pelo trabalho recentemente publicado de Mc Farren (13), que usa m-cresol em solução aquosa tamponada em pH 8,4 e o papel prèviamente tratado com solução tampão do mesmo pH. Com este método é possível separar a valina e a metionina entre si e de todos os outros amino-ácidos.

Com álcool butílico sec. + metil-etil-cetona as leucinas podem ser bem separadas em tempo relativamente curto (6 horas, cromatografia ascendente) se estiverem isoladas dos demais amino-ácidos, isto é, depois de uma pré-separação dos amino-ácidos do hidrolisado com butanol + ácido e eluição da zona correspondente. Esta separação pode ser fâcilmente conseguida usando n-butanol + alcool benzílico em solução tamponada em pH 8,4, leucina e isoleucina aparecem bem separadas entre si e dos demais amino-ácidos, se cromatografarmos durante 40 horas (13.

Depois destes estudos preliminares com misturas artificiais de amino-ácidos puros, fizemos cromatogramas mono e bi-dimensionais de hidrolisados de insulina e identificamos todos os amino-ácidos desta proteína muito bem estudada.

Resultados — Após esta fase experimental preparamos crotoxina amorfa, coagulando pelo calor as proteínas inertes, e crotoxina cristalizada e recristalizada. Hidrolisamos a crotoxina recristalizada com ácido clorídrico sob pressão, removemos com a técnica usual o ácido e usamos este hidrolisado primeiramente para cromatogramas mono-dimensionais em butanol + ácido acético (fig. 2) e fenol +água. Assim foi possível identificar inicialmente os seguintes amino-ácidos: cistina, lisina, histidina, arginina, ácido glutâmico, glicina, serina, ácido aspártico, treonina, alanina, prolina, tirosina, fenilanina e leucinas. Combinando-se estes dois cromatogramas mono-dimensionais em um bi-dimensional, usando as duas misturas de solventes na ordem butanol + ácido acético e fenol + água, foi possível distinguir (figuras 1-a e 1-b) os mesmos amino-ácidos





Figs. 1-a e 1-b

Cromatogramas bi-dimensionais de um hidrolisado de crotoxina feito em papel Whatman N.º I usando como solventes a mistura butanol+acido acético na direção horizontal e fenol+água na direção vertical. O ponto marcado (+) indica o local onde foi posto o hidrolisado que na figura 1.ª correspondia a 300 microgramas, e na Ib, 250 microgramas de crotoxina. As manchas foram reveladas com ninidrina.

Identificação das manchass 1 — Cistina, 2 — Acido aspártico, 3 — Acido glutâmico, 4 — Serina, 5 — Glicina, 6 — Treonina, 7 — Alanina, 8 — Tirosina, 9 — Lisina, 10 — Argina, 11 — Prolina (mancha amarela que não aparece na fotografia, feita com filtro alaranjado), 12 — Valina+Metionina, 13 — Fenilalanina, 14 — Leucina+Isoleucina.

anteriormente mencionados com exceção de histidina que devido a sua concentração mínima não pode ser nitidamente observada, quer no cromatograma mono-dimensional com papel Whatman n.º 1, quer no cromatograma bi-dimensional. Para eliminar a dúvida a respeito da presença ou ausência da histidina, fizemos uma série de experiências no sentido de poder usar maior quantidade de hidrolisado. Verificamos que com a mistura butanol + ácido acético, o papel Whatman n.º 3 permite trabalhar dupla é até quádrupla da usada com papel Whatman n.º 1.

O resultado pode ser observado na fig. 2, que é constituida de dois cromatogramas desenvolvidos simultâneamente, o cromatograma A, tendo sido revelado pela ninidrina e o B, pelo reagente de Pauly (ácido sulfanílico diazotado).



Fig. 2

Cromatogramas mono-dimensionais de um hidrolisado de crotoxina, feito em papel Whatman N.º 3 com butanol-ácido acético. Nos pontos com a marca (+) foi posto hidrolisado corresponde a 200 microgramas. O cromatograma A foi revelado com niidrina enquanto que B foi revelado com carbonato de sódio e ácido sulfanilico diazotado. O último mostra a mancha nitida das histidina corresponde à marca a no cromatograma A. Os outros numeros têm a mesma significação que nas figs. 1ª e Ib. Notar que a tirosina (ponto n.º 8 cromatograma A) também foi conjugada com o ácido sulfanilico diazotado (no cromatigrama B).

Vêm-se no cromatograma B bem nítidas as manchas de histidina e tirosina, as únicas que reagiram com o reagente de Pauly, em frente às manchas marcadas a e 8 respectivamente do cromatograma A.

Dois outros problemas podíamos resolver ao mesmo tempo usando o método de Mc Farren já mencionado (13) (\*): a separação da valina e metionina.

<sup>(\*)</sup> Antes do trabalho de Mc Farren (13) fizemos experiências com colidina para provar a presença da valina que no nosso cromatograma bi-dimensional (fig. 1) aparece junto com a metionina. Tendo sido a metionina já identificada como componente da crotoxina e determinada quantitativamente (2) não nos interessou fazer nova prova da existência deste amino-ácido no hidrolisado da crotoxina. No cromatograma com colidina aparece uma mancha que agrupa metionina, fenilalanina, e as leucinas. Em experiências com misturas artificiais de amino-ácidos e com hidrolisados de crotoxina conseguimos com colidina + água, separar a valina dos demais amino-ácidos.

Com dois métodos diferentes foi-nos possível provar a presença deste amino-ácido: 1.º por meio da determinação do fator R<sub>t</sub>, que é 0,55 (cromatografia ascendente) confirmado cromatografando-se simultâneamente sob as mesmas condições 5 microgramas de valina;

de um lado e leucina e isoleucina de outro. Usando m-cresol com solução tampão de borato, pH 8,4, e papel Whatman n.º 1 prèviamente tratado com o mesmo tampão, obtimos bôa separação de valina e metionina depois de cromatografar durante 40 horas (fig. 3).



#### Fig. 3

Crematogramas mono-dimensionais feitos em papel Whatman N.º 1 tamponado em pH 8,4 usando como solvente N-butanol+álcool benzil co A é de 20 microgramas de uma mistura em partes iguais de valina e metionina, enquanto que B é de 100 microgramas de crotoxina. 12 a — Valina, 12 b — Metionina.



#### Fig. 4

Cromatogramas mono-dimensionais feitos em papel Whatman N. °1 tamponado em pH 8,4, com m-creso tamponado em pH 8,4. O cromatograma em pH8,4. O cromatograma A é de 20 microgramas de uma mistura em partes iguais de leucina e isoleucina, enquanto que o B é de 100 microgramas de crotoxina. 14b — Isoletcina, 14a — Leucina, 13 — Fenilalanina.

Tamponando da mesma maneira o papel e a mistura, mas usando n-butanol -|- álcool benzílico, foi possível separar leucina da isoleucina, apesar desta separação não ser tão nítida como a de valina e metionina (fig. 4).

Para confirmar a ausência de oxiprolina, amino-ácido pouco frequente na composição de proteínas (15), usamos cromatogramas com fenol + água e m-cresol + água. Os cromatogramas com fenol não mostraram, mesmo com hidrolisado de 300 microgramas de crotoxina, nenhum indício de coloração com ninidrina. Também cromatogramas de hidrolisados de 100 e 200 microgramas de crotoxina respectivamente com m-cresol + água e papel tamponado, deram resultados negativos.

Admitindo-se que cada molécula da crotoxina contenha uma molécula de oxiprolina esta estaria presente na concentração de 0,4%. Com papel Whatman n.º 3, usando o hidrolisado de 1 miligrama de crotoxina, que deveria pois conter no mínimo 4 microgramas de oxiprolina, não foi possível verificar uma mancha

<sup>2.</sup>º misturando 5 microgramas de valina pura com hidrolisado de 100 microgramas de crotoxina, o cromatograma mostra uma mancha mais intensa no lugar devido.

Para separar a leucina da isoleucina utilizamos detalhes técnicos publicados recentemente (12): eluimos a zona contendo as leucinas de um cromatograma de hidrolisado de crotoxina feito em butanol + ácido acético e com esta solução fizemos um cromatograma escendente durante 6 horas com uma mistura de butanol-sec. + metil-etil-cetona.

correspondente à oxiprolina nem com ninidrina, nem com isatina em cromatogramas com m-cresol + água e papel tamponado. Experiências comparativas indicaram que com 4 microgramas de oxiprolina se obtém com isatina manchas azues bem visíveis.

Não hidrolisamos crotoxina com álcali para verificar a presença de triptofana anteriormente encontrada (15) e até determinada quantitativamente (5).

Reunindo estes resultados podemos concluir que a molécula de crotoxina é constituida dos 18 amino-ácidos seguintes, classificados segundo um sistema sugerido recentemente (17):

Com cadeias laterais catiônicas: arginina, histidina e lisina.

Com cadeias laterais aniônicas: ácidos aspártico e glutâmico.

Com cadeias laterais não polares: glicina, alanina, valina, leucina, isoteucina, prolina, fenilalanina.

Com cadeias laterais polares não-iônicas: serina, treonina, tirosina, triptofana, metionina, cristina.

Durante a execução deste trabalho, Hasson e Gonçalves (16) publicaram resultados da análise cromatográfica de um componente tóxico separado do veneno de Crotalus terrificus terrificus por eletroforese. Os referidos autores identificaram os mesmos amino-ácidos por nós descritos, com excepção da valina, argina e histidina.

### PARTE EXPERIMENTAL

### Material e Técnicas

- 1.º) Crotoxina. A crotoxina foi preparada seguindo-se a técnica anteriormente descrita por Slotta e Fraenkel-Conrat (1). O melhor rendimento foi obtido partindo de veneno recentemente colhido oferecido gentilmente pelo Instituto Pinheiros. As proteínas inertes eram coaguladas pela ação do calor em pH ácido, a crotoxina era precipitada por neutralização com amônea e cristalizada em presença duma mistura de piridina e ácido acético em pH 4,1. Finalmente era recristalizada e dessecada em alto vácuo.
- 2.º Hidrólise. 10 miligramas de crotoxina eram dissolvidas à temperatura ambiente em 10 m1 de ácido clorídrico 6 N, livre de metais pesados. Este era preparado de ácido clorídrico redistilado cinco vezes. A solução ácida de crotoxina era hidrolisada num tubo de vidro fechado, por aquecimento a 120.ºC durante 18 horas. Do hidrolisado levemente amarelo, o excesso de ácido clorídrico era retirado por liofilização, redissolução do resíduo e nova liofilização. Este processo era repetido 3 a 4 vezes. O resíduo final, dissolvido em 1 m1 de água morna, era filtrado. 0,01 m1 do hidrolisado obtido continha, portanto, os amino-ácidos correspondentes a 100 microgramas de crotoxina; em algumas

experiências tornou-se vantajoso aumentar a concentração para 200 microgramas por 0,01 m1. Desta solução mais concentrada eram utilizados 0,005 m1 para cada cromatograma mono-dimensional.

- 3.º) Papel. Em geral usávamos o papel Whatman n.º 1 em tiras de 5x57 cm para cromatogramas mono-dimensionais e em folhas de 57x57 cm para cromatogramas bi-dimensionais. Para a determinação de histidina usávamos papel Whatman n. 3 devido a sua maior capacidade.
- 4.º) Câmaras e cilindros para cromatografia. Os cromatogramas monodimensionais eram executados em manilhas com 15 cm de diâmetro interno e 75 cm de altura, com a parte inferior (menor) fechada com cimento e a superior com bordos esmerilhados e engraxados para assegurar o contato perfeito e fechamento hermético com uma placa de vidro. No fundo do cilindro era colocada uma placa de Petri contendo o solvente apropriado. A saturação do ambiete demorava cerca de meia hora. Como reservatório do solvente usamos as barquinhas descritas por Consden e colabs. (6) com 25 cm de comprimento e cerca de 30 ml de capacidade.

Para os cromatogramas bi-dimensionais usávamos caixas de madeira de 20x70x70 cm tendo a frente fechada por vidro, para permitir a observação do andamento do processo. A introdução da barquinha de 200 m1 de capacidade era feita pelas abertura superior que media 65 cm de comprimento. No fundo da câmara cromatográfica punhamos 4 placas de Petri cheias com o solvente, 2 horas antes de iniciar a cromatografia.

- 5.°) Reagentes.
- a) Mistura N-Butanol + Acido acético -

Composta de 40 partes de n-butanol, 10 de ácido acético glacial e 50 de água em volume. A camada superior, rica em butanol, era usada na barquinha para a cromatografia e a inferior, constituida de água saturada com o solvente, era usada nas placas de Petri para saturar o ambiente. Os reagentes usados eram "para análise" e utilizados sem purificação ulterior.

- b) Mistura Fenol + água —
  Preparada com 80 partes de fenol redestilado e 20 de água destilada.
- c) M-Cresol -

M-Cresol técnico destilado uma vez sob pressão atmosférica e saturado com tampão de borato de pH 8,4 em tunil de separação (13).

- d) Mistura Colidina + Agua -
- A) colidina (recebida de Schweizerische Teerindustrie AG. Pratteln, Baseland) não foi purificada e a mistura era feita saturando-se esse reagente com água por meio de um funil de separação.
  - e) Mistura N-Butanol + Alcool benzílico Preparada conforme Mc Farren (13).
  - f) Reagente de Pauly -

Consiste de duas soluções separadas:

- Sol. 1) 5g de nitrito de sódio em 1 000 m1 de água destilada
- Sol. 2) 5g de ácido sufanílico em 50 m1 de ácido clorídrico concentrado completando-se com água destilada o volume de 1000 m1.

No momento de usar, misturava-se um m1 da solução 1) com 50 m1 da solução 2).

## g) Ninidrina -

Foi usado o produto "para análise", sem mais purificação, na percentagem de 0,2 em n-Butanol prèviamente saturado com água.

## h) Isatina -

Foi usado um preparado com ponto de fusão 201.º C, na concentração de 0,2% em n-butanol contendo 4% de ácido acético.

6.º) Colocação do hidrolisado. Geralmente para cromatogramas nonodimensionais eram colocadas quantidades de hidrolisado correspondentes a 100 e 150 microgramas da proteína contidas em 0,005 m1 a 0,01 m1 por meio de uma micropipeta graduada ao 0,001 m1. O material era colocado à distância de 8,5 m1 da margem superior da tira de papel e dessecado em corrente de ar quente proveniente de um secador elétrico. Para as experiências com papel Whatman n.º 3 usávamos quantidades de hidrolisado entre 200 e 300 microgramas contidos em 0,01 a 0,02 m1.

Nos cromatogramas bi-dimensionais, que sem exceção foram feitos com papel Whatman n.º 1, o lugar da colocação do hidrolisado era a 9,5 cm das margens superior e lateral. O Cromatograma da figura 1b, foi feito com uma quantidade de amino-ácido correspondente a 350 microgramas de crotoxina num volume de 0,02 m1. Os cromatogramas comparativos continham num mesmo volume a mesma quantidade de uma mistura artificial de amino-ácidos. Depois da secagem, o papel era colocado na câmara, já saturada pelo solvente. Na combinação n-butanol + ácido acético e fenol — água achamos preferível esta sequência, isto é, n-butanol + ácido acético para a primeira dimensão e fenol + água para a segunda. Recomenda-se também, na cromatografia com n-butanol + ácido acético, deixar continuar a cromatografia até o solvente gotejar

do bordo do papel, o que leva mais ou menos 40 horas. Deste modo, aumentam-se as distâncias entre os amino-ácidos separáveis com este solvente, obtendo-se melhores resultados na separação seguinte com fenol + água.

Depois de feita a cromatografia na primeira dimensão tira-se da câmara cromatográfica o papel úmido, juntamente com a barquinha. Restos do solvente retidos na barquinha eram removidos por aspiração e o papel era a seguir dessecado em corrente de ar quente. A folha de papel era então, colocada novamente na barquinha, porém com um giro de 90.º e a barquinha cheia, agora, com a mistura fenol + água. Para a neutralização dos amino-ácidos, colocamos na câmara o conteúdo de 5m1 de amônea a 25% (D = 0,910) numa placa de Petri para manter o ambiente saturado de amoníaco. Nem cianeto nem monóxido de carbono foram usados.

A cromatografia era interrompida quando faltavam 2 cm para o solvente atingir a margem inferior da folha de papel. Neste momento, tirávamos o papel da câmara, secávamo-lo primeiramente numa corrente de ar quente e depois 10 minutos numa estufa entre 80 a 90.º C, apesar do perigo de destruição parcial de alguns amino-ácidos (10 e 11). Secávamos a estas temperaturas para remover os últimos restos de amoníaco, que prejudicam o cromatograma, produzindo com ninidrina, zonas azues difusas que dificultam a verificação da existência de alguns amino-ácidos. A folha de papel sêca era umidecida uniformemente com solução de ninidrina a 0,2% usando para isso um nebulizador. Logo após séca-se toda a folha numa corrente de ar quente até que as manchas azues comecem a aparecer. Em seguida com uma lâmpada de raios infra-vermelhos reforçamos as manchas individuais até atingir a sua máxima intensidade.

# 7.º) Métodos especiais.

# a) Determinação de histidina e tirosina -

Em tiras de papel Whatman n.º 3 de 12x50 cm, eram colocadas duas amostras de hidrolisado (200 microgramas / 0,02 m1) e cromatografadas com a mistura n-butanol + ácido acético durante 40 horas. Depois de proteger uma parte da tira de papel interpondo-a entre duas placas de vidro, o cromatograma B era saturado com uma solução aquosa de 2,5% de carbonato de sódio e secado à temperatura ambiente. Depois era adicionada sobre esta parte uma solução de ácido sulfanílico diazotado por meio de um nebulizador. As duas manchas côr de tijolo da histidina e tirosina apareciam depois de poucos segundos no fundo ligeiramente amarelado e ficavam estáveis durante alguns dias. O cromatograma A era revelado com ninidrina.

- b) Determinação de valina -
- 1) Com m-Cresol. Papel Whatman n.º 1 era saturado com solução tampão de borato de pH 8,4 conforme Mc Farren (13) e sêco á temperatura ambiente.

O m-cresol era saturado no funil de separação com esta mesma solução tampão. Simultâneamente eram cromatografados durante 40 horas um hidrolisado correspondente a 100 microgramas de crotoxina (B) e uma mistura de valina e metionina (10 microgramas de cada) (A).

- 2) Com colidina + água. Os cromatogramas ascendentes de um hidrolisado de crotoxina apresentaram uma mancha azul totalmente isolada na mesma altura que nos cromatogramas feitos nas mesmas condições com valina pura. Para confirmar este achado, 5 microgramas de valina pura foram adicionados a uma nova porção do hidrolisado de 100 microgramas de crotoxina e novo cromatograma foi feito. No lugar característico da valina apareceu uma mancha mais intensa.
  - c) Determinação da leucina e isoleucina (veja fig. 4).

Usávamos papel Whatman n.º 1 tratado com tampão de borato pH 8,4 (13). A mistura de n-butanol-ácool benzílico era saturada com o mesmo tampão. Depois de cromatografar 40 horas, a existência destes dois amino-ácidos nitidamente separados (B) era provada e confirmada pelo cromatograma simultâneo de uma mistura de leucina e isoleucina (10 microgramas de cada) (A).

#### RESUMO

Por meio da cromatografia de partição bi-dimensional em papel foi demonstrado que a crotoxina contém pelo menos 14 amino-ácidos. Além destes, por meio de técnicas especiais de cromatografia mono-dimensional, foi possível demonstrar que a crotoxina contém valina, histidina, leucina e isoleucina, e não contém oxiprolina.

Pode-se afirmar, que a crotoxina cristalina é composta dos seguintes 18 amino-ácidos: arginina, histidina, lisina, ácidos aspártico e glutâmico, fenilalanina, triptofana, tirosina, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, cistina, metionina.

## ABSTRACT

The presence of at least 14 amino-acids in the acidic hydrolizate of crystalline crotoxin has been demonstrated by two — dimensional partition chromatography on paper. Also it has been possible to prove by one-dimensional chromatography, using special techniques, that crotoxin contains valine, histidine, leucine and isoleucine, whereas hydroxyproline is absent.

It can now be asserted that crystalline crotoxin is composed of the following 18 amino-acids: arginine, histidine, lysine, aspartic and glutamic acids, phenylala-

nine, trytophan, tyrosine, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, serine, threonine, cystine, methionine.

Agradecemos à Diretoria do Instituto Pinheiros e particularmente ao DD. Diretor Dr. Anibal A. Pereira, pela magnânima ajuda prestada e espírito de cooperação científica.

As fotografias foram executadas por J. Jaeger; H. Benedick prestou serviços técnicos valiosos; a estes nossos agradecimentos.

### BIBLIOGRAFIA

- 1. Slotta, K. & Fraenkel-Conrat, H. L. Mem. Inst. Butantan 12: 505, 1938.
- 2. Slotta, K. & Forster, W. Mem. Inst. Butantan 12: 513, 1938.
- 3. Gralén, N. & Svedberg, T. Biochem. J. 32: 1375, 1938.
- 4. Li, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L. J. Amer. Chem. Soc. 64: 1586, 1942.
- 5. Fraenkel-Conrat, H. L. & Fraenkel-Conrat, J. Biochim. Biophys. Acta 5: 98, 1950.
- 6. Consden, R.; Gordon, A. H. & Martin, A. J. P. Biochem. J. 38: 224, 1944.
- 7. Dent, C. E. Biochem. J. 43: 169, 1948.
- Ishii, S. & Ando, T. Repts. Radiation Chem. Research Inst., Tokyo Univ. 5: 53, 1950; cit. por Chem. Abstr. 44: 9503 g, 1950.
- 9. Landua, A. J.; Fuerst, R. & Awapara, J. Anal. Chem. 23: 162, 1950.
- 10. Fowden, L. & Penney, J. R. Nature 165: 846, 1950.
- 11. Brush, M. K.; Boutwell, R. K.; Barton, A. D. & Heidelberger, C. Science 113: 4, 1951.
- Boissonas, R. A. Helvet. Chim. Acta 33: 1966, 1950.
- 13. Mc Farren, E. F. Anal. Chem. 23: 168, 1951.

- 14. Acher, R.; Fromageot, C. & Jutisz, M. Biochim. Biophys. Acta 5: 80, 1950.
- 15. Tristram, P. R. Advances in Protein Chemistry 5: 83, 1949.

- 16. Hasson, A. & Gonçalves, J. M. Ciência e Cultura 2: 54, 1950.
- Haurowitz, F. Chemistry and Biology of Proteins; Academic Press Inc., New York: 31: 1950.