

## DOSAGEM BIOLÓGICA DO ANTIVENENO BOTRÓPICO

Sérgio Luiz DALMORA\*  
Silvana F. VACCARI\*\*  
Alexandre M. SAMPEDRO\*\*\*  
João Eduardo da S. PEREIRA\*\*\*\*

**ABSTRACT:** The determination of the LD50 of bothropic reference venom and the evaluation of the respective antivenin potency were standardized by intraperitoneal inoculation in mice. The computer program was developed for the calculations of the LD50 and the potency (ED50) by probit analysis. The final results were consistent and reproducibles. The weight obtained in independent assays was between 374 and 1762. The precision index was  $\lambda < 0,10$ .

**KEYWORDS:** Bothropic antivenins and venom, evaluation of bothropic antivenin potency, LD50 of bothropic venom.

### INTRODUÇÃO

O método de Vital Brazil<sup>2</sup> foi empregado durante muitos anos para a titulação da atividade tóxica de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, e para a determinação da potência dos antivenenos botrópicos. Para a avaliação da potência o procedimento fundamenta-se na incubação da mistura veneno-antiveneno a 37°C, durante 30 minutos e inoculação por via endovenosa em pombos. O período de observação, de 20 a 30 minutos, não possibilita quantificar os anticorpos antitóxicos, mas aqueles específicos à atividade coagulante.<sup>14,16</sup>. O número

\* Financiado pela SCT/MS.

• Prof. Tit. Deptº de Farmácia Industrial — CCS — UFSM

•• Méd. Vet. do Deptº de Farmácia Industrial — CCS — UFSM

••• Engº do Núcleo de Processamento de Dados — UFSM

•••• Auxiliar-de-Ensino do Deptº de Estatística — CCNE — UFSM

• Departamento de Farmácia Industrial

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Santa Maria

Campus Universitário — 97119 — Santa Maria — RS

Recebido para publicação em 30.07.1991 e aceito em 29.10.91.

de respostas para cada nível de diluição é pequeno e a análise estatística dos dados é restrita, influenciando assim a precisão das estimativas de potência. A Farmacopéia Brasileira<sup>7</sup> preconiza esta metodologia.

Em 1937, Slotta e Syszka<sup>18</sup> realizaram ensaios com a finalidade de padronizar a utilização de camundongos para o estudo da atividade tóxica de venenos ofídios. Kocholaty e cols.<sup>13</sup> testaram diferentes vias de administração demonstrando que as vias intravenosa e intraperitoneal propiciavam procedimentos adequados e reproduutíveis para o doseamento de antivenenos. Observaram, inclusive, que a via de inoculação teria importância decisiva na demonstração do efeito protetor na interação veneno-antiveneno, que por sua vez variaria de acordo com o tipo de veneno. Furlaneto e cols.<sup>10, 11</sup> destacaram as vantagens deste animal e realizaram experimentos empregando a via endovenosa e doses preparatórias de veneno para a determinação da DL50 de venenos botrópicos. Siles Vilarroel e cols.<sup>16</sup> obtiveram bons resultados efetuando a titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos pela via intraperitoneal em camundongos. Concluíram também que o método preenchia os requisitos necessários à quantificação, em termos de DL50, dos fatores responsáveis pela toxicidade com alto grau de sensibilidade e de reprodutividade, isento dos inconvenientes devidos ao fator coagulante. Os mesmos autores<sup>14,15</sup> numa etapa seguinte, padronizaram a metodologia para a avaliação da potência de antivenenos botrópicos, comprovando a eficiência do modelo experimental e demonstrando que a inoculação intraperitoneal era um processo plenamente satisfatório, e perfeitamente reproduzível.

Ao verificar as metodologias preconizadas pelos autores<sup>12, 17, 19, 20</sup> para a determinação da capacidade neutralizante dos soros anti-ofídicos, encontra-se ensaios biológicos fundamentados nas atividades: letal, hemorrágica, edemaciante, coagulante, miótica, necrosante, desfibrinante e enzimáticas. Por sua vez, as Farmacopéias Européia<sup>6</sup> e Britânica<sup>3</sup> recomendam a utilização do camundongo como animal de prova para a determinação da Dose Letal 50 do veneno e, a seguir, a avaliação da potência do antiveneno respectivo em relação à toxicidade encontrada.

Para o ensaio biológico que se fundamenta na determinação da atividade letal há dois procedimentos: 1º) mistura de quantidades fixas de veneno com diluições variáveis do antiveneno<sup>3, 4, 6</sup> e 2º) mistura de doses diferentes de veneno e quantidades constantes de soro<sup>4, 13, 14</sup>. Em ambos os casos realiza-se incubação prévia a 37°C durante 30 minutos, antes da inoculação.

Este trabalho tem por finalidade padronizar a metodologia para a avaliação da potência do antiveneno botrópico pela via intraperitoneal em camundongos. Efectuar a análise estatística dos dados pelos métodos de probitos demonstrando a validade, a exatidão e a reproduzibilidade dos ensaios.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Veneno de Referência

Foi utilizado o veneno de *Bothrops jararaca* como veneno de referência, lote BRA/Bot/001., cedido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde — INCQS. Cada frasco contém 30mg de veneno — 900 DL50 — e foi conservado a -20°C. Foram preparadas soluções de veneno na concentração de 10mg/ml em solução fisiológica estéril.

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

## 2. Antivenenos Botrópicos

Foram utilizados três lotes de antivenenos botrópicos fornecidos pelo Instituto Butantan de São Paulo e Instituto Vital Brazil do Rio de Janeiro e identificados como antiveneno A,B,C.

## 3. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, de ambos os sexos, com peso entre 18 e 20g. Os animais foram mantidos em jejum de 10 a 15 horas com acesso à glicose a 10%. Para o ensaio, foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 6 a 10 animais cada um, e identificados segundo a dose a ser injetada.

## 4. Determinação da Dose Letal 50 (DL50)

Foram preparadas 4 doses de veneno de *B. jararaca* diluído em solução fisiológica estéril segundo uma progressão geométrica com espaçamento logarítmico constante igual a 0,1.

Injetou-se 0,5ml por camundongo pela via intraperitoneal. Os animais foram observados durante 48 horas, registrando-se número de mortes para cada dose.

## 5. Avaliação da potência do antiveneno botrópico.

Preparou-se a solução do veneno de referência de *B. jararaca* em solução fisiológica estéril, de modo a conter 20 DL50 de veneno por ml.

Segundo a potência suposta de cada soro antibotrópico foram preparadas quatro diluições em solução fisiológica estéril formando uma progressão geométrica com espaçamento logarítmico igual a 0,097.

Transferiu-se 3ml de cada uma das diluições do antiveneno para tubos de ensaio com tampa, aos iguais adicionou-se 3ml da solução do veneno. Homogeneizou-se. Os tubos foram incubados a 37°C, em banho-maria, durante 30 minutos.

Administrou-se 0,5ml da respectiva dose, pela via intraperitoneal, em camundongos. Os animais foram observados durante 48 horas, registrando-se o número de mortes para cada dose.

## 6. Análise estatística

Os resultados experimentais foram submetidos à análise estatística por probitos segundo Finney<sup>9</sup>. A combinação de estimativas de potência, a ponderação para cada ensaio e o índice de precisão foram calculados conforme a literatura<sup>3, 8, 9</sup>.

## RESULTADOS

Para cada ensaio foi registrado o número de animais mortos para a respectiva dose. Estes dados submetidos à análise estatística forneceram os valores de DL50 apresentados nas tabelas 1 e 5 e de potência nas tabelas 2 a 4 e 6 a 8, incluindo as combinações de estimativas dos ensaios independentes.

O primeiro grupo de resultados corresponde às tabelas 1 a 4, onde os valores experimentais de DL50 serviram de base para o planejamento dos ensaios de potência.

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. Mem. Inst. Butantan, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

TABELA 1

Estimativas de DL50 e limites de confiança ( $P=0,95$ ) em microgramas de veneno de *Bothrops jararaca* por camundongo. Ponderação de cada ensaio independente. Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão ( $\lambda$ ).

Ensaio nº	DL50	Limites de confiança ( $P=0,95$ )	Ponderação
01	34,72	30,71 — 39,37	1317
02	35,77	31,31 — 41,41	1039
03	33,95	29,32 — 39,95	851
Potência média	34,84	31,18 — 37,74	
$\lambda = 0,07$		Homogeneidade $\chi^2 = 0,23$ $p > 0,05$	

TABELA 2

ANTIVENENO A. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança ( $P=0,95$ ), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno. Ponderação de cada ensaio independente. Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão ( $\lambda$ ).

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança ( $P=0,95$ )		Ponderação
		(mg/ml)	% da potência	
04	7,42	6,54 — 8,38	88,14 — 112,94	1320
05	7,32	5,61 — 8,95	76,64 — 122,27	374
06	7,20	6,31 — 8,25	87,64 — 114,58	1136
Potência Média	7,32	6,72 — 7,97	91,80 — 108,88	

$\lambda = 0,07$  Homogeneidade  $\chi^2 = 0,10$   $p > 0,05$

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. Mem. Inst. Butantan, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

TABELA 3

ANTIVENENO B. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança ( $P=0,95$ ), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno. Ponderação de cada ensaio independente. Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão ( $\lambda$ ).

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança ( $P=0,95$ )		Ponderação
		(mg/ml)	% da potência	
07	5,88	5,25 – 6,65	89,28 – 113,09	1443
08	6,08	5,31 – 6,97	87,33 – 114,64	1101
09	5,55	4,88 – 6,33	87,93 – 114,05	1201
Potência Média	5,83	5,41 – 6,27	92,79 – 107,55	

$\lambda = 0,06$

Homogeneidade  $X^2 = 0,91$   $p > 0,05$

TABELA 4

ANTIVENENO C. Estimativa de potência (DE50) e limites de confiança ( $P=0,95$ ), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno. Ponderação do ensaio.

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança ( $P=0,95$ )		Ponderação
		(mg/ml)	% da potência	
10	5,89	5,21 – 6,69	88,45 – 113,58	1299

Para as avaliações de potência dos antivenenos botrópicos apresentadas nas tabelas 6, 7 e 8, foram empregados os valores de DL50 determinados experimentalmente conforme a Tabela 5.

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

TABELA 5

Estimativas de DL50 e limites de confiança ( $P = 0,95$ ) em microgramas de veneno de *Bothrops jararaca* por camundongo.

Ponderação de cada ensaio independente.

Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão ( $\lambda$ ).

Ensaio nº	DL50	Limites de confiança ( $P = 0,95$ )	Ponderação
11	44,51	35,63 – 55,04	431
12	43,30	37,55 – 50,01	993
Potência média	43,65	38,74 – 49,21	
$\lambda = 0,10$			Homogeneidade $X^2 = 0,04$ $p > 0,05$

TABELA 6

ANTIVENENO A. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança ( $P = 0,95$ ), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno.

Ponderação de cada ensaio independente.

Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão ( $\lambda$ ).

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança ( $P = 0,95$ )		Ponderação
		(mg/ml)	% da potência	
13	7,76	5,59 - 8,72	72,03 - 112,37	414
14	7,38	6,48 - 8,28	87,80 - 112,19	1367
15	6,73	5,38 - 7,71	79,94 - 114,56	633
Potência média	7,27	6,63 - 7,97	91,20 - 109,63	

$\lambda = 0,08$

Homogeneidade  $X^2 = 1,10$   $p > 0,05$

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. Mem. Inst. Butantan, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

TABELA 7

ANTIVENENO B. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança ( $P=0,95$ ), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno.

Ponderação de cada ensaio independente.

Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão ( $\lambda$ ).

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança (P=0,95)		Ponderação
		(mg/ml)	% da potência	
16	5,88	4,53 - 6,46	77,04 - 109,86	651
17	5,96	5,30 - 6,57	88,92 - 110,23	1762
Potência média	5,94	5,42 - 6,51	91,24 - 109,60	

TABLA 8

ANTIVENENO C. Estimativa de potência (DE50) e limites de confiança ( $P = 0,95$ ), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml do antiveneno.  
Ponderação do ensaio.

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança (P = 0,95)		Ponderação
		(mg/ml)	% da potência	
18	5,34	4,69 - 5,98	87,83 - 111,98	1386

DISCUSSÃO

Os resultados experimentais encontrados são classificados em dois grupos correspondentes às tabelas 1 a 4 e 5 a 8, respectivamente. Estes valores foram obtidos com intervalos de tempo, aproximado de 15 meses entre as análises.

Para o primeiro grupo de dados composto pelas tabelas 1 a 4, foi inicialmente determinada a Dose Letal 50 (DL50) do Veneno de Referência de *Bothrops jararaca* que, pela combinação de três ensaios independentes, forneceu um valor médio de 34,84 microgramas por camundongo, tabela 1 ( $\lambda = 0,07$ ). Este valor foi utilizado para o planejamento dos ensaios de avaliação de potência dos antivenenos.

Para a realização das análises cujos resultados se encontram nas tabelas 5 a 8 foi procedido de modo similar. O mesmo lote de veneno de referência apresentou uma DL50 igual a 43,65 microgramas por camundongo conforme a tabela 5 ( $\lambda = 0,10$ ). Este valor serviu de base para o planejamento das reavaliações de potência dos mesmos antivenenos.

Detectou-se uma variação na toxicidade do veneno de *B. jararaca* que poderia invalidar o ensaio biológico<sup>1, 20</sup>. Então, procedeu-se a repetição dos ensaios de DL50 a fim de utilizar sempre o verdadeiro valor de letalidade no planejamento dos experimentos e no cálculo da potência. Conforme se pode observar nas tabelas 2 a 4 e 6 a 8, a metodologia proporcionou avaliações de potência precisas com estreitos intervalos de confiança e uma variação de, no máximo, 8% em torno da média para um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . A reproduzibilidade e a confiabilidade podem ser notadas nos ensaios completamente independentes, mas principalmente na combinação destas estimativas. O índice de precisão foi calculado pelo lambda de Gaddum obtendo-se valores  $\lambda < 0,10$ . A ponderação calculada para cada ensaio como a recíproca da variância do log da potência<sup>8</sup> variou entre 374 e 1762. A homogeneidade das estimativas independentes de potência foi calculada pelo teste do  $\chi^2$ .

Optou-se pela padronização da presente metodologia de acordo com literatura<sup>3, 6, 12, 13, 20</sup>, determinando-se inicialmente a DL50 do veneno de *B. jararaca* e então, com base neste resultado, foi avaliada a potência do antiveneno. Adotou-se a mistura de quantidades fixas de veneno na proporção de 5 DL50 e diferentes diluições do antiveneno. De acordo com a curva dose-resposta foram selecionadas 4 a 5 doses em progressão geométrica de modo que um grupo propiciasse 10 — 20% de mortalidade, outro 80 — 90% e, pelo menos um outro, respostas intermediárias. O espaçamento logarítmico foi de 0,097. Embora a pré-incubação da mistura veneno-antiveneno não reproduza as características do envenenamento ofídico, este procedimento é adequado para estudar a presença e a potência de anticorpos neutralizantes nos antivenenos.

A utilização do camundongo como animal de prova em substituição ao pombo, possibilitou a realização de ensaios biológicos reproduzíveis, com maior número de respostas para cada nível de dosagem. Os animais foram deixados em jejum com acesso a glicose a 10% pelo período de 10 a 15 horas, encontrando-se assim maior exatidão nas respostas. Escolheu-se a via intraperitoneal pela sua conveniência e reproduzibilidade, mesmo contrastando com as vias intravenosas e intradérmica que mais de assemelhariam ao processo de acidente ofídico. Os animais foram observados durante 48 horas pois somente neste período os efeitos biológicos são integrais, concordando com as observações de outros autores<sup>6, 14</sup>.

Os resultados foram submetidos à análise estatística por probitos segundo Finney<sup>8, 9</sup>. Este procedimento possibilita uma análise mais completa, maiores informações a partir dos dados experimentais, apresentando assim vantagens sobre os métodos simplificados de Spearman-Kärber, Reed-Müench, médias móveis<sup>8, 20</sup> e outros. O desenvolvimento de programas de computação contribui para economia e simplicidade dos trabalhos.

A potência das amostras analisadas segundo esta metodologia é representada pela Dose Efetiva 50 (DE50) e foi expressa em miligramas de veneno neutralizados por mililitro de soro antibotrópico. Este também é o procedimento adotado pelos laboratórios produtores e preconizado pela literatura<sup>12, 14, 20</sup>.

Recentemente, o Programa Nacional de Ofidismo da Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, do Ministério da Saúde, contribuiu diretamente para aprimorar e aumentar a produção de soros antiofídicos no Brasil, bem como pa-

ra uma revisão dos bioensaios empregados para estimar sua potência, buscando adaptar esses métodos às recomendações da Organização Mundial da Saúde<sup>5</sup>.<sup>20</sup> Deste modo, foi estabelecido o Veneno de Referência empregado neste estudo, e os laboratórios produtores nacionais passaram a avaliar a potência dos soros antiofídicos em função de sua capacidade neutralizante em camundongos.

É importante que se continue a desenvolver procedimentos que contribuam para ampliar os conhecimentos dos fenômenos que caracterizam o complexo quadro fisiopatológico do envenenamento ofídico e, ao mesmo tempo acrescentem informações sobre a neutralização de outros efeitos farmacológicos, não só a letalidade. Neste sentido, seria recomendável o estabelecimento do antiveneno padrão e a padronização do ensaio de retas paralelas. Enquanto isto, metodologias como a presente, se destacam pela sua importância e validade na dosagem de potência dos antivenenos botrópicos.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Ciro C. de Resende, Coordenador do Programa Nacional de Ofidismo do Ministério da Saúde pelo apoio que viabilizou o presente trabalho. Aos Institutos Butantan, Vital Brazil e INCQS pela doação dos antivenenos e veneno de referência. Ao Téc. de Lab. João L. Rizzi pelo auxílio na parte experimental e à Dra. Yoko Murata pela revisão crítica.

**RESUMO:** As metodologias para a determinação da Dose Letal 50 (DL 50) do veneno de Referência de *Bothrops jararaca* e para a avaliação de potência do antiveneno botrópico, foram padronizados pela inoculação intraperitoneal em camundongos. Elaborou-se programa de computação que foi utilizado para a análise estatística dos dados pelo método de probitos, encontrando-se uma reproduzibilidade significativa para  $\alpha = 0,05$ . A ponderação calculada para cada ensaio variou entre 374 e 1762. O índice de precisão foi  $\lambda < 0,10$ .

**UNITERMOS:** Antiveneno botrópico, avaliação de potência de antiveneno botrópico, DL50 de veneno botrópico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANGHAM, D.R. Assays and standards. In: *Hormones and blood*. 3.ed. London: Academic Press, 1983. v. 5, p. 256-299.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo*, v. 10, p. 457-462, 1907.
3. BRITISH pharmacopoeia. London: Her majesty's Stationery Office, 1988, p. A 163.
4. CHRISTENSEN, P.A. Remarks on antivenin potency estimation. *Toxicon*, v. 5, p. 143-145, 1967.
5. DINIZ, C.F. Produção de soro antiofídico na Fundação Ezequiel Dias. *Ciênc. Hoje*, v. 9, n.52, p. 72-73, 1989.
6. EUROPEAN pharmacopoeia. 2.ed. Paris: Maisonneuve, 1987. p. 145.
7. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p. 1034.
8. FINNEY, D.J. *Statistical method in biological assay*. 3.ed. London: Charles Griffin, 1978. 508p.
9. FINNEY, D.J. *Probit analysis*. 3.ed. Cambridge: Cambridge University, 1971. 333p.
10. FURLANETTO, R.S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M., SIRACUSA, Y.Q. Contribuição ao estudo da determinação da DL 50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* — Linnaeus, 1758. I. Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL 50. *Mem. Inst. Butantan*, v. 37, p. 99-107, 1973.

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

11. FURLANETTO, R.S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL 50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* — Linnaeus, 1758. II. Possibilidade de determinação da DL 50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan*, v. 37, p. 109-122, 1973.
12. GUTIÉRREZ, J.M., ROJAS, G., LOMONTE, B., GENÉ, J.A., CHAVES, F. *La evaluación de la capacidad neutralizante de los anti-venenos en América*. San José: Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica, 1990. 21p.
13. KOCHOLATY, F.W., BILLINGS, T.A., ASHLEY, B.D., LEDFORD, E. B., GOETZ, J.C. Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. *Toxicon*, v. 5, p. 165-170, 1968.
14. SILES VILLARROEL, M., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F., FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, v. 42/43, p. 325-336, 1978/79.
15. SILES VILLARROEL, M., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F., GUIDOLIN, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização para — específica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan*, v. 42/43, p. 337-344, 1978/79.
16. SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, v. 42/43, p. 311-323, 1978/79.
17. SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *B. jararaca*. *Mem. Inst. Butantan*, v. 42/43, p. 345-355, 1978/79.
18. SLOTTA, C.H. & SYSZKA, G. Estudos chimicos sobre os venenos ophidicos. I. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, v. 11, p. 109-119, 1937.
19. THEAKSTON, R.D. G. & REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, v. 61, n.6, p. 949-956, 1983.
20. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms*. Geneva: WHO, 1981. 44p.