

Tesis de Posgrado

Contribución al estudio de los venenos de serpientes del género Bothrops

D'Alessio, Ana S. Weber de

1938

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

D'Alessio, Ana S. Weber de. (1938). Contribución al estudio de los venenos de serpientes del género Bothrops. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0228_DAlessio.pdf

Cita tipo Chicago:

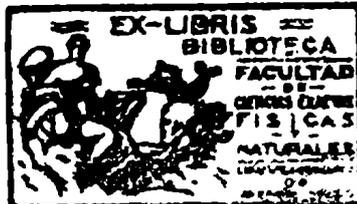
D'Alessio, Ana S. Weber de. "Contribución al estudio de los venenos de serpientes del género Bothrops". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1938. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0228_DAlessio.pdf

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS VENENOS DE SERPIENTES

DEL GENERO BOTROPS

Tesis: 228



TESIS

por

Ana S. Weber de D'Alessio

Realizada en el Instituto Bacteriológico (D.H.H.) bajo la
dirección del Dr. Venancio Deulofeu

1938

Este trabajo fué realizado en la sección Organoterapia del Instituto Bacteriológico (D.N.H.). Agradecemos la deferencia de su Director Dr Alfredo Sordelli por habernos facilitado todos los elementos necesarios durante la experimentación. También hacemos constar nuestro agradecimiento a los jefes de sección y empleados que prestaron su espontánea ayuda.

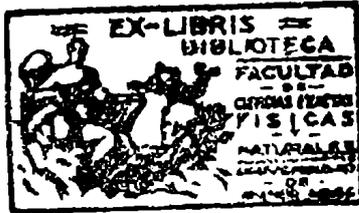
CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS VENENOS DE SERPIENTES
DEL GENERO BOTHROPS

Se han reunido en este trabajo una serie de ensayos, realizados en el deseo de estudiar el comportamiento de los venenos de algunas serpientes sudamericanas.

Todos estos ensayos se refieren a la actividad coagulante del veneno por la facilidad de su dosaje a través de la misma.

Se ha estudiado aquí acción de temperatura y acción de la concentración del ión hidrógeno y se hicieron además ensayos de adsorción, para todo lo cual fué necesario establecer un método cuantitativo de dosaje.

Mientras se realizaba este trabajo apareció uno de Slotta y colaboradores que en algunos puntos coincidía con lo realizado por nosotros, tal como la acción del pH sobre el principio coagulante que él estudia sobre los venenos de Crotalus T. T. y B. Jararaca y nosotros sobre los de Bothrops Alternata, Neuwiedii y Jararaca. También establece el mencionado autor un método de dosaje basado en los mismos principios que el empleado por nosotros, pero lo realiza en forma distinta.



POSIIBILIDAD DE ESTABLECER UN METODO CUANTITATIVO DE MEDIDA

DEL PODER COAGULANTE DE LOS VENENOS.

Para estudiar el principio coagulante de los venenos tratamos de establecer un método que permitiera el dosaje de esas actividades en forma comparable.

Se pensó por supuesto en emplear para esto la velocidad de coagulación de un plasma.

Se estudiaron separadamente los diversos componentes y factores del sistema:

V E N E N O

Cuando se estudia el poder coagulante de un veneno empleado en soluciones muy concentradas, frente a un mismo plasma, se hace difícil determinar diferencias en los tiempos de coagulación para pequeñas diferencias de la concentración del veneno.

Ensayando soluciones diluidas de veneno de Bothrops Alternata se encontró que, empleado en soluciones de concentración entre 1 y 10 gammas por centímetro cúbico para 2,5 centímetros cúbicos de plasma, se obtenían tiempos de coagulación que varían entre doce y diez y nueve minutos como lo indican los cuadros siguientes, donde P_{11} , P_{12} , etc. son los plasmas estudiados.

<u>CONCENTRACIONES</u>		<u>TIEMPOS DE COAGULACION</u> (en minutos).					
		P1 ₁	P1 ₂	P1 ₃	P1 ₄	P1 ₅	p1 ₆
10	γ/cc.	3	2 $\frac{3}{4}$	2	3 $\frac{1}{8}$	3	4 $\frac{1}{8}$
9	"	3	2 $\frac{3}{4}$	2	3 $\frac{1}{8}$	3	4 $\frac{1}{8}$
8	"	3	3	2 $\frac{1}{4}$	4	3	4 $\frac{1}{8}$
7	"	3 $\frac{1}{4}$	3 $\frac{1}{8}$	2 $\frac{1}{8}$	4 $\frac{1}{8}$	3 $\frac{1}{8}$	4 $\frac{1}{8}$
6	"	3 $\frac{1}{8}$	3 $\frac{1}{8}$	2 $\frac{1}{8}$	5 $\frac{1}{8}$	4	5 $\frac{1}{8}$
5	"	4	4	2 $\frac{3}{4}$	6 $\frac{1}{8}$	4	6
4	"	4 $\frac{1}{8}$	5	3 $\frac{1}{8}$	7	5	6
3	"	6	6	4	8 $\frac{1}{8}$	5 $\frac{1}{2}$	8
2	"	7	8 $\frac{1}{8}$	6	10	10 $\frac{1}{8}$	10
1	"	12	14 $\frac{1}{8}$	10	14	15	19

puede verse aquí que variaciones de un gamma por centímetro cúbico representan, en soluciones de concentración inferior a 5 γ/cc. variaciones de tiempo de coagulación fácilmente observables. Para concentraciones mayores las diferencias de tiempo de coagulación se leen con un error considerable y no nos pareció conveniente emplearlas.

P L A S M A

El plasma utilizado se obtiene de sangre de caballo oxalada, preparada por adición de 4 centímetros de solución de oxalato de sodio al 2,6 % a 100 centímetros cúbicos de líquido total (sangre más solución de oxalato); el plasma se separa de los glóbulos por centrifugación.

Si frente a diferentes plasmas se hubiera obtenido, con un mismo veneno un mismo tiempo de coagulación, el método hubiera dado resultados comparables, no sólo en manos de un mismo operador sino

también entre distintos laboratorios.

Desgraciadamente no ocurrió así; diferentes plasmas dieron - tiempos diferentes para ~~cantidad de~~ cantidades iguales de un mismo veneno (ver el cuadro anterior). Sin embargo, un mismo plasma, no muy envejecido, coagulado con cantidades crecientes de un mismo veneno, da tiempos iguales, dentro del error experimental, como se puede ver en el cuadro siguiente:

<u>CONCENTRACIONES</u>	<u>TIEMPOS DE COAGULACION</u>	
	<u>1 hora</u>	<u>3 horas</u>
10 %/cc.	3	3
9 "	$3\frac{1}{4}$	3
8 "	$3\frac{1}{4}$	$3\frac{1}{4}$
7 "	$3\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$
6 "	4	4
5 "	$4\frac{1}{4}$	4
4 "	5	5
3 "	7	7
2 "	8	8
1 "	13	12

~~Sin embargo~~, plasma de un mismo caballo sacado y usado siempre en condiciones idénticas, pero en distintos días, por ejemplo, da resultados, sino iguales, por lo menos próximos, lo que si bien no resuelve el problema anterior es algo más cómodo en su uso y podría ser que haciendo más rigurosas las condiciones se obtuvieran para diferentes muestras de plasmas de un mismo caballo, e idénticas concentraciones de venenos, iguales tiempos de coagulación. El ejemplo siguiente - que aclara lo que acabamos de decir -

se ha llevado a cabo con veneno de Bothrops Neuwiedii.

<u>CONCENTRACIONES</u>	<u>TIEMPOS DE COAGULACION</u> (en minutos).		
	$P1_1$	$P1_2$	$P1_3$
10 γ /cc.	$2\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	3
9 "	$2\frac{1}{2}$	$2\frac{3}{4}$	3
8 "	$3\frac{1}{4}$	$2\frac{3}{4}$	$3\frac{1}{2}$
7 "	$3\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$
6 "	$3\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$
5 "	$5\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{4}$	4
4 "	$4\frac{1}{2}$	$3\frac{3}{4}$	5
3 "	$5\frac{1}{4}$	4	$5\frac{1}{2}$
2 "	$5\frac{1}{2}$	$5\frac{1}{2}$	$7\frac{1}{4}$
1 "	9	$8\frac{1}{2}$	$9\frac{1}{2}$

Basado en estas determinaciones se estableció un método de medida que fué empleado en buena parte del trabajo y posteriormente sustituido por el método gráfico indicado más adelante.

Para proceder con el primer método se establecía el tiempo de coagulación de un plasma determinado frente a concentraciones decrecientes del veneno; esto nos daba lo que se podría llamar velocidad de coagulación con una solución de veneno determinada y a tiempo cero de la experiencia. Ese mismo veneno se sometía luego al tratamiento físico o químico cuya acción sobre el principio coagulante se deseaba estudiar. A los tiempos que se consideraba oportuno se tomaba una muestra, se llevaba a las mis-

mas condiciones que en la solución inicial (neutralidad en el caso del estudio de la acción de distintos pH) y se determinaba su actividad coagulante, por supuesto frente al mismo plasma, empleando también una serie de concentración decreciente.

A veces se obtiene así que alguno de los tubos coincide en su tiempo de coagulación con otro de la escala original a tiempo cero. Si no coincide exactamente, se hace una pequeña interpolación que permite establecer el valor de esa diferencia; se sabe así que cantidad de principio activo hay en ese tubo y como la cantidad inicial es también conocida - se puede calcular la atenuación del poder coagulante por una simple operación.

Como ejemplo damos el cálculo para determinar la atenuación sufrida por una solución de veneno de Bothrops Jararaca de una concentración de 100 gammas por centímetro cúbico mantenida durante media hora a pH 2,2.

La solución acuosa de veneno (solución inicial, solución a tiempo cero) ha dado con el plasma ~~para~~ utilizar los siguientes tiempos (escala de plasma):

<u>CONCENTRACIONES</u>	<u>TIEMPO DE COAGULACION</u> (en minutos).
10 γ/cc.	3 $\frac{3}{4}$
9 "	4 $\frac{1}{2}$
8 "	4 $\frac{1}{2}$
7 "	5 $\frac{1}{4}$
6 "	6
5 "	6 $\frac{1}{2}$
4 "	8
3 "	9
2 "	12 $\frac{1}{2}$
1 "	25

De la solución de veneno a pH 2,2 tomamos una porción y previa neutralización la llevamos a una concentración de 25 gammas por centímetro cúbico; ~~25~~ centímetros cúbicos de esa solución más 2,5 centímetros cúbicos de plasma tardan en coagular a 37°C. 6 $\frac{1}{2}$ minutos. Corresponden en nuestra escala al tubo que contiene una concentración de 5 gammas por centímetro cúbico. En el tubo de ensayo hemos puesto 25 gammas de veneno original se han destruido pues 20 gammas y la atenuación es:

$$\begin{array}{r}
 25 \gamma/cc. \text{ ----- } 20 \gamma/cc. \\
 100 \gamma/cc. \text{ ----- } x \\
 x = 80\%
 \end{array}$$

Es decir que la atenuación es un 80% y la actividad actual un 20%

Si en lugar de llevar la dilución final a 25 gammas por centímetro cúbico la llevamos a una concentración de 50 gammas por

(tubo A')

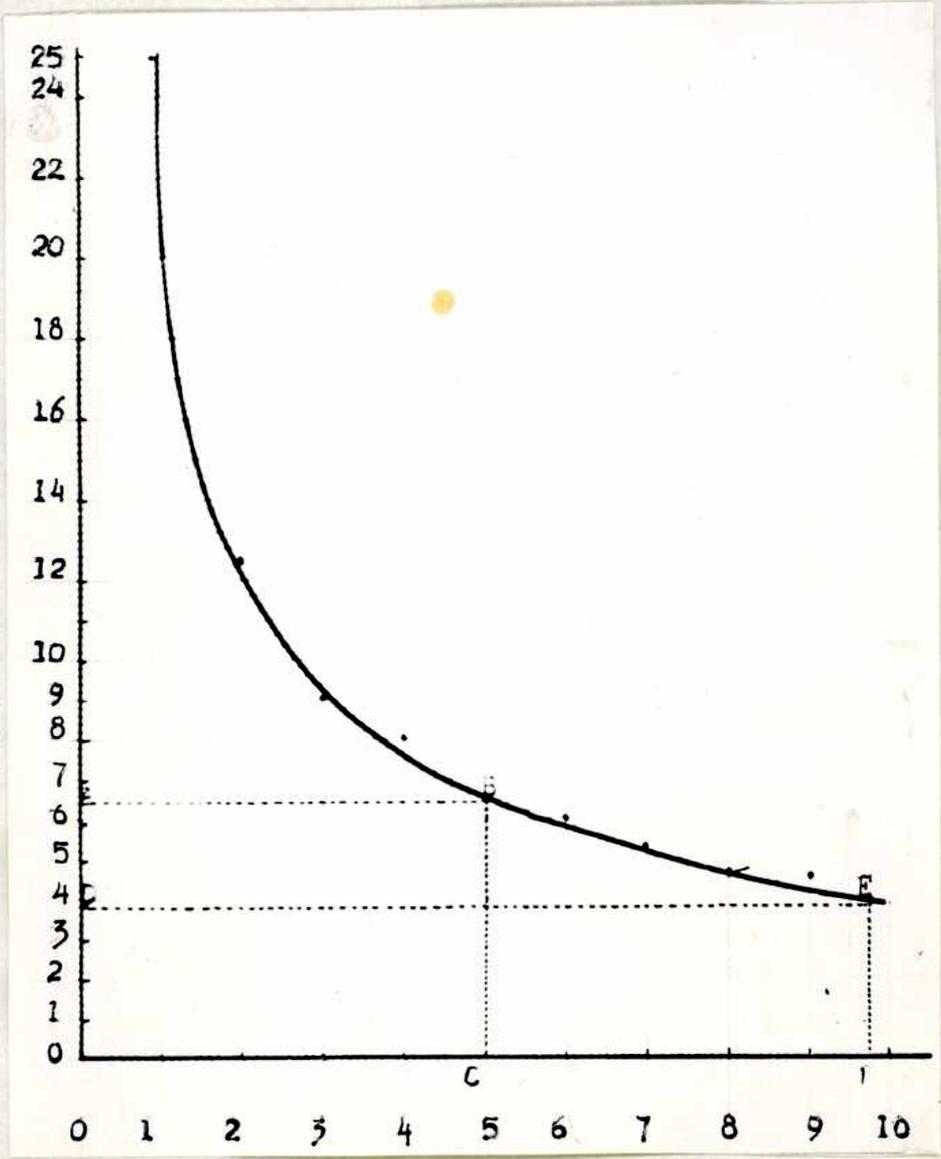
centímetro cúbico el tiempo de coagulación es ahora de 4 minutos, tiempo que está comprendido entre el de los tubos de 10 gammas por centímetro cúbico ~~de~~ ^y 9 gammas por centímetro cúbico, y corresponde por lo tanto a una concentración ^{probable} de 9,5 gammas por centímetro cúbico, como en el tubo habíamos puesto 50 gammas y ahora sólo encontramos 9,5 significa que han desaparecido 40,5:

50	-----	40,5
100	-----	81

La atenuación que ahora encontramos es de 81%. Hay una diferencia de 1% entre las dos medidas, tolerable perfectamente en un método biológico.

Posteriormente el empleo continuo de este método nos indicó a menudo se debía interpolar y esto nos indujo a hacer un tipo de interpolación gráfica que es más simple. Para ello se establece la escala de coagulación a tiempo cero, como antes, con estos valores se construye una curva en coordenadas cartesianas - ortogonales poniendo como abscisas la concentración de veneno en gammas por centímetro cúbico y como ordenadas el tiempo de coagulación, en minutos. Una curva de este tipo es de la que figura en la página siguiente. Para determinar la atenuación se procede como en el caso anterior, pero en lugar de realizar un cálculo se toma en ordenadas el tiempo de coagulación observado para la solución en ensayo y se traza una paralela que corta a la curva trazada, en ese punto se baja una perpendicular al eje de las

concentraciones y el punto de contacto determina exactamente la concentración en veneno activo en ese tubo. En general se prefieren hacer diluciones de modo que esa concentración final sea de 5 gammas por centímetros cúbico o menor porque evidentemente se ve en la curva a mayores diluciones la diferencia de tiempo es mayor, para una misma diferencia de concentración, y la exactitud de la medición lo es también.



Sea por ejemplo el tubo 2' a la altura correspondiente trazamos el segmento AB y por B la perpendicular al eje de las x a quien corta en C, el punto C nos dá la concentración de 5 gammas por centímetro cúbico que es lo que ahora se encuentra presente en el tubo, hacemos los mismos cálculos que la vez pasada y encontramos una atenuación de 80%. Para el tubo 1' en lugar del interpolador trazamos el segmento DE y por E la perpendicular al eje de las concentraciones, el punto F nos dá la cantidad de gammas por centímetro cúbico presentes en ese tubo, en este caso 9,75; originalmente había 50 gammas por centímetro cúbico luego se han destruido 40,25.

50	50	γ/cc	-----	40,25	γ/cc
	100	γ/cc	-----	80,5	γ/cc

Luego la atenuación es de 80,5%.

Curvas similares a la anterior se obtienen con los venenos dá Bothrops Jararaca y Bothrops Neuwiedii.

Un método gráfico similar fué propuesto por Houssay, Sordelli y Negrette (1918) quienes por la necesidad de su trabajo establecieron la curva que se extiende hasta soluciones de veneno muy concentradas mientras que nosotros sólo usamos la región entre 1 y 10 gammas por centímetro cúbico.

Slotta y otros (1937) han establecido un método semejante para el dosaje del principio coagulante de los venenos definiendo la unidad coagulante (U.C.O.) como la cantidad de veneno en gammas que tiene una acción coagulante establecida en la siguiente forma: el veneno se disuelve en un centímetro cúbico se solu-

ción fisiológica, se le añade 5 centímetros cúbicos de sangre oxalada y se busca la cantidad que produce la coagulación de esos 6 centímetros cúbicos de líquido en 10 minutos, exactamente. La cantidad de veneno en gammas presente en un centímetro cúbico de líquido o sea la sexta parte de la original es la unidad de coagulación, llamándose "Tenor de coagulación de un venenos" a la cantidad de unidades coagulantes que tiene un miligramo de veneno secado al vacío.

Un método de este tipo pensamos utilizar en el trabajo pero fué abandonado al encontrar que los tiempos de coagulación variaban con los distintos plasmas (cosa que no sucede en las experiencias de Slotta) y por lo tanto sólo podría utilizarse estableciendo un veneno tipo que sirviera de término de comparación de las unidades de coagulación. Fué por esta razón que lo abandonamos y empleamos el descrito más arriba con los resultados ya mencionados.-

ACCION DE LA TEMPERATURA SOBRE EL PRINCIPIO COAGULANTE.

La atenuación en soluciones, del poder coagulante de los venenos por el calor es conocido desde hace tiempo. Puede mencionarse el trabajo de Houssay, Sordelli y Negrette (1918), cuyos autores a parte de constatar el hecho antes mencionado encuentran que los venenos de serpientes del género Bothrops, entre 60° -70° C. tienen una disminución brusca del poder coagulante apareciendo aumentar esta propiedad a los 80° C. produciéndose desde ahí una disminución lenta. Estos mismos autores encuentran que el veneno de B. Alternata no presenta siempre la recuperación.-

Braier (1935) encuentra, como en el trabajo anterior y como hemos confirmado nosotros que a partir de 37° C., con el aumento de temperatura, la actividad coagulante del veneno ^{de B. Alternata} disminuye progresivamente, obteniéndose anulación total entre 72° C- 75° C.

Nosotros estudiamos la estabilidad de los tres venenos, empleados en solución acuosa, al pH (pH 6) que resulta por simple disolución de los mismos y a las temperaturas que se indican en cada caso particular.

Los cuadros que van a continuación constan de seis columnas, la primera indica la concentración de la solución original del veneno - que fué sometida a calentamiento; la segunda indica el tiempo de calentamiento; la tercera, el tiempo de coagulación de la solu-

ción de veneno, diluida convenientemente después de la experiencia; la cuarta columna expresa la cantidad de veneno activo que de acuerdo con la concentración original y posterior dilución debería existir en un centímetro cúbico si el veneno no hubiera sido calentado; la quinta columna da la cantidad de veneno activo presente en un centímetro cúbico, después de calentar; finalmente, la sexta columna da el porcentaje de atenuación sufrida por el veneno, resultante de la diferencia de las dos anteriores.-

VENENO DE BOTHROPS ALTERNATA.

Se utilizó veneno de Bothrops Alternata al uno por mil; las temperaturas ensayadas fueron 100° -56° -42° y 37° C. Se tomaron muestras a tiempos definidos y se determinó el tiempo de coagulación por el método indicado en la parte correspondiente. Se obtuvieron los siguientes resultados:

E N S A Y O S a 100 C.

I Concentr. original (γ/cc.)	II Tiempo de calentam.	III Tiempo de coag.(min)	IV Veneno acti- vo calculad. (γ/cc.)	V Ven. activo encontrado (γ/cc.)	VI Porcent. atenuac.
100	15 m	25	100	3	97
100	30 m	38	100	2	98
100	60 m	no coagul.	100	1	99
1000	15 m	7½	100	3,5	96,5
1000	30 m	6	1000	5	98,5
1000	60 m	29	1000	1	99,9

ENSAYOS a 56° C.

I Concentración original (γ /cc)	II Tiempo de calent.	III Tiempo de coagula. (min)	IV Ven.en.act. calculad. (γ /cc)	V Ven.activ. encontrad. (γ /cc)	VI Porcentaj. de atenua.
1000	15 m	15	10	1,5	5
1000	30 m	24	10	1	90
1000	60 m	28	10	1	90

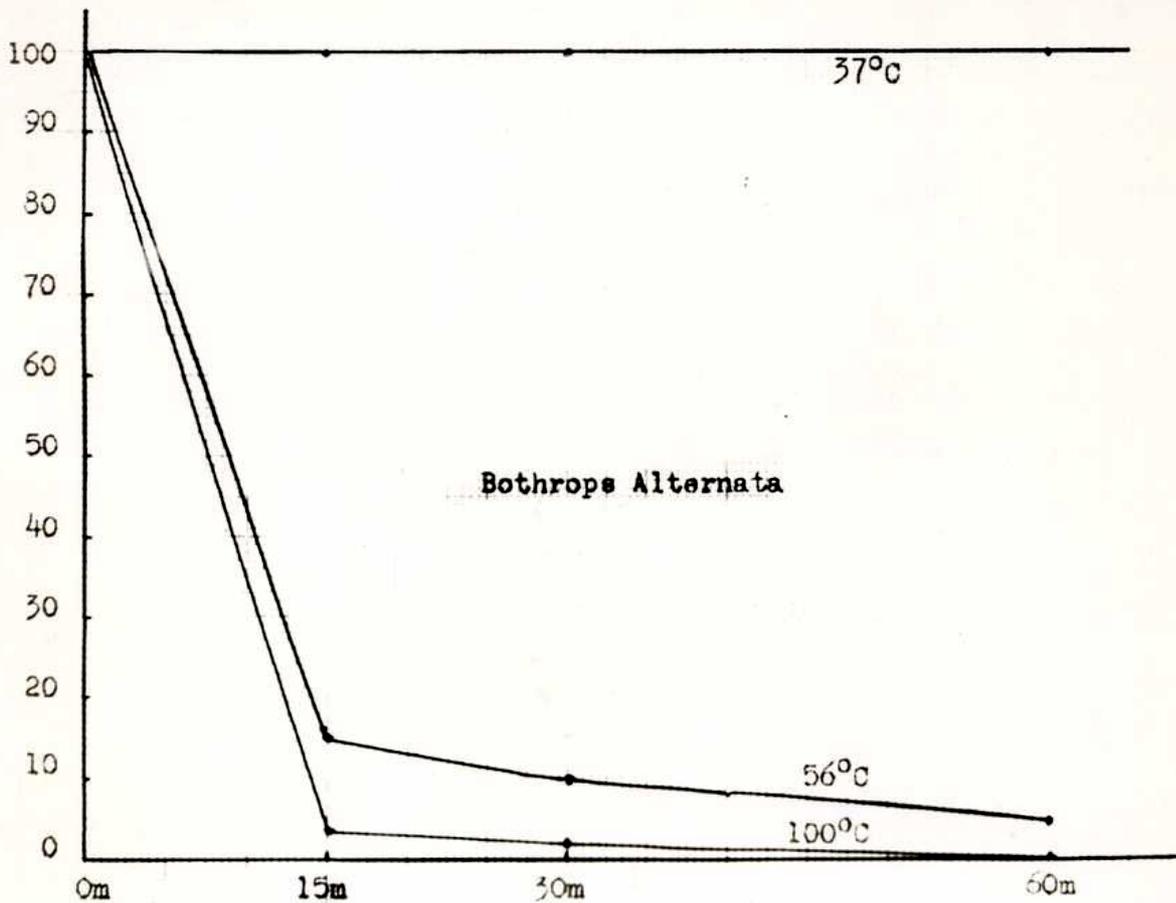
ENSAYOS a 42° C.

I	II	III	IV	V	VI
1000	15 m	4½	10	10	0
1000	30 m	4½	10	10	0
1000	60 m	5	10	6,5	35

ENSAYOS a 37° C.

I	II	III	IV	V	VI
1000	15 m	4½	10	10	0
1000	30 m	4½	10	10	0
1000	60 m	4½	10	10	0
1000	24 m	4½	10	10	0

El gráfico adjunto muestra lo expresado en el cuadro, cada una de las líneas representa una temperatura. En las ordenadas figura la actividad (cien menos atenuación) y en abscisas el tiempo de calentamiento en minutos.-



Se hicieron además ensayos de estabilidad a temperatura ambiente (18° - 20°C.) y en frío (0°C) cuyo resultado está tabulado a continuación:

TEMPERATURA AMBIENTE.

I Concentración original (γ/cc)	II Tiempo de experienc. (horas)	III Tiempo de coagulac. (min)	IV Ven. activ. calculado (γ/cc)	V Ven. activ. encontrado (γ/cc)	VI porcent. atenuac.
1000	24	3	10	10	0
1000	24	3	10	10	0
1000	24	3½	10	8	10

ENSAYOS EN FRIO.

1000	24	3	10	10	0
100	24	3	10	10	0
10	24	3	10	10	0

VENENO DE BOTHROPS NEUWIEDII.

La estabilidad a la temperatura, del principio coagulante del veneno de Bothrops Neuwiedii fué determinado en la misma forma que en el caso anterior y a las temperaturas de 100° -56° y 37° C.

Para información en el trabajo corriente se hizo una comparación a temperatura ambiente y otra a frío (0° C.). En los casos de temperatura ambiente se determinó también la influencia de la dilución en la atenuación, permaneciendo los demás factores constantes. Se obtuvieron los siguientes resultados:

ENSAYOS A 56° C.

I Concentrac. Original (γ/cc)	II Tiempo de Calentam. (horas)	III Tiempo de coagulac. (min)	IV Veneno act. calculado. (γ/cc)	V Veneno act. encontrado (γ/cc)	VI Porcentaj. de atenuac.
1000	$\frac{1}{4}$	10	10	1	90
1000	$\frac{1}{2}$	4 $\frac{1}{2}$	100	4	96
1000	1	7	100	3	97
1000	24	8	100	2	98
100	$\frac{1}{4}$	11	10	1	90
100	$\frac{1}{2}$	5	100	3	97
100	1	13	100	1	99
100	2	4	1000	4	99,6
100	24	12	1000	1	99,9
10	$\frac{1}{4}$	12	10	1	90
10	$\frac{1}{2}$	13	10	< 1	> 90
10	1	21	10	< 1	> 90
10	2	30	10	< 1	> 90
10	24	no coagula	10	< 1	> 90

ANSAYOS A 100° C.

I Concentración original. (γ /cc)	II Tiempo de calentam. (horas)	III Tiempo de coagulac. (min)	IV Ven. activ. calculado (γ /cc)	V Ven. act. encontra. (γ /cc)	VI Porcent atenuac.
1000	$\frac{1}{4}$	8	100	2	98
1000	$\frac{1}{2}$	$2\frac{3}{4}$	1000	10	99
1000	1	$5\frac{1}{2}$	1000	3,5	99,65

ENSAYOS A 37° C

I	II	III	IV	V	VI
1000	$\frac{1}{4}$	$2\frac{1}{4}$	10	10	0
1000	$\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	10	9	10
1000	1	$2\frac{1}{2}$	10	9	10
1000	2	$2\frac{1}{2}$	10	9	10
1000	24	$2\frac{3}{4}$	10	8	20
100	$\frac{1}{4}$	$2\frac{1}{2}$	10	9	10
100	$\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	10	9	10
100	1	$2\frac{1}{2}$	10	9	10
100	2	$2\frac{1}{2}$	10	9	10
100	24	$3\frac{1}{2}$	10	5	50
10	$\frac{1}{4}$	$2\frac{3}{4}$	10	8	20
10	$\frac{1}{2}$	$2\frac{3}{4}$	10	8	20
10	1	$3\frac{1}{2}$	10	5	50
10	2	$3\frac{3}{4}$	10	4	60
10	24	5	10	3	70

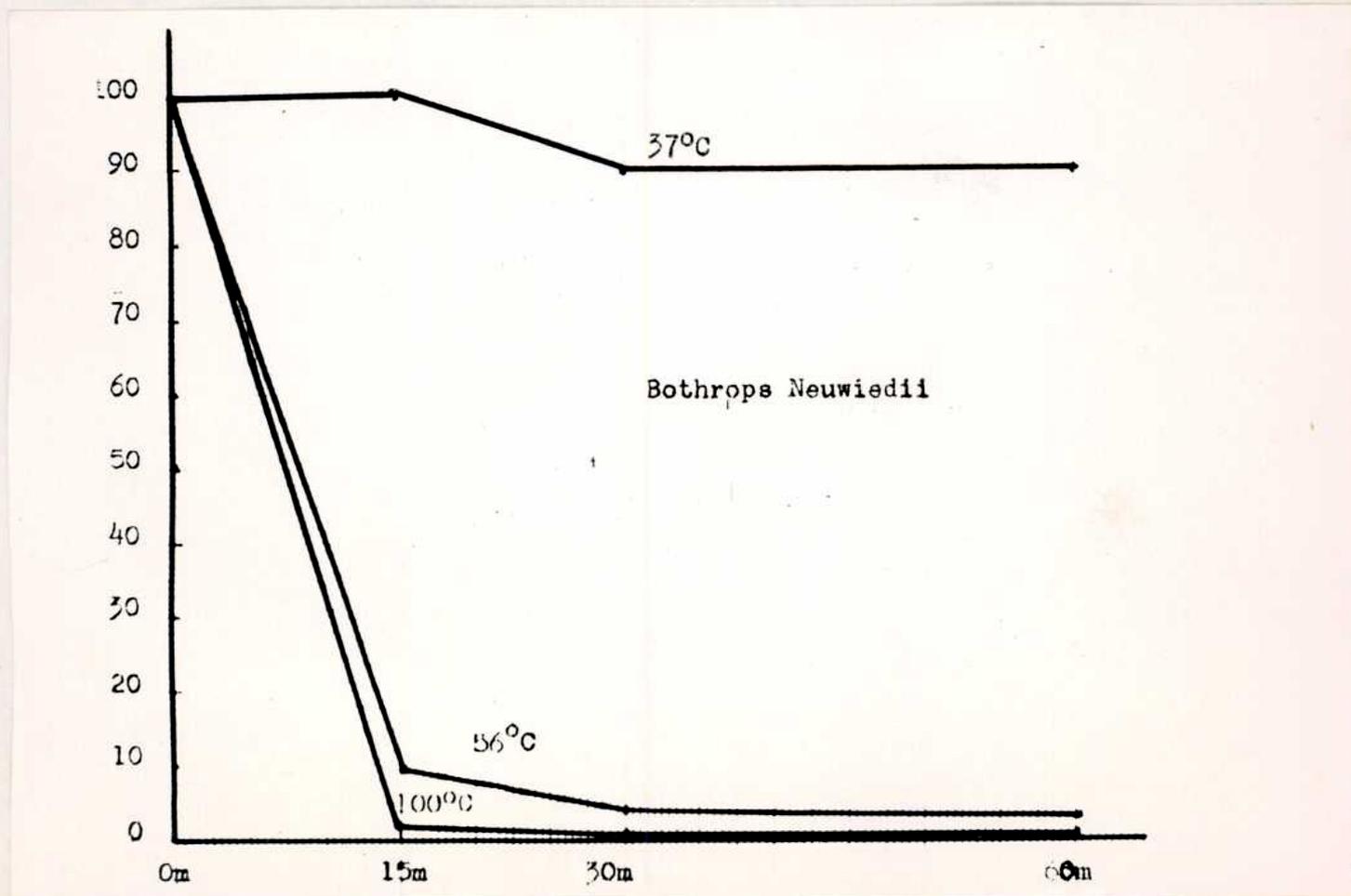
ENSAYOS A TEMPERATURA AMBIENTE.

I Concentración Original (γ /cc)	II Tiempo de experienc. (horas)	III Tiempo de coagulac. (min)	IV Venén.activ. calculado (γ /cc)	V Ven.act. encontr. (γ /cc)	VI Porcent. actenua.
1000	24	3	10	9	10
100	24	3	10	9	10
10	24	3	10	9	10

ENSAYOS EN FRIO (0° C.)

I	II	III	IV	V	VI
1000	24	3	10	9	10
100	24	3	10	9	10
10	24	3½	10	7	30

El gráfico adjunto muestra el comportamiento del veneno B. Neuwiedii a distintas temperaturas:



VENENO DE BOTHROPS JARARACA.

La estabilidad térmica del principio coagulante del veneno de Bothrops Jararaca fué determinada en la misma forma que en el caso anterior, se obtuvieron los siguientes resultados:

ENSAYOS A 100 ° C.

I Concentra. original. (γ/cc)	II Tiempo de calentam. (γ/cc)	III tiemp.de coagulac (min)	IV 'en.activ. calculado (γ/cc)	V Ven.act. encontr. (γ/cc)	VI Porcentaje atenuación
1000	1/4	5	100	10	90
1000	1/2	7	100	4	96
1000	1	11	100	3	97
1000	1/4	4	100	10	90
1000	1/2	5	100	5	95
1000	1	6 1/2	100	3	97
1000	1/4	10	100	8,5	91,5
1000	1/2	20	100	5	95
1000	1	24	100	2	98

ENSAYOS A 56 ° C.

100	1	20	10	4,5	55
100	2	27	10	4	60
100	24	52	10	1	90
10	1	32	10	2	80
10	2	38	10	1	90
10	24	52	10	1	90

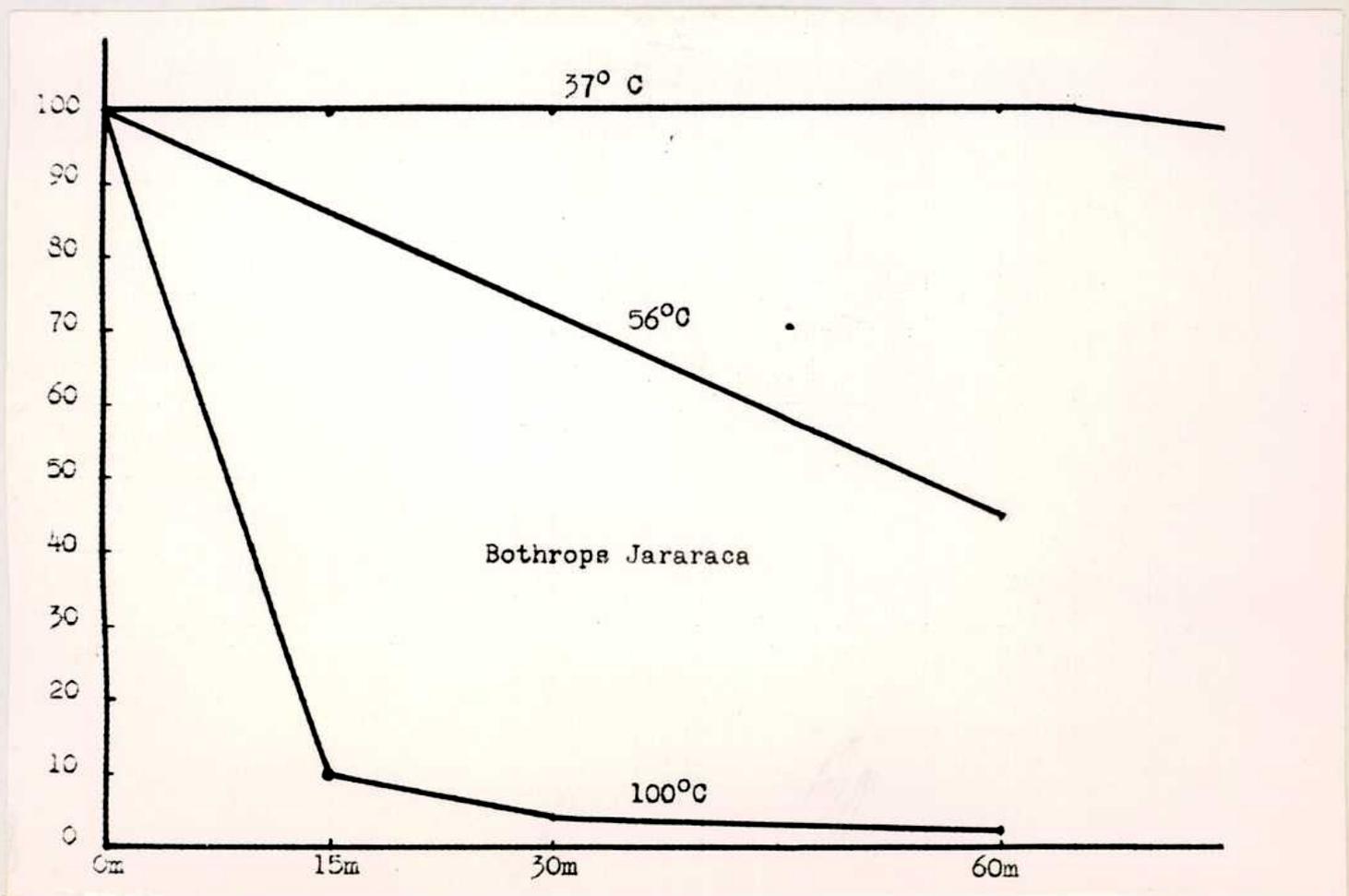
ENSAYOS A TEMPERATURA AMBIENTE.

I Concent. origin. (γ /cc)	II Tiemp.de experien. (horas)	III Tiemp.de coagulac (min)	IV Ven.activ. calculado (γ /cc)	V Ven.activ. encontrado (γ /cc)	VI Porcentaje atenuación
1000	24	3	10	10	0
100	24	3½	10	5	50
10	24	9	10	2,5	75

ENSAYOS EN FRIO (0 ° C)

I	II	III	IV	V	VI
1000	24	3½	10	9	10
100	24	6	10	4,5	55
10	24	12,5	10	2	80

Adjunto figura el gráfico de la estabilidad térmica del veneno B.Jararaca.



ENSAYOS A 37° C.

I	II	III	IV	V	VI
Concent. original (γ /cc)	Tiemp.de experien. (horas)	Tiemp.de coagulac. (min)	Ven.activ. calculado (γ /cc)	Ven.activ. encontrad. (γ /cc)	Porcentaje atenuacion
1000	$\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$	10	10	0
1000	$\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$	10	10	0
1000	1	$3\frac{1}{2}$	10	10	0
1000	2	$4\frac{1}{2}$	10	8-9	10-20
1000	3	$4\frac{1}{2}$	10	8-9	10-20
1000	24	$5\frac{1}{2}$	10	6	40
1000	72	$7\frac{1}{2}$	10	2	80
100	1	$7\frac{1}{2}$	10	9	10
100	2	$7\frac{1}{2}$	10	9	10
100	24	11	10	6,5	35
10	1	11	10	6,5	35
10	2	12	10	6	40
10	24	14	10	5	50

Observando las curvas obtenidas por nosotros para los tres venenos se ve que el principio coagulante puede considerarse estable en solución, a 37°C. aún cuando se observan pequeñas ^{Atenuaciones} ~~desviaciones~~ (10 % en el veneno de B. Neuwiedii). A 56°C. se observa una gran atenuación para los venenos de B. Neuwiedii y B. Alternata (Algo mayor para el primero), y una bastante menor en el de B. Jararaca, hecho confirmado por el dato de 24 horas (100 δ /cc. concentración original) en que para el veneno de B. Neuwiedii la atenuación es total, mientras que para el veneno de B. Jararaca es tan sólo de 90 por ciento. A 100°C. y una hora de calentamiento los tres venenos pueden considerarse totalmente atenuados.

ACCION DE LOS DISTINTOS pH SOBRE EL PODER COAGULANTE
DE VENENOS DEL GENERO BOTHROPS.

Hace ya veinte años Houssay, Sordelli y Negrette (1918) al estudiar el problema de la acción de los venenos de serpientes sobre la coagulación de la sangre determinaron la estabilidad del principio de Bothrops Alternata frente a los ácidos y a los álcalis; utilizando soluciones de hidróxido de sodio y de ácido clorhídrico, que variaban entre N/10000 y N/2, encontraron que, en general, a concentraciones altas, alrededor de N/50 para los álcalis, el veneno se atenuaba fácilmente; resultó más sensible a la acción de los ácidos, pues en solución N/100 de ácido clorhídrico ya se notaba una atenuación evidente.

Esta inestabilidad del principio coagulante frente a los álcalis y ácidos fuertes, estudiada en el veneno de B. Alternata ha sido confirmada posteriormente para otros por diversos autores. Slotta y otros (1937) lo establecieron para el B. Jararaca y el Crotalus T. Terrificus; por las cifras de una serie de cuadros que publicaron, se puede ver que, la estabilidad del principio coagulante de esos venenos es muy pobre a pH muy ácidos o muy alcalinos, mientras que es mucho mayor a pH alrededor de la neutralidad. De los dos venenos el de Crotalus T. T. es mucho más estable que el de Bothrops Jararaca. -

Vinculado a estos hechos, aunque no se refiera directamente a la estabilidad del principio coagulante frente a los distintos pH, sino más bien al pH en que se realiza un óptimo de coagulación (sin neutralización), puede citarse el trabajo de Eagle H. (1937) quien encontró que el óptimo de coagulación para el veneno de Bothrops Jararaca era 6,5.-

Micheel y Jung (1936) estudiaron la estabilidad del principio tóxico del veneno de Bothrops Alternata, encontrando con algunas pequeñas diferencias una atenuación semejante a la hallada por nosotros para el principio coagulante del mismo veneno.

Las únicas diferencias en contra de estos hechos son las publicadas por Klobusitzky (1935) quien, al hacer una serie de ensayos de purificación del veneno B. Jararaca lo puso en contacto con soluciones de fosfato trisódico al 9% que poseían un pH. superior a 12, encontrando, sin embargo, que, podía recuperar, del veneno disuelto en las mismas, una parte del poder coagulante. La contradicción podría explicarse porque la atenuación no es instantánea y las recuperaciones que obtiene, bastante pequeñas.-

Los ensayos que nosotros hemos realizado tuvieron por objeto estudiar la estabilidad de distintos venenos de serpientes del género Bothrops, disueltos en soluciones buffers que dan pH variable.

Deseábamos tener una idea de las regiones de estabilidad, y saber el pH en que se puede trabajar sin atenuación, a fin de aplicar luego ese conocimiento al estudio del veneno.

Como en las experiencias descritas anteriormente, el veneno de *B. Alternata* y *B. Neuwiedii* procede de las víboras llegadas al Instituto Bacteriológico (D.N.H.). El veneno de *B. Jararaca* procede del Instituto Butatán del Brasil, por gentileza de su director Dr. Afradio Do Amaral.

SOLUCIONES DE VENENO.

Para preparar las soluciones se procedió en la siguiente forma: se pesó 0,05 gr de veneno y se agregaron cincuenta centímetros cúbicos de agua destilada obteniéndose soluciones al uno por mil. Luego la solución se diluyó hasta la concentración de uno en diez mil (100 γ /cc). Esta dilución se hizo con la solución buffer cuya acción se deseaba estudiar. De la solución de veneno uno en diez mil, que se dejó a una temperatura de 18°-20° C., se tomaron de tiempo en tiempo muestras y se determinó sobre ellas la actividad coagulante, comparada con la actividad original del veneno colocado en condiciones de estabilidad máxima.

Para hacer el ensayo de coagulación se toma un centímetro cúbico de la solución en estudio y se neutraliza; las soluciones neutralizantes se preparan de tal concentración de modo de emplear en esa operación menos de un centímetro cúbico de la misma y luego se completa a dos centímetros cúbicos con agua destilada; así la concentración es de 50 γ /cc; se diluye luego de tal modo que se puede utilizar el método de coagulación descrito en otro lugar.

Un ensayo previo permite determinar, para cada pH, las concentraciones a que puede convenir utilizar esas soluciones. Cuando por esos ensayos previos se ve que la atenuación es muy grande, se pue-

de ensayar directamente, sin dilución posterior la solución neutralizada, pues si la atenuación es de alrededor de 80 %, los tiempos de coagulación, caen generalmente dentro de nuestra escala, confeccionada entre uno y diez γ por centímetro cúbico (ver método de medida)

SOLUCIONES BUFFERS.

Los buffers se prepararon con distintas mezclas salinas según las necesidades. Así las de pH 12,5 - 11,7 - 11,3 - 10,8 y 10,3, fueron preparados con fosfato trisódico 0,15 M y fosfato disódico 0,2 M (según Sørensen) haciendo una serie de mezclas cuyo pH se controló luego potenciométricamente utilizando electrodo de vidrio; de ellas se tomaron las que poseían un pH adecuado para nuestra experiencias. El control potenciométrico mostró que estas soluciones tenían una estabilidad conveniente para aquellos ensayos.-

Las soluciones entre pH 8 y 10 se obtuvieron en forma similar. Entre 5,3 y 8 se emplearon las mezclas de fosfatos de Sørensen siguiendo las indicaciones de Clark (1923). Las soluciones de pH inferior a 5,3 fueron preparadas de acuerdo con los tipos de Mc Ilvaine mezclando fosfato disódico 0,2 M y ácido cítrico, de acuerdo también con las indicaciones de Clark (1923).

En un ensayo de coagulación en presencia de las mismas cantidades de sales, pero llevando las soluciones a pH 7 (de gran estabilidad), se vio que las mezclas indicadas no tienen influencia propia en el fenómeno de coagulación. Como ejemplo podemos mencionar, de entre muchos, en siguiente:

Tiempo de coagulación de la solución acusa de veneno: $5\frac{3}{4}$ minutos.

Tiempo de coagulación de la solución de veneno en buffer: $5\frac{1}{2}$ minut.

Modificación debida a las sales: 0%.

Un ensaye similar, realizado con buffer de ftalato de potasio y ácido clorhídrico, indicó lo inadecuado de esta solución para nuestro estudio.

-----oo-----

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO INDIVIDUAL DE LOS VENENOS A DIFERENTES

pH.

En todos los cuadros que van a continuación la primera columna indica a qué tiempos se han controlado las actividades de diversas muestras de veneno al 1/10.000. La segunda indica que ^{tiempo} ha tardado en coagular el plasma puesto en contacto con la solución por analizar, habiéndose empleado el método ya indicado. En la tercera columna hemos señalado, por comodidad, la cantidad de veneno activo que de acuerdo con la concentración original debiera existir en un centímetro cúbico, si no existiese atenuación, la cuarta columna indica la cantidad de veneno realmente activo, presente en la solución, la diferencia entre la columna anterior y ésta es la cantidad de veneno cuya acción coagulante se ha inactivado. Finalmente la última columna indica el porcentaje de la atenuación habido. Los gráficos señalan aún mejor esas atenuaciones. En el eje horizontal se toman los tiempos de acción y en el vertical el porcentaje de actividad (cien menos atenuación).

pH 2.2

El buffer fué preparado según los tiempos descritos por Mc.Ilvaine (Clark, segunda edición 1923) con fosfato trisódico 0,2 M. y ácido cítrico 0,1 M.

BOTHROPS ALTERNATA

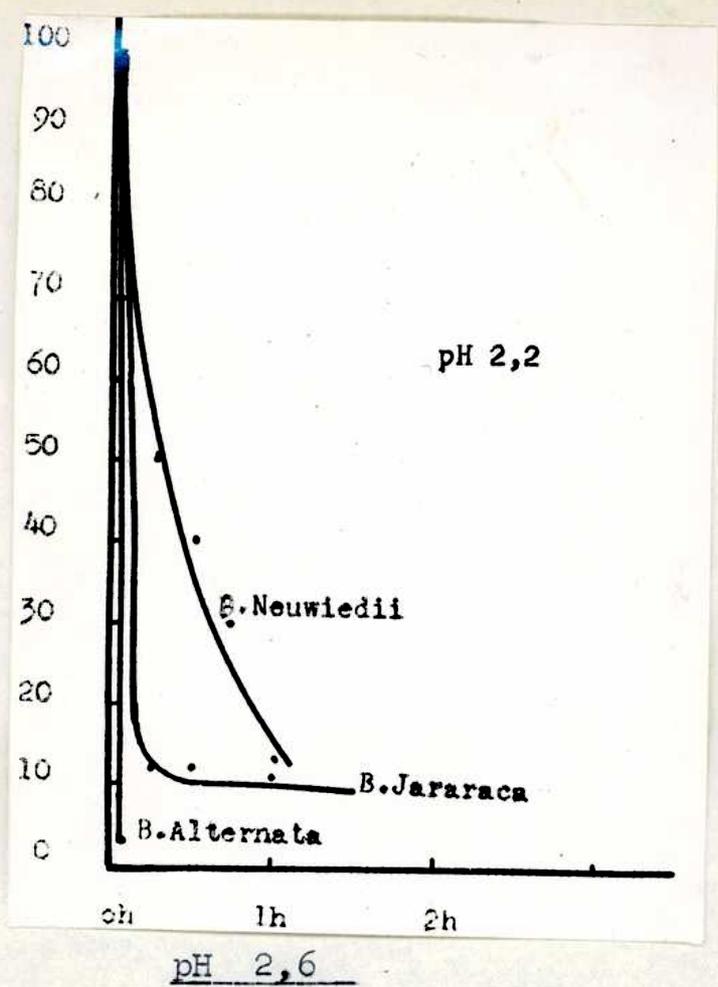
Tiempo de acción.	Tiempo de coagulación.	γ /cc orig.	γ /cc actual	Porcentaje de atenuación.
0 h	no coaguló	50	<1	>98
1 h	no coaguló	50	<1	>98
2 h	no coaguló	50	<1	>98

BOTHROPS JARARACA

Tiempo de acción.	Tiempo de coagulación	γ /cc orig.	γ /cc actual	Porcentaje de atenuación.
$\frac{1}{4}$ h	4 $\frac{1}{2}$ m	50	7	87,5
$\frac{1}{2}$ h	4 $\frac{1}{2}$ m	50	7	87,5
1 h	5 m	50	6	89
2 h	5 $\frac{1}{2}$ m	50	5	90
24 h	9 m	50	2 $\frac{1}{2}$	97,5

BOTHROPS NEUWIEDII

Tiempo de acción.	Tiempo de coagulación.	γ /cc orig.	γ /cc actual	Porcentaje de atenuación.
0 h	5 m	5	2,5	50
$\frac{1}{4}$ h	6 $\frac{1}{4}$ m	5	2,5	50
$\frac{1}{2}$ h	6 m	5	2	60
$\frac{3}{4}$ h	2 $\frac{1}{2}$ m	25	10	70
$\frac{5}{8}$ h	4 $\frac{1}{2}$ m	10	3	70
1 h	2 $\frac{1}{2}$ m	25	10	65
2 h	4 m	10	3,5	90



El buffer fué preparado según el tiempo de Mc Ilvaine.

BOTHROPS ALTERNATA.

Tiempo de acción.	Tiempo de coagulación	γ cc/orig.	δ/cc actual	Porcentaje de atenuación.
0 h	> 12 m	50	< 1	> 98
1/2 h	> 12 m	50	< 1	> 98
1 h	> 12 m	50	< 1	> 98

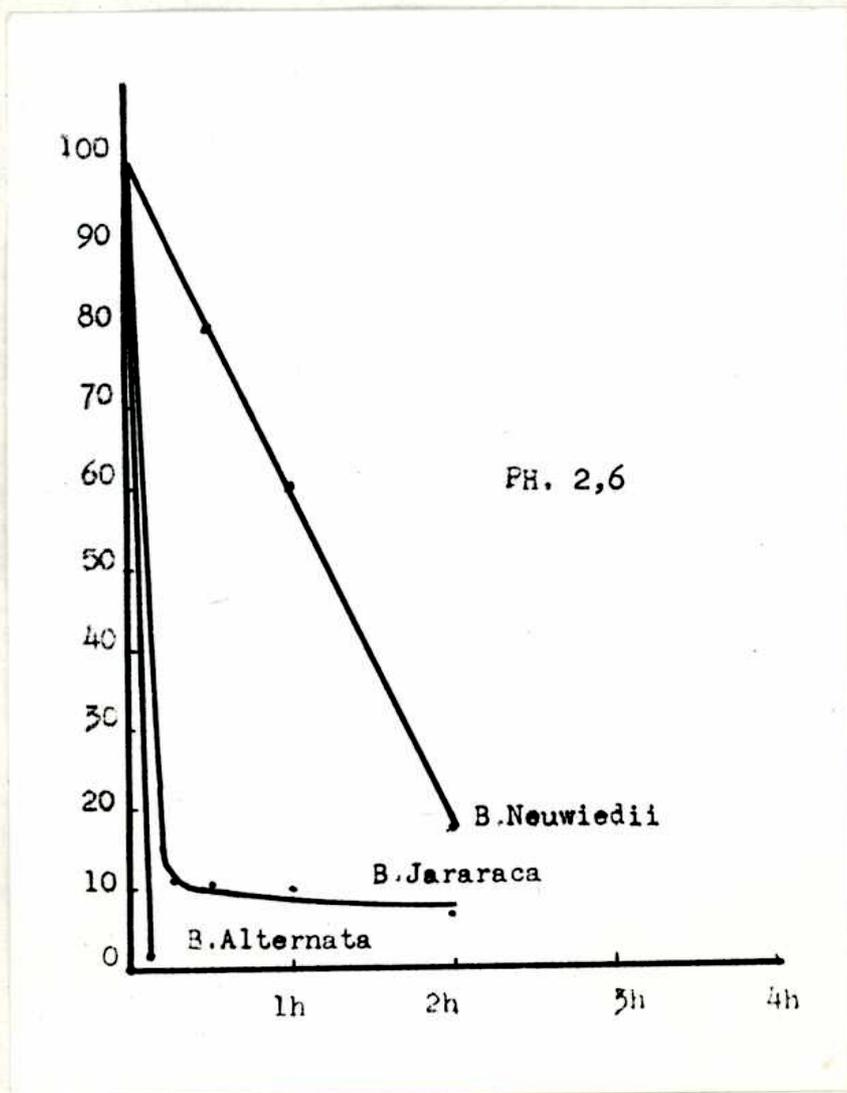
BOTHROPS JARARACA

Tiempo de acción.	Tiempo de coagulación.	γ cc/orig.	δ/cc actual	Porcentaj. de atenuación.
1/4 h	4 3/4 m	50	5,5	89
1/2 h	5 m	50	5	90
1 h	5 m	50	5	90
2 h	5 1/2 m	50	4,5	91
2 h	8 m	50	3	94

pH 2,6

BOTHROPS NEUWIEDII.

Tiempo de acción	Tiempo de coagulación	γ/cc org.	γ/cc actual	Porcentaje de atenuación
¼ h	5 m	5	2,5	50
½ h	3 m	10	8	20
1 h	3½ m	10	6	40
2 h	7 m	10	1,8	82



pH 3,2

Buffer preparado según el tipo de Mc Ilvaine.

B. AETERNITA.

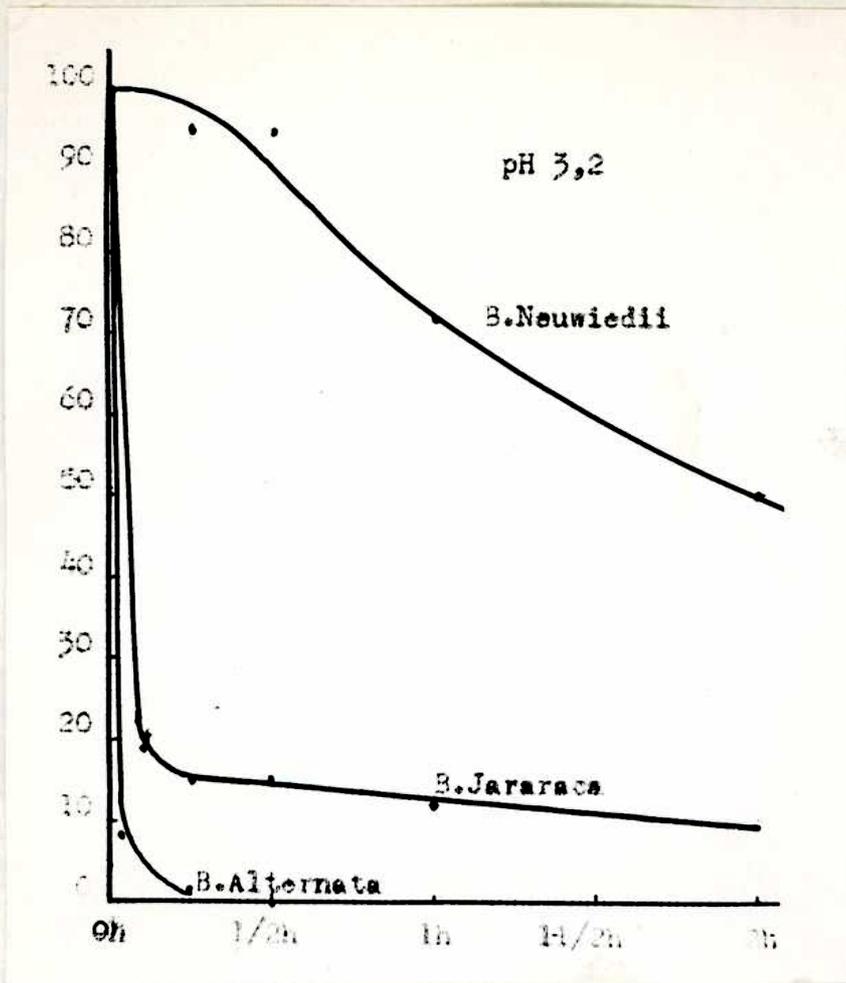
Tiempo de acción	Tiempo de coagulación	γ/cc orig	γ/cc actual	Porcent.de atenuación
0 h	5½ m	50	4	92
¼ h	12 m	50	1	98
1 h	>12 m	50	<1	>98
2 h	>12 m	50	<1	>98

B. JARARACA.

Tiempo de acción.	Tiempo de coagulación	γ/cc orig	γ/cc actual	Porcent.de atenuación.
5 m	5¾ m	25	4,75	81
¼ h	4 m	25	3,75	85
½ h	4½ m	25	3,75	85
1 h	8½ m	25	3	88
2 h	9½ m	25	2,5	90
24 h	9½ m	25	0,75	95

B. NEUWLEDII.

Tiempo de acción	Tiempo de coagulación	γ/cc orig.	γ/cc actual	Porcentaj.de atenuación.
¼ h	5 m	5	4,75	5
½ h	5 m	5	4,75	5
1 h	6¼	5	3,5	28
2 h	7 m	5	2,5	50
6 h	10½ m	25	1,75	98
24 h	no coagula	25	<1	>98



pH 3,8

El buffer se preparó según tipo de Mc Ilvaine.

B. ALTERNATA.

Tiempo de acción	Tiempo de coagulación	γ/cc orig	γ/cc actual	Porcentaje de atenuación.-
1 h	14 m	50	1	98

B. JARARACA.

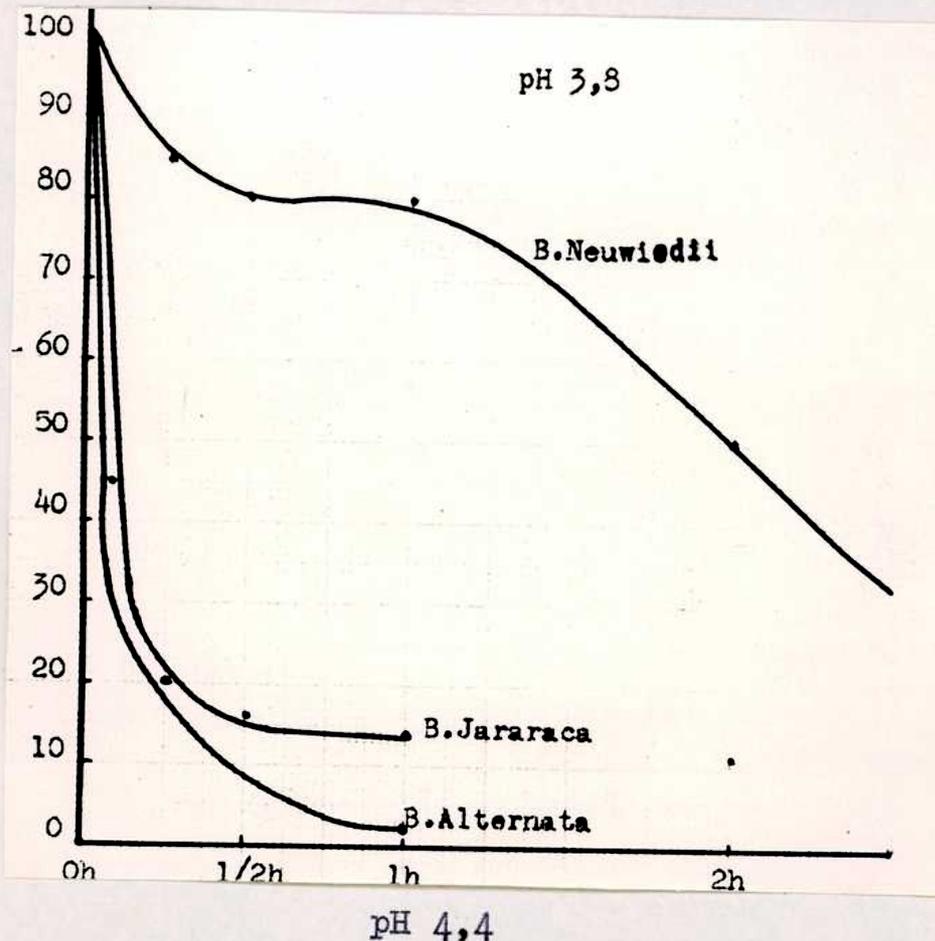
Tiempo de acción	Tiempo de coagulación	γ/cc orig.	γ/cc actual	Porcentaje de atenuación.
0 h	3 1/2 m	25	9	64
1/4 h	5 3/4 m	25	5	80.

B. JARARACA.

Tiempo de acción	Tiempo de coagulación	γ/cc orig	γ/cc actual	Porcentaj.de atenuación.
$\frac{3}{4}$ h	6 $\frac{1}{2}$ m	25	4	84
1 h	6 $\frac{3}{4}$ m	25	3,5	86
2 h	8 m	25	3	88
24 h	5 $\frac{1}{2}$ m	50	9	92

B. NEUWIEDII.

$\frac{1}{4}$ h	5 $\frac{1}{2}$ m	5	4,5	15
$\frac{1}{2}$ h	6 m	5	4	20
1 h	6 m	5	4	20
2 h	7 $\frac{3}{4}$ m	5	2,5	50
3 h	13 m	5	1	80
4 h	9 m	10	1,5	92



El buffer se preparó de acuerdo con el tipo de Mc. Ilvaine.

B. Alternata

Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	γ /cc original	γ /cc actual	Porcen. Aten.
1 h	6m	5	3,25	37,5
2 h	6 $\frac{1}{2}$ m	5	2,75	45
3 $\frac{1}{2}$ h	7 $\frac{1}{2}$ m	5	2,5	50
8 h	8 m	5	2,25	55,5
24 h	14 $\frac{1}{2}$ m	5	1	80

B. Jararaca

Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	γ /cc. original	γ /cc actual	Porcen. Aten.
$\frac{1}{4}$ h	4 m	10	8,5	20
$\frac{1}{2}$ h	6 m	5	4,75	15
$\frac{1}{2}$ h	4 m	10	8	20
$\frac{3}{8}$ h	7 m	5	4	20
1 h	8 m	5	3,5	30
2 h	10 $\frac{1}{2}$ m	5	3	40
5 $\frac{1}{2}$ h	12 m	5	2,25	50
24 h	14 m	10	2,75	72,5

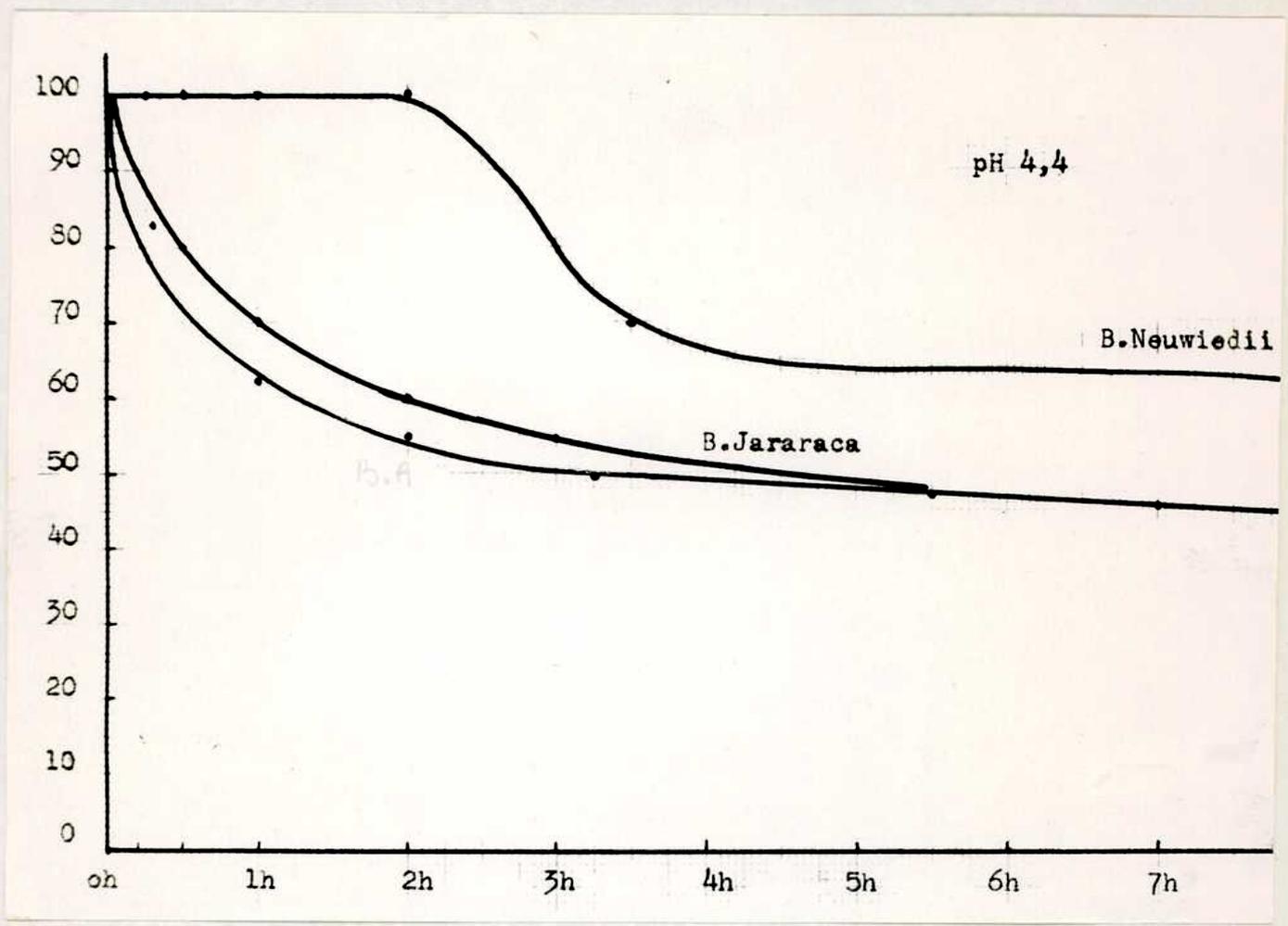
} 17,5
 } 20

B. Neuwiedii

Tiempo de acc.	Tiempo de coagulac.	γ /cc. original	γ /cc. actual	Porcen. Aten.
0 h	4 m	5	5	0
$\frac{1}{4}$ h	4 m	5	5	0
$\frac{1}{2}$ h	4 m	5	5	0
1 h	4 m	5	5	0
2 h	4 m	5	5	0
3 h	5 m	5	4	20
3 $\frac{1}{2}$ h	5 $\frac{1}{2}$ m	5	3,5	30

B. Neuwiedii

Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	γ/cc original	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
20 h	4 m	10	4,5	55



pH 5,3 -5,6 -6,2-7 y 7,6

Los buffers empleados para estos pH son las mezclas de fosfatos de Sørensen (Clark, 1923).

Aquí dadas las circunstancias del estudio conjunto de varios buffers de pH distinto se ha modificado algo la disposición de

de los cuadros: en la primera columna se consigna el tiempo de acción del buffer, en la segunda el pH a que está sometido el veneno y las siguientes se han utilizado como en el caso anterior.

B. Alternata

Tiempo de acc	pH	Tiempo de coag.	γ/cc orig.	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
4 h	5,3	4½ m	5	5	0
24h	5,5	4½ m	5	4,5	5
4 h	5,6	4½ m	5	5	0
24h	5,6	4½ m	5	5	0
4 h	6,2	5 m	5	4,5	5
24h	6,2	4½ m	5	5	0
4 h	7	4½ m	5	5	0
24h	7	4½ m	5	5	0
4 h	7,6	4½ m	5	5	0
24h	7,6	4½ m	5	5	0

B. Jararaca

7 h	5,3	6½ m	5	4,5	10
7 h	5,6	6½ m	5	4,5	10
7 h	6,2	6½ m	5	4,5	10
7 h	7	6 m	5	5	0
7 h	7,6	6½ m	5	4,5	0



B. Neuwiedii

Tiempo de acc.	pH	Tiempo de coag.	γ/cc original	γ/cc. actual	PorcentE. Aten.
4 h	5,3	4½ m	5	5	0
7 h	5,3	4½ m	5	5	0
30 h	5,3	5½ m	5	3,75	25
4 h	5,6	4½ m	5	5	0
7 h	5,6	5 m	5	5	0
30 h	5,6	5 m	5	5	0
4 h	5,6	5 m	5	5	0
7 h	6,2	4½ m	5	5	0
30 h	6,2	5 m	5	5	0
4 h	7	4½ m	5	5	0
7h	7	4½ m	5	5	0
30 h	7	5 m	5	5	0
4 h	7,6	4½ m	5	5	0
7 h	7,6	4½ m	5	5	0
30 h	7,6	5 m	5	4	20

pH 8,5 - 8,5- 9 - 9,5 y 10

Estos buffers fueron preparados con mezclas de fosfato diésódico, trisódico y monopotásico y fueron controladas potenciométricamente.

B. Alternata

Tiempo de acción	pH	Tiempo de coagul.	γ/cc original	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
24 h	8	7½ m	5	4,5	10
24 h	8	5	5	4,25	15

} 12,5

B. Alternata

Tiempo de acc.	pHemp	Tiempo de coagulac.	γ/cc original	γ/cc actual	Porcen. Aten.
24 h	8,5	7½ m	5	4,5	10
24 h	8,5	5 m	5	4,25	15
24 h	9	7½ m	5	4,25	15
24 h	9	5	5	4,25	15
24 h	9,5	7 m	5	4,5	10
24 h	9,5	5½ m	5	4	20
24 h	10	7 m	5	4,5	10
24 h	10	5½ m	5	4	20

B. Jararaca

4 h	8	7½ m	5	4,75	5
24 h	8	7 m	5	4	20
4 h	8,5	7½ m	5	5	0
24 h	8,5	7½ m	5	4	20
4 h	9	7½ m	5	4,5	10
24 h	9	6½ m	5	4,5	10
4 h	9,5	7½ m	5	4,75	5
24 h	9,5	6½ m	5	4,25	15
4 h	10	7½ m	5	4,5	10
24	10	5½ m	5	4,25	15

B. Neuwiedii

24 h	8	3½ m	5	5	0
24 h	8	4½ m	5	5	0
24 h	8,5	3½ m	5	5	0
24 h	8,5	4½ m	5	5	0

B. Neuwiedii

Tiempo de acción	pH	Tiempo de coagulac.	γ/cc original	γ/cc actual	Porcen. Aten.
24 h	9	4½ m	5	5	0
24 h	9,5	3½ m	5	5	0
24 h	9,5	4½ m	5	5	0
24 h	10	3½ m	5	5	0
24 h	10	4½ m	5	5	0

pH 10,3

El buffer fué preparado con fosfato trisódico al 9,0 y fosfato disódico y luego controlado potenciométricamente.

B. Alternata

Tiempo de acc.	Tiempo de coag.	γ/cc original	γ/cc actual	Porcen. Aten.
1 h	3½ m	10	9	10
2 h	4 m	10	10-9	0-10
3 h	4 m	10	9-10	0-10
7 h	3½ m	10	6	40
8 h	3½ m	10	6	40
24 h	5 m	10	5,5	45
54 h	9 m	10	4	50

B. Jararaca

1h	2½ m	10	10	0
2h	2m	10	8-9	10-20
3h	2m	10	8-9	10-20
7h	4½m	10	7	30
8h	4½m	10	7	30

<u>B. Jararaca</u>				
Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	γ/cc. original	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
24 h	5 $\frac{3}{4}$ m	10	6	40
54 h	5 $\frac{1}{4}$ m	10	5	50

<u>B. Neuwiedii</u>				
Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	γ/cc. original	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
1 h	2 m	10	10	0
2 h	2 m	10	10	0
3 h	2 m	10	10	0
7 h	2 m	10	10	0
8 h	2 m	10	10	0
24h	2 $\frac{1}{2}$ m	10	5	50
54h	7 m	10	6	40

pH 10,8

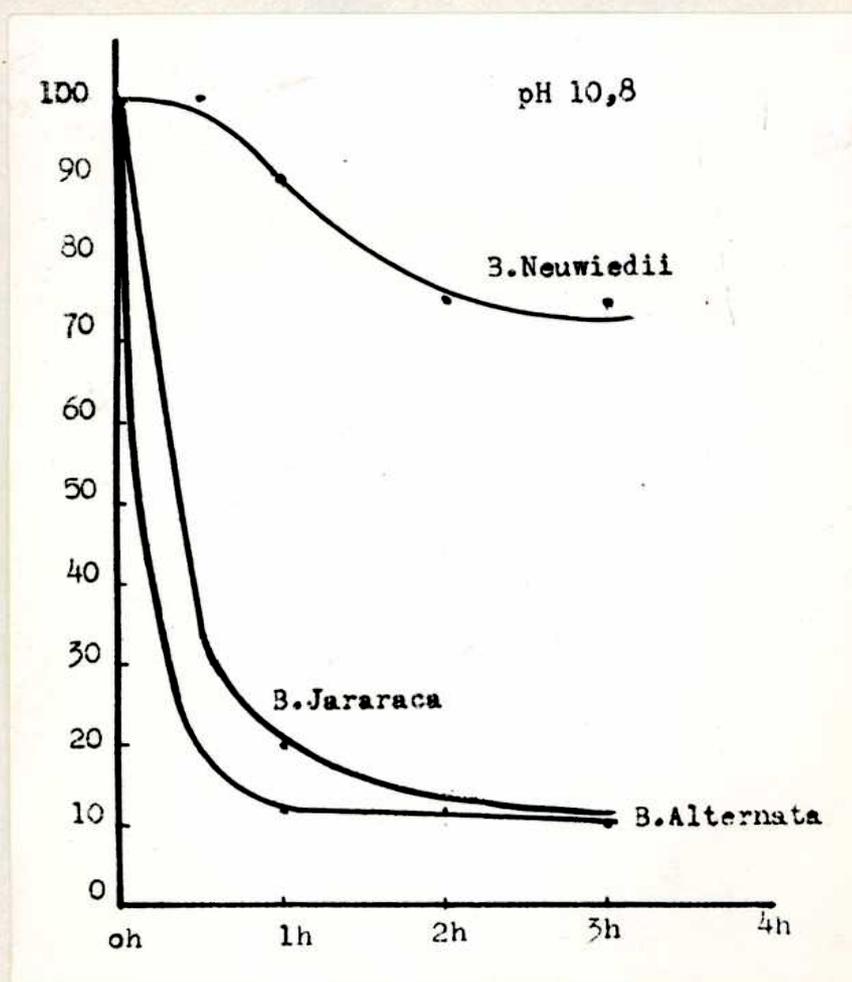
El buffer fué preparado como en el caso del pH 10,3

Tiempo de acción	<u>B. Alternata</u>			Porcen. At
	Tiempo coag.	γ/cc orig.	γ/cc act.	
1 h	4 $\frac{1}{2}$ m	25	3	88
2 h	4 $\frac{1}{2}$ m	25	3	88
3 h	5 m	25	2,5	90
24 h	no coagula	25	< 1	>98

<u>B. Jararaca</u>				
Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	γ/cc. original	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
1 h	4 $\frac{1}{2}$ m	25	5	80
2 h	6 $\frac{1}{2}$ m	25	2,5	90
3 h	10 m	25	2,25	94

B. Neuwiedii

Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	/cc. orig.	/cc. actual	Porcen. Aten.
$\frac{1}{2}$ h	$3\frac{1}{2}$ m	5	5	0
1 h	$3\frac{3}{4}$ m	5	4,5	10
2 h	$4\frac{1}{2}$ m	5	3,75	25
3 h	$4\frac{1}{2}$ m	5	3,75	25
24 h	$7\frac{1}{2}$ m	5	2	60

pH 11,3B. Alternata

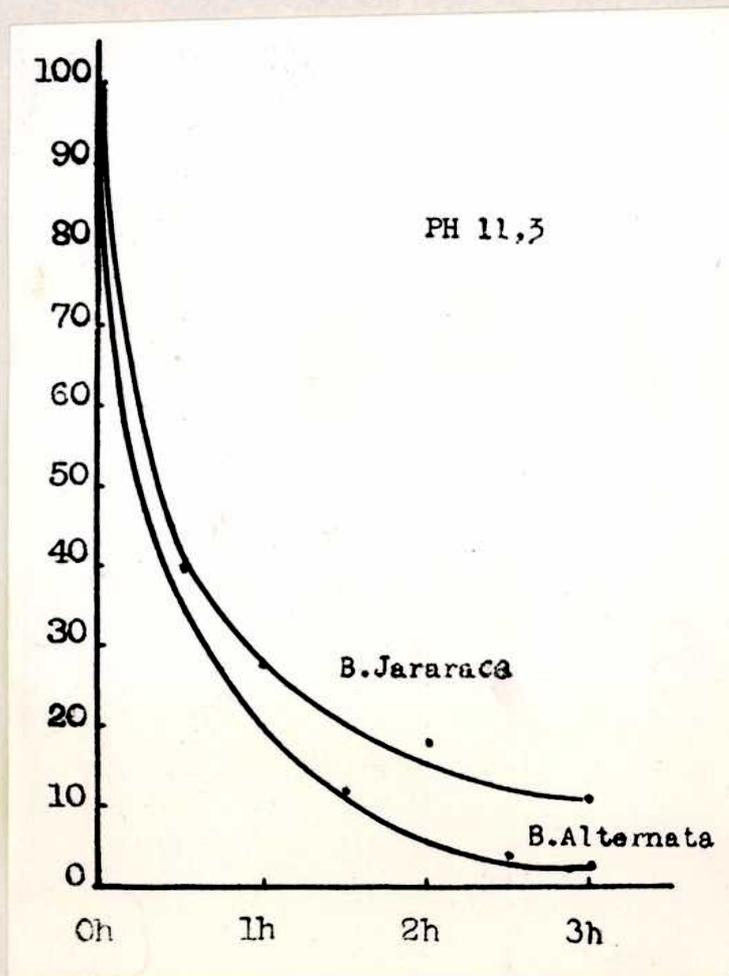
Tiempo de acción	Tiempo de coagulac.	γ/cc original	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
$\frac{1}{2}$ h	5 m	5,25	3	5
$1\frac{1}{2}$ h	$4\frac{1}{2}$ m	50	6	88

B. Alternata

Tiempo de acc.	Tiempo de coag.	γ /cc. original	γ /cc. actual	Porcen. Aten.
$2\frac{1}{2}$ h	9 m	50	2	96
3 h	$13\frac{1}{2}$ m	50	1	98

B. Jararaca

$\frac{1}{2}$ h	$3\frac{1}{2}$ m	25	10	60
1 h	$4\frac{1}{2}$ m	25	7	72
2 h	7 m	25	4	82
3 h	6 m	50	5,5	89



pH 11,7

El buffer, lo mismo que en el caso anterior y en los siguientes fué preparado con las mezclas de fosfato di y trisódico.

B. Alternata

Tiempo de acc.	Tiempo de coag.	γ/cc. original	γ/cc. actual	Porcen. Aten.
$\frac{1}{8}$ h	$5\frac{1}{8}$ m	50	4	92
1 h	15 m	50	<1	>98
$1\frac{1}{2}$ h	22 m	50	<1	>98

pH 12,5B. Alternata

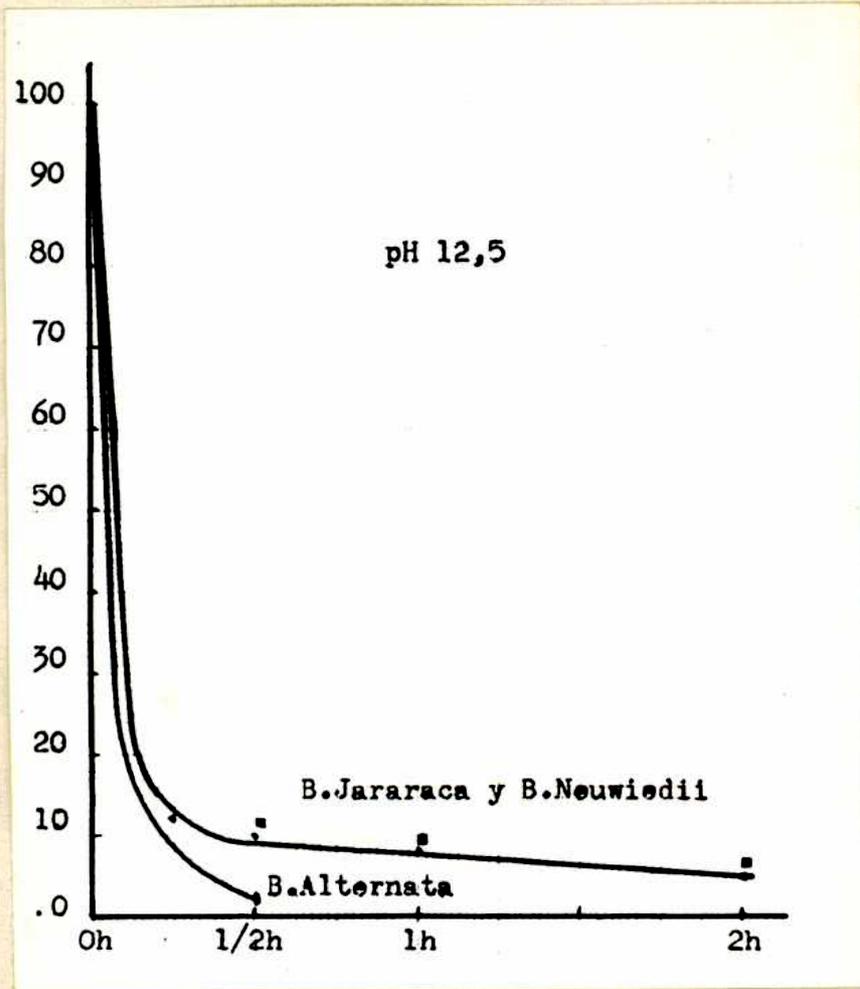
$\frac{1}{8}$ h	no coagula	50	<1	>98
-----------------	------------	----	----	-----

B. Jararaca

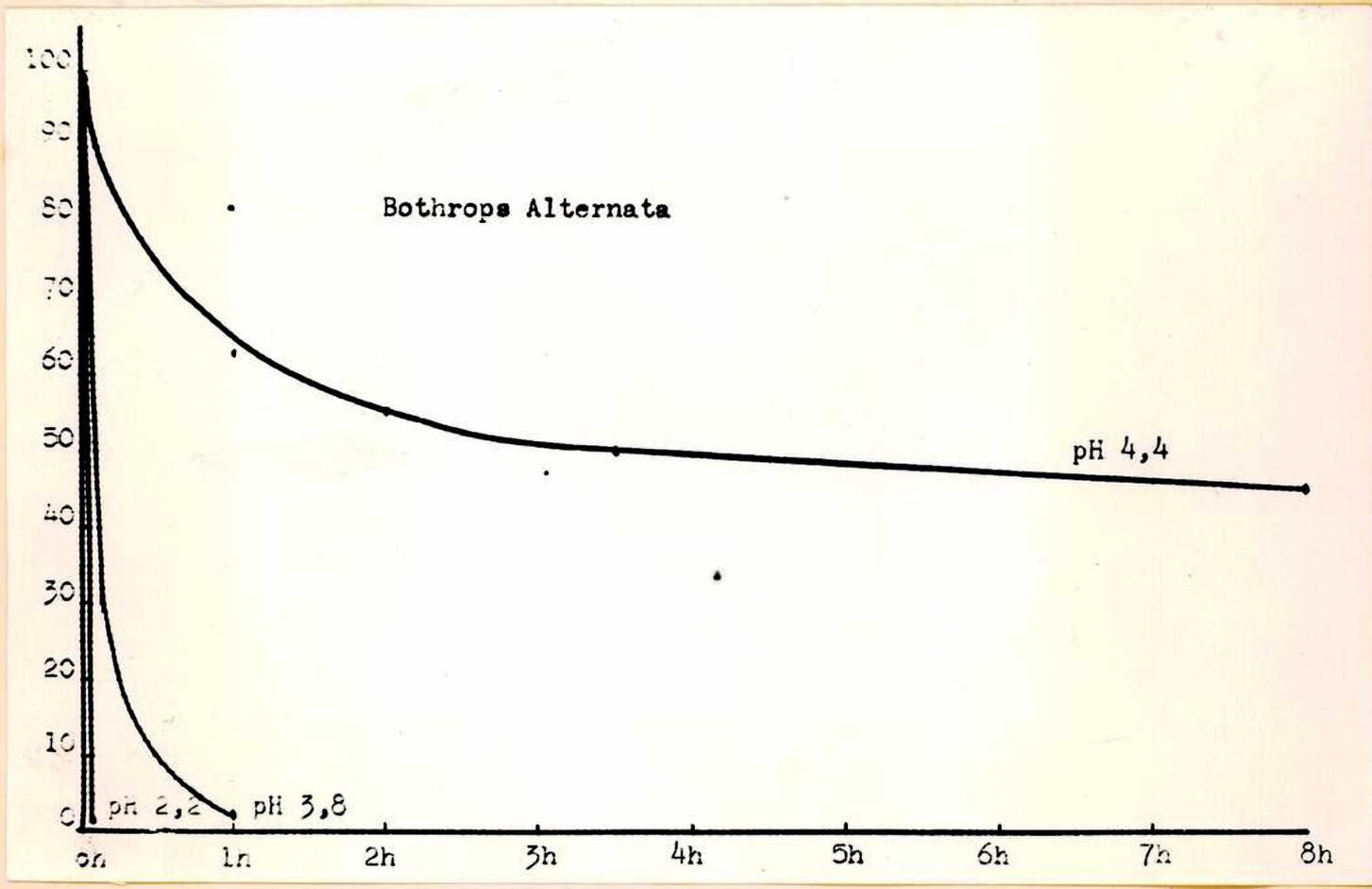
$\frac{1}{4}$ h	5 m	50	5,5	88
$\frac{1}{2}$ h	6 m	50	5	90
1 h	$7\frac{1}{2}$ m	50	3,5	92
2 h	$10\frac{1}{2}$ m	50	2,5	95
3 h	17 m	50	1	98

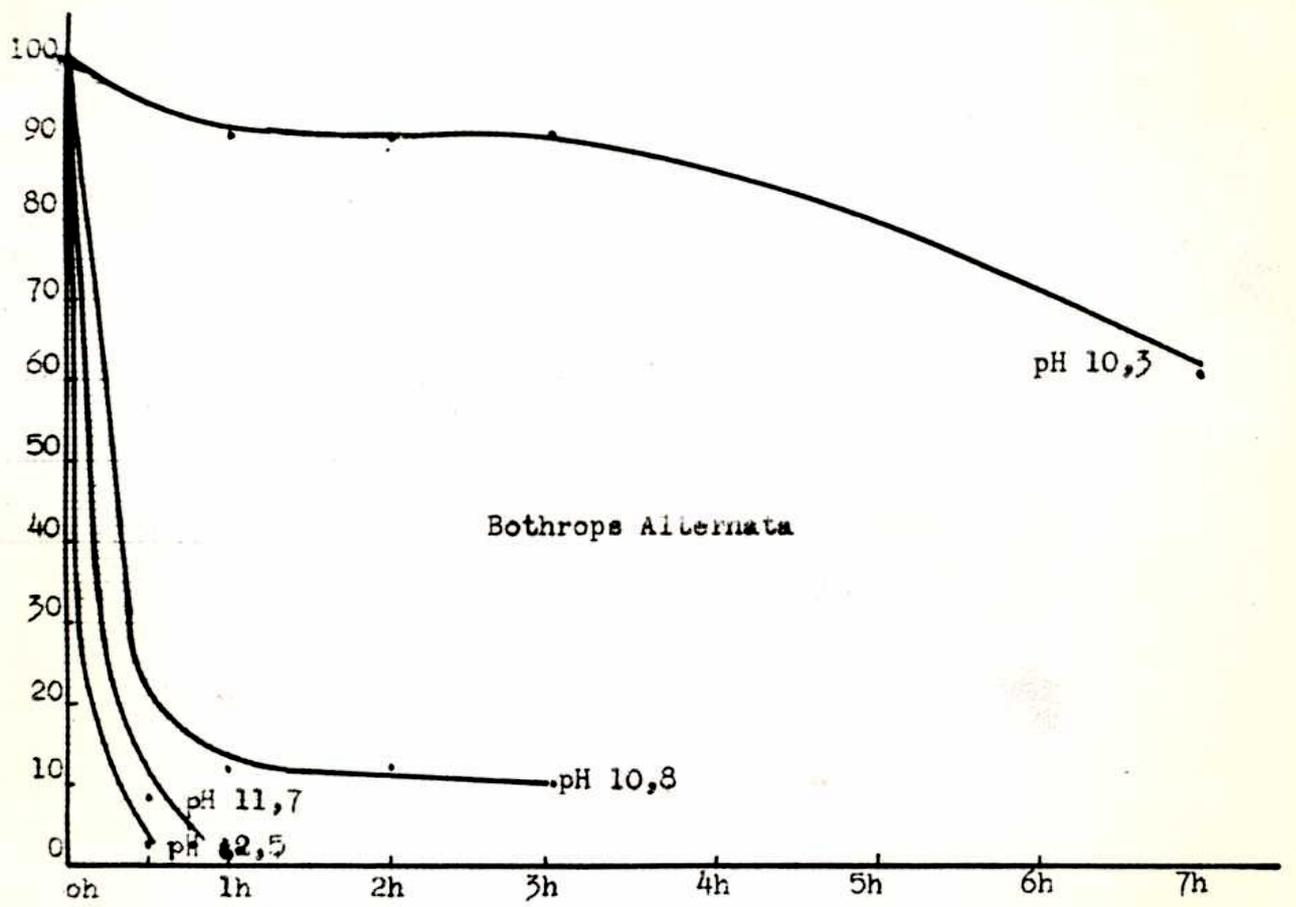
B. Neuwiedii

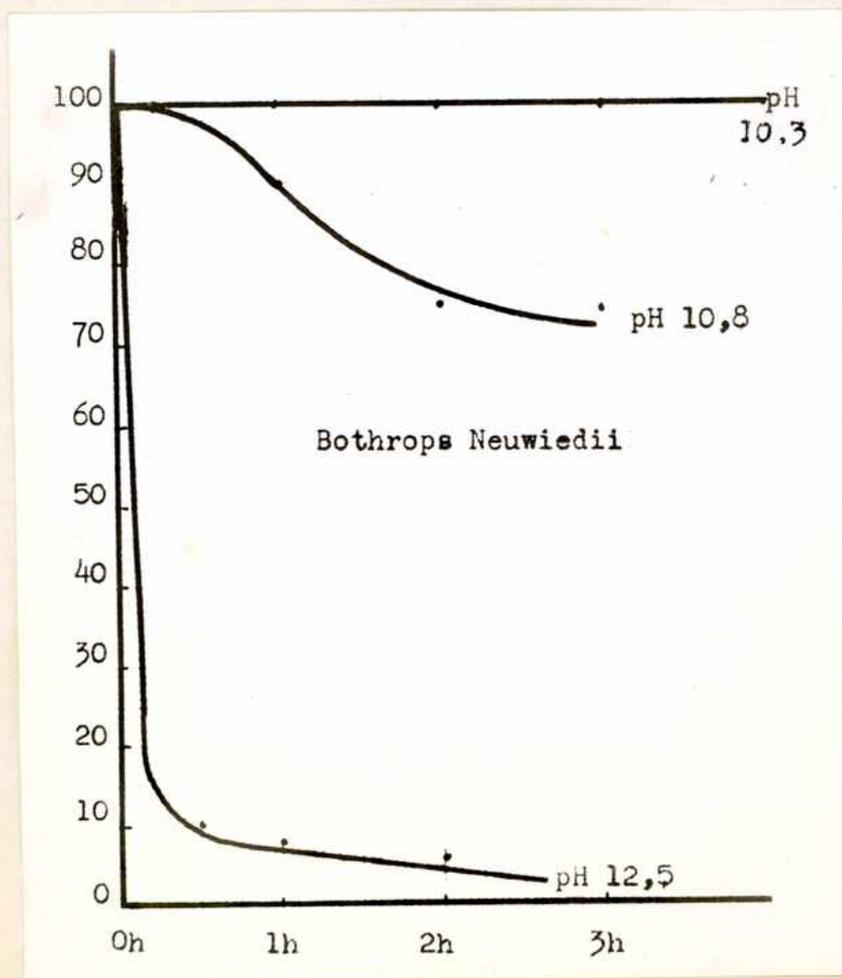
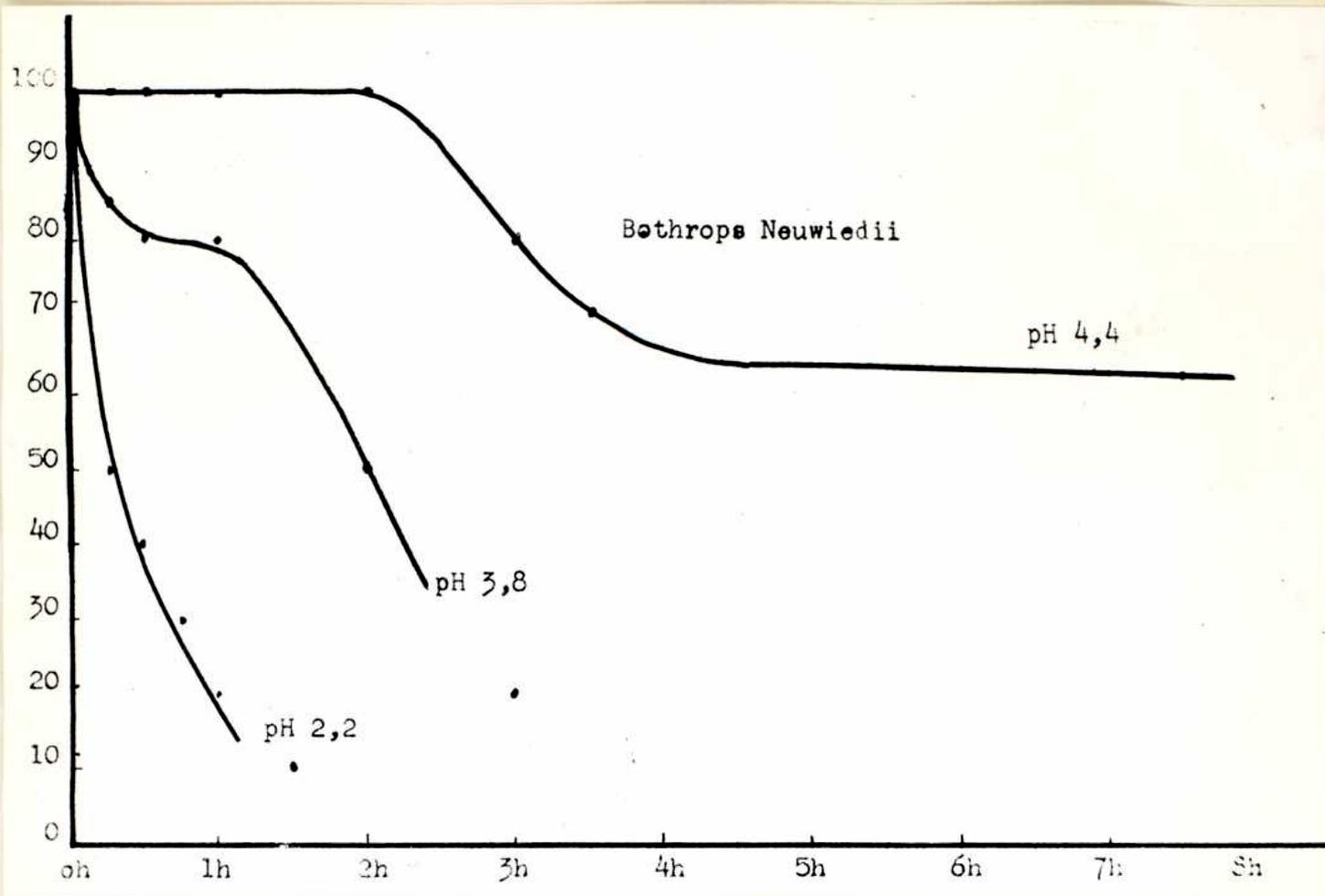
$\frac{1}{2}$ h	4 m	50	5	90
1 h	5 m	50	4	92
2 h	$6\frac{1}{2}$ m	50	3,5	94

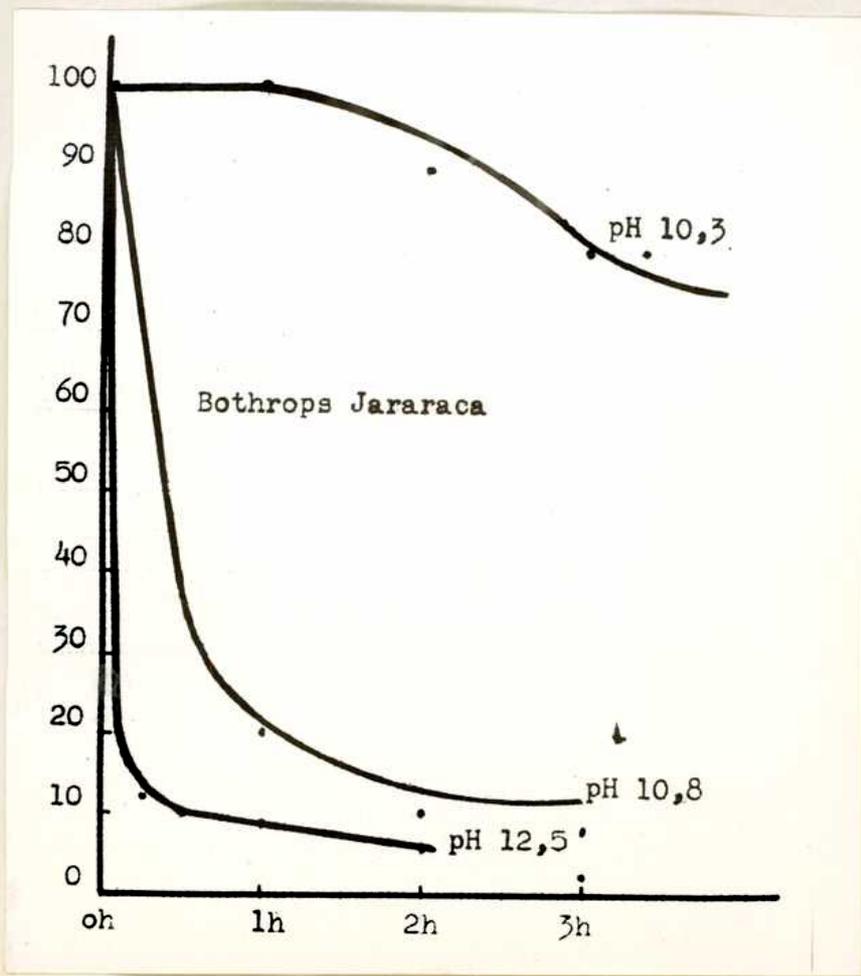
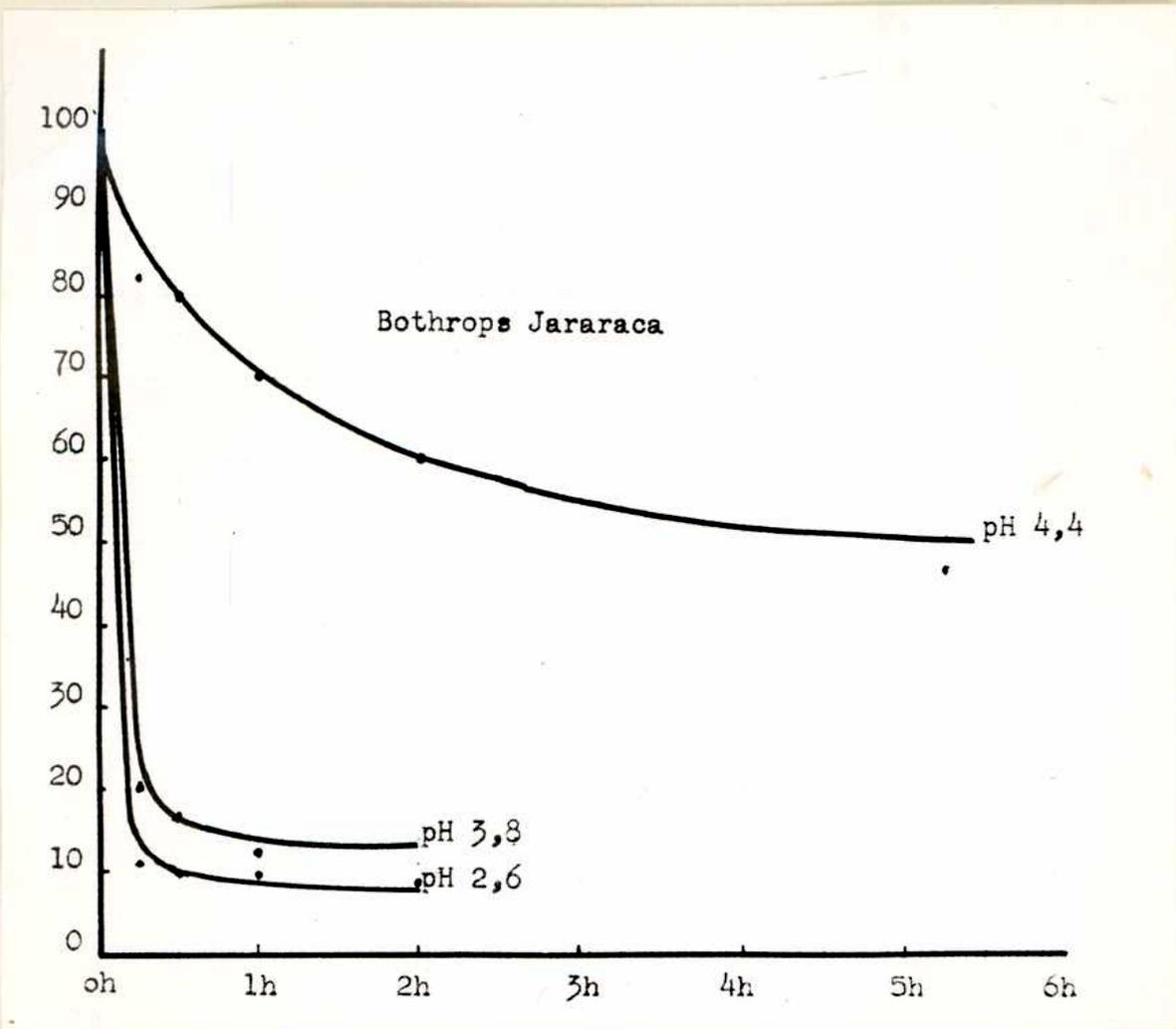


A continuación figuran los gráficos de cada uno de los venenos a diversos pH para mostrar la atenuación sufrida por cada uno de ellos.









El estudio de las atenuaciones para cada veneno particular, indica que, para cada uno de ellos, existe una zona de estabilidad bastante amplia, considerando como tal aquella en que las soluciones tienen una atenuación no mayor de 15% en veinticuatro horas y que permite, en un plazo de dos o tres horas trabajar con los venenos - sin peligro de atenuación. Fuera de esta zona de estabilidad las atenuaciones se presentan rápidamente. Basta observar el ejemplo del veneno de *B. Neuwidii* donde la atenuación en 8 horas a pH 10,3 es 0 % mientras que a pH 10,8 y a 2 horas de acción es de 25%; lo mismo ocurre en la región ácida, el veneno es estable a pH 5,3 y se atenúa ya 35 % a 4 $\frac{1}{2}$ horas a pH 4,4 y a pH 3,8 a las 2 horas la atenuación es de 50 %.-

Un aspecto particular presentan las curvas de atenuación de algunos venenos a pH's cercanos a la región de estabilidad (véase *Neuwidii* 3,2 - 3,8 - 4,4 y 10,8, *Jararaca* 10,3 y *Alternata* 10,3). Para la atenuación a pH 5 del principio coagulante del veneno de *Crotalus Terrificus*, Slotta y otros (1937) han encontrado una curva parecida aunque para tiempo mucho mayor y que se aparta de las obtenidas a pH 1 y a pH 8,7.-

Esto parecería indicar que a esos pH existiría una reacción de atenuación más compleja que en los otros casos. Al principio la atenuación es muy lenta y después de un tiempo se hace rápida.

De los venenos estudiados el de *Bothrops Neuwidii* se revela como el más estable, no sólo por su zona de estabilidad más amplia - sino también por presentar sus curvas menor atenuación que la de los otros dos venenos, en todos los pH: le sigue luego el *B. Jararaca*, y por último el más inestable es el veneno de *B. Alternata*.

Esto se puede observar en los gráficos individuales que figuran en cada pH particular y que indican claramente la diferencia de atenuación.

TENTATIVAS DE PURIFICACION DEL VENENO DE BOTHROPS

ALTERNATA POR ADSORCION.

El éxito que ha tenido la purificación de diversas sustancias de gran actividad biológica por adsorción y elución sucesiva en distintos soportes coloidales nos indujo a ensayar el método con el veneno de Bothrops Alternata.

Ya desde los comienzos del estudio de los venenos de serpientes la adsorción del principio, o principios activos del veneno (en el supuesto que las distintas acciones obedezcan a principios diferentes) fué tratada por diversos autores:

Houssay, Sordelli y Negrette (1918) encuentran que el veneno de B. Alternata pierde su acción coagulante al ser agitado con carbón animal, o al filtrar por bujía Berkefeld, es de notar que el poder coagulante a que aquí se hace referencia es con respecto a la leche y no al plasma.

En trabajo algo posterior los mismos autores encuentran adsorción por el carbón, del principio coagulante, para el plasma de caballo, de los venenos de B. Alternata, B. Neuwiedii, B. Jararacussu y Crota^{lus} T.T.

M.A. Catán de Houssay (1921) encuentra que el veneno de Cobra - ^{con} (Neuwiedii también) ^{sucede lo mismo} no sigue exactamente la ley de Freundlich, no pareciendo por tanto ser fenómeno de adsorción pura, sólo hace excepción la temperatura de 45 ° C., el fenómeno en cuestión parece tratarse de una repartición del veneno entre el carbón y el solvente.

Más adelante Braier (1935) encuentra que la adsorción del principio coagulante del veneno de *B. Alternata* con hidróxido de aluminio, caolín y carbón animal es muy grande recuperándose muy poco por elución.

En nuestro trabajo hemos estudiado la adsorción por medio del hidróxido de aluminio preparado según Willstätter (orto hidróxido γ), encontrando que el veneno se adsorbía cuando se empleaban soluciones del mismo en agua destilada, dependiendo esta adsorción de la cantidad de hidróxido de aluminio presente, no estando influenciada por la agitación del adsorbente con el veneno y notándose la conveniencia del empleo de hidróxido de Aluminio de preparación reciente.

Un ensayo cuantitativo de la adsorción del veneno, por hidróxido de aluminio coloidal, demostró ser, en las condiciones de la experiencia, muy grande (mayor de 99%).-

El tiempo de coagulación a que nos hacemos referencia en todos los ensayos, es el tiempo que tardan en coagular 0,5 centímetros cúbicos del sobrenadante, que resulta después de centrifugar la mezcla de veneno y adsorbente, y 2,5 centímetros cúbicos de plasma, a 37° C.

DEMOSTRACION DEL PODER ADSORBENTE DEL HIDROXIDO DE ALUMINIO

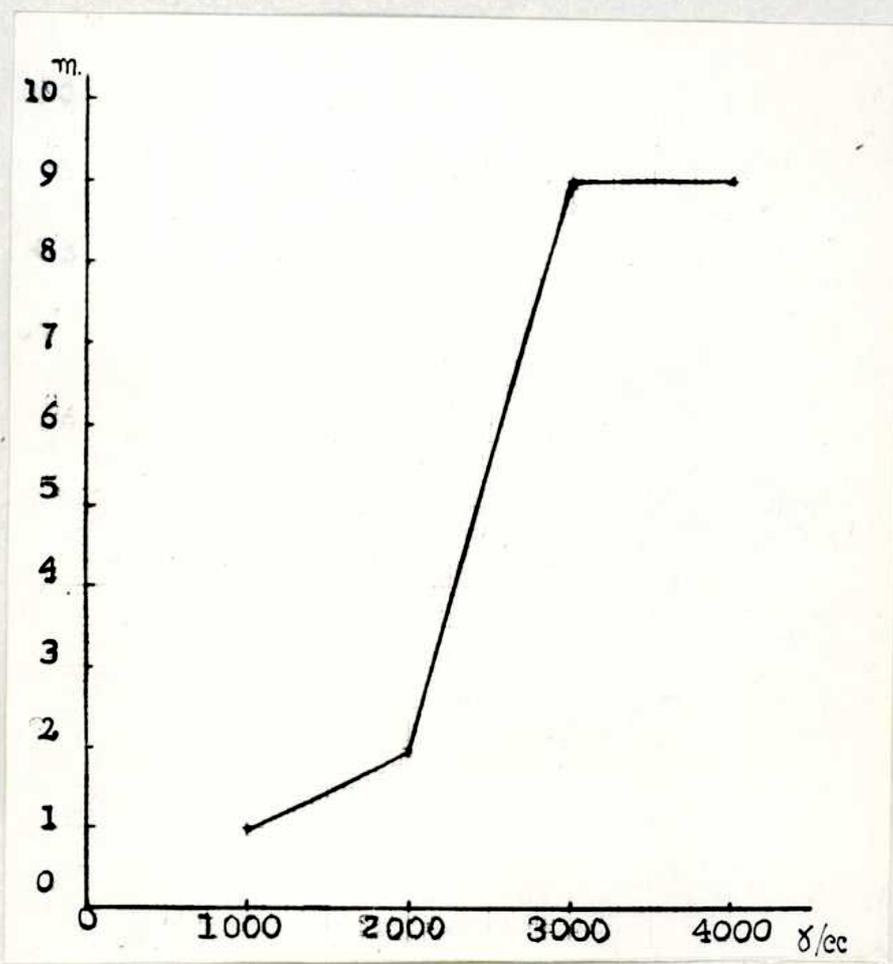
PARA EL VENENO DE BOTHROPS ALTERNATA.

Se emplea solución de veneno al dos por mil (2000 γ /cc) e hidróxido de aluminio en agua, de 10 mg por centímetro cúbico (10000 γ /cc).

Al(OH)	Veneno	Volumen total	Tiemp.de coagulac.
0 γ /cc.	200 γ /cc.	0,5 cc	instantáneo
4000 γ /cc.	200 γ /cc.	0,5 cc	9m

VARIACION DE LA ADSORCION CON EL AUMENTO DEL HIDROXIDO DE ALUMINIO

Al(OH) ₃	Veneno	Volumen total	Tiempo de coagulación lm
1000 γ/cc.	200 γ/cc.	0,5 cc.	1m
2000 γ/cc.	200 γ/cc.	0,5 cc.	2 m
3000 γ/cc.	200 γ/cc.	0,5 cc.	9 m
4000 γ/cc.	200 γ/cc.	0,5 cc.	9 m



INFLUENCIA DEL GRADO DE ENVEJECIMIENTO

Al(OH) ₃	Veneno	Vol. total	Condición del Al(OH) ₃	Tiempo de coagulación
5000 γ/cc.	200 γ/cc.	1,5 cc.	viejo 3	7 m
10.000 γ/cc.	200 γ/cc.	1,5 cc.	viejo	10 m
5.000 γ/cc.	200 γ/cc.	1,5 cc.	reciente	18 m
10.000 γ/cc.	200 γ/cc.	1,5 cc.	reciente	18 m

Como se vé, el sobrenadante tarda más en coagular para el hidróxido de aluminio de preparación reciente, es decir éste es el de mayor poder adsorbente.

INFLUENCIA DE LA AGITACION EN EL PODER ADSORBENTE

El veneno se emplea en solución al dos por mil y el hidróxido de aluminio en una concentración de 10 mg por centímetro cúbico.

Al(OH) ₃ (mg) ³	Veneno (γ/cc.)	Vol. total (cc.)	Tiempo de agi- tación (min.)	Tiempo de coag.(min.)
5	200	1,5	15	3
5	200	1,5	30	3
5	200	1,5	60	3
10	200	1,5	15	5
10	200	1,5	30	5
10	200	1,5	60	5

Como se puede ver en el cuadro anterior, a igualdad de otras condiciones la agitación no tiene influencia.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Varios ejemplos nos han confirmado que la adsorción es tanto mayor cuanto menor es la temperatura. Por otra parte Freundlich (1926) admite que en la fórmula: $a = \alpha c^{1/n}$ donde a es la cantidad de sustancia adsorbida por un gramo de adsorbente sólido y c la concentración del veneno que quedó en solución cuando se alcanzó el equilibrio, que $1/n$ aumenta con la temperatura y a altas temperaturas es igual a 1, siendo pequeño sin embargo el factor temperatura.

Ensayos de temperatura

Cuatro centímetros cúbicos de solución al diez por mil se mezclan con treinta y seis centímetros cúbicos de hidróxido de aluminio, se agitan, se toma una parte y se deja a temperatura ambiente durante

veinticuatro horas y la porción restante se deja durante el mismo tiempo en cámara frigorífica (0°C.) se centrifuga luego y se encuentran los siguientes resultados:

Solución mantenida en cámara: no coagula en dos horas.

Solución mantenida a temperatura ambiente: coagula en siete minutos.

Entre la solución de veneno y el veneno adsorbido existe un equilibrio cuya constante varía con la temperatura como lo demuestra el siguiente ejemplo:

Se toman diez centímetros cúbicos de solución de veneno al diez por mil y noventa centímetros cúbicos de hidróxido de aluminio, se agitan y se separan dos porciones (A y B).

A se mantiene veinticuatro horas en la cámara frigorífica; después de centrifugar la mitad de esta porción se toma 0,5 centímetro cúbico más 2,5 centímetros cúbicos de plasma y se tiene un tiempo de coagulación de 60 minutos. La parte no centrifugada constituye la porción C

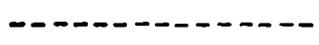
B se mantiene a temperatura ambiente por veinticuatro horas (8°C.) De esta porción se toma la mitad, se centrifuga y 0,5 centímetros cúbicos dan un tiempo de coagulación de 40 m. La parte no centrifugada constituye D.

C se mantiene veinticuatro horas a temperatura ambiente (12°C.). Tiempo de coagulación veinte minutos.

D se mantiene veinticuatro horas en la cámara frigorífica (0°C.). Tiempo de coagulación sesenta minutos.

En resumen la solución A sacada recién de la cámara tarda en coagular sesenta minutos y después de veinticuatro horas de temperatura am-

biente' (12 ° C) veinte minutos. La solución B tarda después de veinticuatro horas (8 ° C.) cuarenta minutos y luego de veinticuatro horas de cámara su tiempo de coagulación es sesenta minutos.



Se hizo un ensayo para saber si el principio tóxico para lauchas (en el supuesto que sea distinto del principio coagulante) era adsorbido por el hidróxido de aluminio encontrándose se adsorbe con facilidad.

Solución de veneno al diez por mil, se deja veinticuatro horas en la cámara frigorífica, 0,1cc de veneno más 0,9cc de hidróxido de aluminio, el sobrenadante no da coagulación en dos horas.-

ENSAYO EN LAUCHAS.

Solución testigo de veneno inyectada en lauchas de veinte gramos.

Solución sobrenadante del adsorbido inyectada en lauchas de veinte gramos.

- 1/4 D.M.M. -
- 1/2 D.M.M. -
- 1 D.M.M. +
- 2 D.M.M. +

- 8 D.M.M. -
- 20 D.M.M. -
- 40 D.M.M. -

REFERENCIAS: D.M.M. - Dosis mortal mínima.
 - no muere.
 + muere.

ADSORCION CON BUFFER DE FOSFATOS.

Al hacer ensayos de adsorción de veneno a distintos pH empleando buffer de fosfatos se encontró que las sales inhiben parcialmente la adsorción como se puede ver en el cuadro siguiente:

Al (OH) ₃	Veneno	Volumen total	Completado con	Tiempo de coagulación.
5 mg	200 γ	1 cc	agua	40 m
5 mg	200 γ	1 cc	buffer pH 6,2	40 m

Se hicieron luego ensayos de adsorción ^{con} buffer de fosfatos a distintos pH (en los pH estudiados la atenuación debida al buffer no existe o es despreciable comparada con la debida a la adsorción del veneno). En el siguiente ejemplo el veneno fué disuelto en cada uno de los buffer.

Al (OH) ₃	Veneno	pH	Tiempo de coagulación (24 h.de estacionamiento)
9 mg	1 mg	8	2 m
9 mg	1 mg	7	3 m
9 mg	1 mg	6	10 m
9 mg	1 mg	5	23 m



E L U C I O N E S.

La menor adsorción en buffer pH 6,2 (en el cual el veneno no es atenuado) nos indujo a estudiar la elución con fosfatos de lo adsorbido por el hidróxido de aluminio en medio acuoso.

Para proceder a la elución se decanta el sobrenadante de lo adsor

bido en las condiciones habituales y se reemplaza por 0,9 centímetros cúbicos de la mezcla salina conteniendo fosfatos y a pH 6,2: se agita diez minutos, se centrifuga, se decanta el sobrenadante, repitiéndose la operación tres veces. La elución con buffer pH 6,2 dió en la primera elución tres minutos; en la segunda cinco minutos y medio y diez minutos en la tercera, lo que indica que hay pasaje del veneno adsorbido a la solución:

EJEMPLO DE UN ENSAYO REALIZADO.

Adsorción con hidróxido de aluminio, en solución acuosa y elución con buffer de fosfatos de pH 6,2.

	Al(OH) ₃	Veneno	Vol. total	Tiempo de coagulación
TUBO 1	5 mg	200 γ /cc	1 cc	28m
TUBO 2	5 mg	200 γ /cc	1 cc	1h 15m

E L U C I O N E S.

	Núm. de elución	Vol. de fosfato agregado.	Tiempo de coagulación
TUBO 1	1a.	0,9 cc	3 m
	2a.	0,9 cc	5½ m
	3a.	0,9 cc	10 m
TUBO 2	1a.	0,9 cc	4 m
	2a.	0,9 cc	7 m
	3a.	0,9 cc	12 m

En realidad la elución del veneno se puede realizar también con agua destilada, pero la cantidad eluída nunca es tan grande como en el caso de los fosfatos, según lo indica el hecho de obtener en ese caso - tiempos de coagulación mayores.

Como estos ensayos de elución indican la imposibilidad de recuperar una porción importante del veneno adsorbido no se continuó con ellos.

ADSORCION CON CAOLIN.

El caolín utilizado contenía 100 miligramos por centímetro cúbico y fué preparado por el método siguiente: tratamiento con ácido clorhídrico veinticuatro horas a 60°C. luego veinticuatro horas a ebullición y lavado hasta reacción negativa de ión cloro y molienda en molino de bolas.

Se estudió la adsorción en agua destilada encontrándose ser muy grande, tanto como en el caso de hidróxido de aluminio.

Veneno	Caolín	Vol. Total.	Tiempo de coagula.
200 γ /cc	0,1 cc	0,5 cc	1 m
200 "	0,3 cc	0,5 cc	18 m
200 "	0,4 cc	0,5 cc	35 m

El cuadro anterior muestra que la adsorción aumenta con la concentración del adsorbente.

En los pH habituales y con buffer de fosfatos disminuye la adsorción como lo demuestra el siguiente ejemplo:

Veneno	Caolín	Completado a lcc. con:	Tiempo de coagulac.
200 γ /cc	0,5 cc	H ₂ O destilada	50 m
200 "	0,5 cc	buffer 6,2	16 m

Las eluciones mostraron que la recuperación es aún menor que en el caso del hidróxido de aluminio, razón por la cual no se continuó.

-----OO-----

TENTATIVAS DE PURIFICACION DEL VENENO DE BOTHROPS ALTERNATA

SEGUN EL METODO DE D.von KLOBUSITZKY.

La publicación del trabajo de D.von Klobusitzky (1935) sobre la acción coagulante y la purificación del veneno secretado por la glándula del Bothrops Jararaca, donde el autor describe los métodos para purificarlo, nos indujo a repetirlo con el veneno Bothrops Alternata. Esta tentativa era tanto más interesante cuanto que según Klobusitzky la sustancia por él obtenida, que denomina Bothropotoxina, estaría formada tan sólo por carbono, hidrógeno, oxígeno y carecería totalmente de nitrógeno.

Hemos ensayado los dos métodos propuestos por el autor y con ninguno hemos tenido éxito. Pensamos que este fracaso pueda deberse a las condiciones físicas y químicas a que hay que someter el veneno durante el proceso de purificación. En su primer método el autor calienta el veneno a 70°C. durante unos diez minutos, condición que de por sí parece suficiente para inactivarlo en alta proporción como se puede ver en las experiencias que estudian la acción de la temperatura sobre el principio coagulante. Aunque el veneno de Bothrops Jararaca que emplea Klobusitzky es algo más estable a la temperatura, que el de Bothrops Alternata empleado por nosotros llama la atención los resultados que describe.

Una explicación del fracaso del segundo método la tuvimos -

más adelante al estudiar la estabilidad de ese principio ~~frente~~ frente a distintos pH. Vimos que era sumamente inestable en medio fuertemente alcalino y precisamente en el método de Klobusitzky se añade a la solución otra de fosfato trisódico al 9% que da un pH mayor de 12. Indudablemente el agregado de esa solución inactiva el veneno total o parcialmente según el tiempo de contacto.

PARTE EXPERIMENTAL.

M E T O D O 1º

Se disolvió un gramo de veneno seco en 40 centímetros cúbicos de cloruro de sodio al 6%. El pH de esta solución es 6, de manera que para facilitar la coagulación se llevó a pH 5 por agregado de ácido clorhídrico al 5%. Luego la solución se calentó en bañomaria a 70°C., agitando siempre durante diez minutos. Después de esta operación se ensayó el poder coagulante que resultó nulo, por lo cual decidimos no seguir adelante en esa experiencia. En otra tentativa continuamos ese calentamiento llevando a pH 6 con hidróxido de sodio y terminando la precipitación de proteínas con solución de hidróxido de hierro coloidal al 10% después de lo cual volvimos a ensayar el poder coagulante con resultado nulo, por lo que suspendimos la operación y decidimos estudiar el segundo método.

M E T O D O 2º

Se preparó una solución de veneno al 10% agitada vigorosa-

mente con un aparato eléctrico durante el agregado de PO_4Na_3 , $12\text{H}_2\text{O}$ al 9 % (6 cc.) y 3cc.de Cl_2Ca al 15% hasta obtener un líquido lechoso que centrifugado, diera un sobrenadante, que diluido uno en veinticinco y operando con un centímetro cúbico de esa solución por cinco centímetros cúbicos de sangre oxalata no la coagulara en 15 minutos. Generalmente no se obtenía este tiempo sino después del agregado de los reactivos durante un número de veces que variaba de diez a quince. Es de notar aquí, que en este trabajo, no se neutralizaba previamente a la coagulación, ni se tenía en cuenta para nada la dilución sufrida por el agregado de reactivos que algunas veces era considerable.- Cuando el tiempo de la coagulación del sobrenadante era el indicado por el autor, se centrifugaba y el precipitado de fosfato cálcico se disolvía en ácido acético al 10 %, luego se sometía a una diálisis en la cámara frigorífica durante ocho días, hasta que el líquido interior no diera reacción de ión calcio; en este punto se tomó el tiempo de coagulación y dió siempre pérdida total del poder coagulante, es decir: el principio activo que se deseaba purificar se había destruído totalmente.

Otros autores que han intentado la confirmación de los trabajos de V.Klobusitzky tampoco han tenido éxito.

Braier (1935) trató de aislar la Bothropotoxina del veneno de *Bothrops Alternata*. Siguió los dos métodos indicados por el

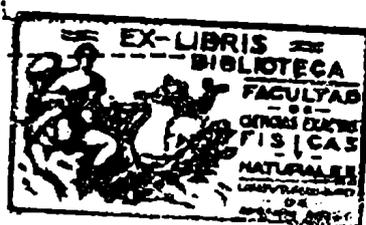
mencionado autor con resultado negativo; el fracaso del primero lo atribuyó, como nosotros al calentamiento y también a la acción de los ácidos; pero, en nuestra opinión, el pH al que está sometido el veneno en este método (pH 5) no es tan bajo como para inactivarlo; en el caso del segundo método Braier atribuye el fracaso al poco poder adsorbente del fosfato tricálcico y a la prolongada diálisis.

Micheel en su trabajo con Jung (1936) menciona que, a su pedido, F. Bö["]sser realizó experiencias para aplicar el método de V. Klobus["]tzky al veneno de B. Alternata, pero sin llegar a obtener una Bothropotoxina libre de nitrógeno.

- - - - -

CONCLUSIONES

- 1º- Se estableció un método de medida del poder coagulante de los venenos, cuya exactitud permitió aplicarlo satisfactoriamente en el curso del trabajo.
- 2º- Examinando las curvas de atenuación de los venenos por la temperatura se ve que el principio coagulante puede considerarse estable en solución, a 37°C. durante una hora; a 56°C. durante el mismo intervalo de tiempo su atenuación es considerable (menor en el caso del veneno de B. Jararaca) y a 100°C. se puede considerar total.
- 3º- El estudio de la acción de la concentración del ión hidrógeno sobre el principio coagulante muestra que los tres venenos tienen una zona de estabilidad amplia entre pH 5,3 y 10,3 fuera de la cual la atenuación es rápida. De los tres venenos ensayados es más estable, tanto en la zona ácida como en la alcalina, el proveniente del B. Neuwiedii.
- 4º- Se estudió la adsorción del principio coagulante por hidróxido de aluminio coloidal y por caolín. Por elución es pequeña la recuperación, lo que no permite utilizar este método como medio de purificación del citado principio.
- 5º- No hemos logrado preparar la Bothropotoxina de Klobusitzky -según sus indicaciones- confirmando lo hallado por otros autores.



Man. J. Weber de S. Weber

B I B L I O G R A F I A

- Braier.- 1935 - Investigaciones sobre el poder coagulante del veneno Bothrops Alternata.
- Clark.- 1923 - The determination of hydrogen ions.
- Eagle.- 1937 - J. Exper. Med. 65 - 613.
- Freundlich.- 1926 - Colloid Chemistry (Alexander).
- Houssay, Sordelli y Negrette.- 1918 - Rev. Inst. Bact. 1 - 586
- Houssay, Sordelli y Negrette.- 1918 - Rev. Inst. Bact. 1 - 197
- Klobusitzky.- 1935 - Mem. Inst. Butantan. 9 - 259.
- Micheel y Jung.- 1936- Z. Physiol. Chem. 239 - 217.
- Slotta, Szyszka y Fraenkel-Conrat.- 1937 - Mem. Inst. Butantan 11 - 133.
