

PADRONIZAÇÃO DA TITULAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DE VENENOS BOTRÓPICOS, EM CAMUNDONGOS

Medardo SILES VILLARROEL*

Flávio ZELANTE**

Raymundo ROLIM ROSA***

Reynaldo Schwindt FURLANETTO****

RESUMO: Os autores, utilizando venenos das espécies *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jaracussu* e *B. moojeni*, demonstraram que camundongos se prestam satisfatoriamente para a determinação da toxicidade dos venenos botrópicos, quando estes são inoculados por via intraperitoneal. Dispensando a aplicação de outros recursos que visam tornar o sangue incoagulável, foi possível titular venenos, em termos de DL50, com elevada reprodutibilidade. A possibilidade de que os pombos sejam substituídos por camundongos, animais de mais fácil padronização, reveste-se de grande importância, pois torna possível a quantificação da toxicidade dos venenos ofídicos, principalmente daqueles dotados de marcante atividade coagulante.

UNITERMOS: veneno botrópico; titulação da toxicidade de venenos botrópicos; determinação da DL50 dos venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

O método de Vital Brazil¹⁰, preconizado para a titulação de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, apresenta inconveniente para os quais, há muito, se tem proposto soluções. Este método, baseando-se no emprego de pombos nos quais se inocula o veneno por via intravenosa, não oferece condições satisfatórias para a titulação desses venenos e, muito menos, condições de avaliação de sua real toxicidade. O período de observação (20 a 30 minutos após a inoculação) permite detectar unicamente a atividade coagulante do veneno e não a dos seus outros fatores que, devido a se manifestarem mais tarde, não são titulados.

Outros autores, dentre os quais Slotta e Szyszka²⁹ (1937) e Schötler^{22, 23, 24, 25, 26, 27}, utilizaram o camundongo como animal experimental e as vias subcutânea e intravenosa, como vias de inoculação, na pesquisa

* Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

** Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

*** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**** Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ("in memoriam").

Endereço para correspondência: Caixa Postal 4365 — São Paulo — Brasil.

de métodos mais satisfatórios para o estudo da atividade tóxica desses venenos. Em suas publicações, os autores citados destacaram as dificuldades com as quais se defrontaram, principalmente as devidas à falta de reprodutibilidade dos resultados dos ensaios, pois as mortes observadas não ocorriam em concordância com a progressão das doses inoculadas. As verdadeiras causas dessa discordância, somente alguns anos mais tarde puderam ser esclarecidas.

Furlanetto¹¹ (1965) e Furlanetto e col.^{12, 13, 14} obtiveram êxito nos ensaios para a determinação da DL50 de venenos botrópicos, quando utilizaram camundongos previamente tratados com "Dose Preparatória" (DP) do mesmo veneno ou de venenos afins, inoculada por via intravenosa; duas horas após, os mesmos animais recebiam as doses-testes do veneno pela mesma via. Este método era dotado de satisfação reprodutibilidade, embora apresentasse inconvenientes como a necessidade da espera de duas horas entre as duas inoculações e, principalmente, porque o camundongo, ao receber a dose-teste, não pode mais ser considerado como um "animal normal". Como a eficiência desse método é dependente do bloqueio da atividade coagulante do veneno devido à ação da DP, deduzimos teoricamente que, se a um veneno coagulante fosse possibilitada uma absorção mais lenta, as primeiras quantidades absorvidas poderiam agir como verdadeiras doses preparatórias.

Parece-nos terem sido Becker e Glenn¹ (1967), Kocholaty e col.¹⁵ (1971) e Bolaños² (1972), os primeiros pesquisadores a utilizarem, comparativamente, as vias intravenosa e intraperitoneal de camundongos para a avaliação das atividades tóxicas e enzimáticas de venenos ofídicos. Os dois últimos autores concluíram ser a via intravenosa mais eficiente do que a intraperitoneal na determinação da toxicidade dos venenos estudados.

Baseados nestas considerações, nos propusemos a verificar a possibilidade da adoção da via intraperitoneal de camundongos para a titulação de venenos de sete serpentes do gênero *Bothrops*, mais freqüentes entre nós e possuidores, em sua maioria, de marcante atividade coagulante.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Venenos utilizados

Foram utilizados os venenos das espécies de serpentes *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron et Duméril, 1854, *Bothrops cotiara* (Gomes, 1913), *Bothrops neuwiedi* Wagler in Spix, 1824, *Bothrops pradoi* (Hoge, 1948), *Bothrops jararacussu* Lacerda, 1884 e *Bothrops moojeni* Hoge, 1965, fornecidos pelo Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, obtidos de vários animais adultos, por extração manual, dessecados a vácuo e mantidos em geladeira entre 0 e 4°C.

As soluções dos venenos foram preparadas a 1% em solução salina (cloreto de sódio a 0,85%) e centrifugadas a 5.000 rpm durante 20 minutos, a 15°C, a fim de se eliminar eventuais impurezas. Os sobrenadantes foram distribuídos em volumes de 1 ml e 2 ml, em frascos que foram fechados hermeticamente e mantidos a -25°C^{11, 28}. No momento do uso, procedia-se ao descongelamento sob água corrente.

2. *Animais utilizados, vias de inoculação e volumes inoculados*

Empregamos camundongos brancos (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) de ambos os sexos, adultos jovens, pesando entre 18 e 22 gramas, nos quais se inoculava 0,5 ml de cada dose, por via intraperitoneal. Em todos os ensaios, foram utilizados lotes de seis a dez camundongos por dose.

3. *Período de observação*

Os animais foram examinados 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 24 horas e 48 horas após as respectivas inoculações. Os períodos mais precoces de observação, até uma hora, foram introduzidos para se registrar as possíveis mortes imediatas devidas à ação coagulante dos venenos^{12, 13, 14} e, também, aquelas devidas aos eventuais acidentes conseqüentes à inoculação.

4. *Cálculo da DL50*

A toxicidade dos venenos botrópicos foi determinada em termos de DL50, aplicando-se o método de Reed e Müenchen¹⁵ (1938).

5. *Determinação da Dose Mínima Mortal e da Dose Mínima Coagulante*

Para possibilitar as necessárias comparações, determinamos, para os sete venenos empregados, a Dose Mínima Mortal (DMM), segundo o método clássico de Vital Brazil^{3, 10} e a Dose Mínima Coagulante (DMC) ou Unidade Coagulante (UC), de acordo com Furlanetto e col.¹² (1973).

RESULTADOS

Para o estabelecimento das doses-testes necessárias para a determinação das respectivas DL50, inicialmente foram determinadas as zonas de toxicidade dos sete venenos botrópicos utilizados. A tabela 1 exemplifica um teste desta natureza, realizado com veneno de *B. jararaca*; para os demais venenos, julgamos desnecessária a inclusão dos resultados obtidos.

TABELA 1

Determinação da zona de toxicidade do veneno de *Bothrops jararaca* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas				
	5	10	20	40	80
10 minutos	0/6*	0/6	0/6	0/6	0/6
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
24 horas	0/6	0/6	0/6	3/6	6/6
48 horas	0/6	0/6	0/6	3/6	—

* O denominador indica o número de animais que receberam inoculações e o numerador indica o número de animais mortos; este critério foi adotado em todas as demais tabelas.

As tabelas 2 a 8 apresentam os resultados dos ensaios realizados para determinar a toxicidade dos venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

TABELA 2

Determinação da DL50 do veneno de *Bothrops jararaca* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas							DL50
	24	28,8	34,56	41,47	49,76	59,71	71,65	
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	0/6	1/6	2/6	4/6	6/6	6/6	44,58 µg
48 horas	0/6	0/6	1/6	2/6	4/6	—	—	44,58 µg

TABELA 3

Determinação da DL50 do veneno de *Bothrops alternatus* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas							DL50
	50	56	63	70,50	79,50	89	100	
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	1/6	2/6	3/6	4/6	4/6	6/6	6/6	64,14 µg
48 horas	1/6	2/6	3/6	4/6	4/6	—	—	64,14 µg

TABELA 4

Determinação da DL50 do veneno de *Bothrops cotiara* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas							DL50
	100	112	126	141	159	178	200	
10 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
30 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
60 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
24 horas	3/10	4/10	6/10	9/10	9/10	10/10	10/10	117,83 µg
48 horas	3/10	7/10	9/10	10/10	10/10	—	—	106,86 µg

TABELA 5

Determinação da DL50 do veneno de *Bothrops neuwiedi* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas							DL50
	40	44,80	50,40	56,40	63,60	71,20	80	
10 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
30 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
60 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	
24 horas	3/10	4/10	4/10	5/10	6/10	8/10	9/10	54,17 µg
48 horas	3/10	4/10	4/10	5/10	6/10	8/10	9/10	54,17 µg

TABELA 6

Determinação da DL50 do veneno de *Bothrops pradoi* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas							DL50
	70	78,40	88,20	98,70	111,30	124,69	140	
10 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
30 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
60 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
24 horas	0/10	1/10	2/10	6/10	9/10	10/10	10/10	95,41 µg
48 horas	0/10	1/10	2/10	6/10	9/10	—	—	95,41 µg

TABELA 7

Determinação de DL50 do veneno de *Bothrops jararacussu* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas							DL50
	70	78,40	88,20	98,70	111,30	124,60	140	
10 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
30 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
60 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
24 horas	0/10	0/10	0/10	6/10	7/10	8/10	9/10	103,79 µg
48 horas	0/10	0/10	0/10	6/10	7/10	8/10	9/10	103,79 µg

TABELA 8

Determinação da DL50 do veneno de *Bothrops moojeni* inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Tempos de observação	Doses em microgramas					DL50
	80	96	115	138	166	
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	2/6	3/6	5/6	6/6	112,03 µg
48 horas	0/6	2/6	4/6	6/6	—	105,50 µg

Com o objetivo de facilitar uma análise global, incluímos a tabela 9, que resume os valores da DL50 dos sete venenos estudados.

TABELA 9

Resumo dos resultados das DL50 dos sete venenos botrópicos

Venenos	DL50 em µg (48 horas)
<i>B. jararaca</i>	44,58
<i>B. alternatus</i>	64,14
<i>B. cotiara</i>	106,86
<i>B. neuwiedi</i>	54,17
<i>B. pradoi</i>	95,41
<i>B. jararacussu</i>	103,79
<i>B. moojeni</i>	105,50

As tabelas 10 e 11 apresentam os resultados dos testes realizados com veneno de *B. jararaca* e *B. moojeni*, necessários para comprovar a reproduzibilidade do método.

TABELA 10

Repetição da determinação da DL50 do veneno de *B. jararaca* inoculado, em dias diferentes e com a mesma solução do veneno, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Tempos de observação	1.º Ensaio					2.º Ensaio					3.º Ensaio				
	Doses em microgramas					Doses em microgramas					Doses em microgramas				
	28,8	34,56	41,47	49,76	59,71	28,8	34,56	41,47	49,76	59,71	28,8	34,56	41,47	49,76	59,71
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
24 horas	0/6	1/6	2/6	4/6	6/6	0/6	1/6	3/6	4/6	6/6	0/6	2/6	3/6	5/6	6/6
48 horas	0/6	1/6	2/6	4/6	—	0/6	1/6	3/6	4/6	—	0/6	2/6	3/6	5/6	—
	DL50 24 h = 44,58 µg 48 h = 44,58 µg					DL50 24 h = 42,77 µg 48 h = 42,77 µg					DL50 24 h = 40,39 µg 48 h = 40,39 µg				

TABELA 11

Repetição da determinação da DL50 do veneno de *B. moojeni* inoculado, em dias diferentes e com a mesma solução do veneno, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Tempos de observação	1.º Ensaio					2.º Ensaio					3.º Ensaio				
	Doses em microgramas					Doses em microgramas					Doses em microgramas				
	80	96	115	138	166	80	96	115	138	166	80	96	115	138	166
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
24 horas	0/6	2/6	3/6	5/6	6/6	0/6	2/6	3/6	6/6	6/6	0/6	2/6	4/6	5/6	6/6
48 horas	0/6	2/6	4/6	6/6	—	0/6	2/6	3/6	—	—	0/6	2/6	4/6	6/6	—
	DL50 24 h = 112,03 µg 48 h = 105,50 µg					DL50 24 h = 109,10 µg 48 h = 109,10 µg					DL50 24 h = 107,87 µg 48 h = 105,50 µg				

Com a finalidade de possibilitar uma análise comparativa, incluimos a tabela 12 que apresenta os resultados das provas de toxicidade dos sete venenos botrópicos utilizados, determinada pelo método presentemente proposto, em termos de DL50, e pelo método de Vital Brazil, em termos de DMM, utilizando-se das mesmas soluções de venenos.

TABELA 12

Resultados das provas de toxicidade dos sete venenos botrópicos determinadas pelos dois métodos e expressa em DL50 e em DMM

Venenos	DL50 em µg (Método por nós utilizado)	DMM em µg (Método de Vital Brazil)
<i>B. jararaca</i>	44,58	80
<i>B. alternatus</i>	64,14	60
<i>B. cotiara</i>	106,86	150
<i>B. neuwiedi</i>	54,17	20
<i>B. pradoi</i>	95,41	35
<i>B. jararacussu</i>	103,79	40
<i>B. moojeni</i>	105,50	35

Incluímos a tabela 13 com a finalidade de facilitar a análise dos resultados da atividade coagulante das soluções de sete venenos botrópicos a 1%, expressos em termos de Dose Mínima Coagulante (DMC) ou Unidade Coagulante (UC) por ml de solução e sua correspondência em µg do veneno seco.

TABELA 13

Resultados da atividade coagulante dos sete venenos botrópicos expressa em termos de DMC ou UC por ml de solução e sua correspondência em µg de veneno seco

Venenos	Atividade coagulante (UC/ml)	Correspondência em µg do veneno seco
<i>B. jararaca</i>	12.500	0,80
<i>B. alternatus</i>	12.500	0,80
<i>B. cotiara</i>	7.500	1,33
<i>B. neuwiedi</i>	30.000	0,33
<i>B. pradoi</i>	25.000	0,40
<i>B. jararacussu</i>	6.000	1,67
<i>B. moojeni</i>	30.000	0,33

DISCUSSÃO

Os resultados expostos nas tabelas 2 a 8 caracterizam três aspectos de fundamental importância na determinação da DL50 dos venenos botrópicos. Em primeiro lugar, deve ser destacada a ausência de mortes imediatas — até a primeira hora de observação — consequentes a possíveis acidentes de inoculação ou, principalmente, devidas à coagulação intravascular maciça, observada quando da inoculação desses venenos por via sanguínea. Este fato nos parece ser consequente à lenta absorção do veneno em que, as primeiras quantidades absorvidas, atuariam como verdadeiras "Doses Preparatórias" descritas por Furlanetto¹¹ (1965) e Furlanetto e col.^{13, 14}

Assim, as mortes observadas guardam íntima relação com a quantidade do veneno inoculado. Em segundo lugar, deve ser salientada a regularidade na ocorrência dessas mortes, em função da progressão das doses inoculadas. Como terceiro aspecto, deve ser enfatizada a reprodutibilidade do método, conforme pode ser verificado através dos resultados dos repetidos ensaios, realizados com os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni* (tabelas 10 e 11). Foram escolhidos estes venenos por ser, o primeiro, proveniente de uma das espécies mais freqüentes em nosso meio, considerada como espécie-tipo do gênero e, o segundo, por possuir marcante atividade coagulante^{20, 21}. Deixamos de apresentar as comprovações de reprodutibilidade realizadas com os demais venenos, por considerá-las desnecessárias. A análise das tabelas 10 e 11 demonstra perfeita coerência entre os vários resultados. Se confrontarmos os nossos resultados com os apresentados por Furlanetto¹¹ (1965) e por Furlanetto e col.^{13, 14}, comprovamos a existência de concordância entre eles, embora os autores citados tenham utilizado métodos de ensaio e partidas de veneno diferentes dos nossos. Esta concordância confirma que a incoagulabilidade sanguínea, obtida em ambos os métodos, torna-os possíveis de serem aplicados na quantificação da real atividade tóxica dos venenos botrópicos.

A análise comparativa entre as atividades dos venenos botrópicos determinadas através dos métodos ora proposto e o de Vital Brazil (tabela 12), revela aspectos que julgamos interessantes. De um lado, a variação da DL50, entre os sete venenos, é condizente com a proporção dos fatores tóxicos nas suas composições. Por outro lado, a variação nas quantidades de veneno necessárias para determinar a Dose Mínima Mortal (DMM), depende basicamente da proporção do fator coagulante em sua constituição (tabela 13), pois a DMC ou UC, nem sempre é concorde com a atividade tóxica da peçonha, não titulando — e sequer revelando — os fatores responsáveis pelas manifestações mais tardias, subsequentes aos acidentes botrópicos.

De posse dos resultados, permitimo-nos definir a unidade tóxica de veneno botrópico (DL50) como sendo a quantidade de veneno que, quando inoculada intraperitonealmente em camundongos de 18 a 22 g, promove a morte de cerca de 50% dos animais testados, dentro do período de observação de 48 horas.

O método ora proposto firma-se num tripé tendo como bases a utilização do camundongo como animal de ensaio, a via intraperitoneal como via de inoculação e o período de 48 horas como tempo de observação.

Quanto ao uso de camundongos, somos concordes com os autores que nos precederam, pois o próprio Vital Brazil não reconhecia o pombo como o animal ideal para a determinação da toxicidade dos venenos ofídicos^{3, 4}. Dentre os autores que abordaram o assunto, destacamos Slotta e Szyszka²⁹ (1973); Schöttler^{22, 23, 24, 25, 26, 27}; Furlanetto¹¹ (1965); Furlanetto e col.^{12, 13, 14} e Rolim Rosa¹⁹ (1973) entre nós, Calmette⁵ (1894); Christensen e Finney⁷ (1953); Becker e Glenn¹ (1967); Cheymol e col.⁶ (1968); Tur Homma³⁰ (1970); Kocholaty e col.¹⁵ (1971); Bolaños² (1972); Lee e col.¹⁷ (1972); Yang³¹ (1974) e Esquerre⁹ (1976), em diversos países, que empregaram camundongos de diferentes pesos inoculando-os pelas mais diversas vias. Com relação ao peso do animal, acreditamos que camundongos com peso variável entre 18 e 22 g, correspondente a adultos jovens, oferecem as condições biológicas ideais para tal tipo de experimento, em concordância com alguns autores que nos precederam^{6, 11, 19, 30}.

Quanto à via de inoculação, parece-nos que a intraperitoneal é a mais adequada, principalmente para a determinação da toxicidade dos venenos botrópicos, possuidores de marcante atividade coagulante. Quanto aos demais venenos ofídicos, com atividade coagulante ausente ou mínima, a inoculação por via intravenosa proporciona resultados satisfatórios^{2, 6, 15, 19, 30}.

Schöttler²⁶ (1955/56), mesmo após ter adquirido larga experiência no estudo de venenos botrópicos, não conseguiu um método satisfatório para as titulações, através do uso das vias intravenosa e subcutânea de camundongos. Este pesquisador reconhecia que novos métodos deveriam ser investigados. Furlanetto¹¹ (1965) e Furlanetto e col.^{13, 14}, antevendo o emprego satisfatório desse roedor, propiciaram a necessária abertura para os nossos atuais resultados.

O terceiro fator, no qual nos apoiamos, diz respeito ao período de observação do animal após a inoculação. Optamos pelo tempo de 48 horas, a exemplo de Eichbaum⁸ (1947), de Kondo e col.¹⁶ (1971), de Furlanetto¹¹ (1965), de Bolaños² (1972) e de Rolim Rosa¹⁹ (1973), visto que, em algumas oportunidades (tabelas 4 e 8), a observação em 24 horas revelou ser insuficiente para a avaliação da toxicidade dos venenos estudados.

A análise dos nossos resultados, nos autoriza a afirmar que o método presentemente proposto preenche os requisitos necessários para a quantificação, em termos de DL50, dos fatores responsáveis pela toxicidade dos venenos botrópicos, com alto grau de sensibilidade e de reproduzibilidade, isento dos inconvenientes devidos ao fator coagulante.

CONCLUSÕES

1. É possível determinar a toxicidade dos venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, em termos de DL50, através da inoculação intraperitoneal em camundongos;
2. o método adotado elimina a ocorrência das mortes imediatas devidas à atividade coagulante desses venenos, permitindo a

obtenção de resultados com satisfatória sensibilidade e reprodutividade;

3. devido à ação tóxica de alguns venenos botrópicos (*B. cotiara* e *B. moojeni*) se manifestar após as primeiras 24 horas, parece-nos que o período de observação dos animais deva ser estabelecido em 48 horas.

ABSTRACT: The authors demonstrated that the toxicity of venoms from the bothropic species *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. newwiedi*, *B. pradoi*, *B. jararacussu* and *B. moojeni* can be satisfactorily determined in mice, intraperitoneally inoculated. Dispensing other resources that could render the blood incoagulable, the titration with respect to the LD₅₀ of the venoms could be achieved with a high reproductivity. The possibility to substitute pigeons for mice is of great importance, since this allows the quantification of the toxicity of ophidic venoms, mainly of those endowed with marked coagulant activity.

KEYWORDS: Bothropic venoms — titration of the toxicity of bothropic venoms; LD₅₀ determination of bothropic venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKER, R.E. & GLENN, W.G. Differential resistance of mice at various time levels to the lethality of rattlesnake venom (*Crotalus atrox*). *Tex. Rep. Biol. Med.*, 25: 360-4, 1967.
2. BOLAÑOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 21: 360-3, 1972.
3. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo*, 10: 457-62, 1907.
4. BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA, B. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophídico. *Rev. médica São Paulo*, 12:415-25, 1909.
5. CALMETTE, A. Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. *Ann. Inst. Pasteur*, 8: 275-91, 1894.
6. CHEYMOL, J.; MILLE, R.; BOURILLET, F.; SUGA, T. & LABOURDETTE, B. Sur quelques propriétés pharmacodynamiques et biologiques de venins de serpents du genre *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. atrox*, *B. lanceolatus*, et *B. carribeus*). *Bull. Soc. Path. exot.*, 61:673-89, 1968.
7. CHRISTENSEN, P.A. & FINNEY, D.J. Standardization of cobra (*Naja flava*) venom using the graded response method. *J. Immunol.*, 70: 7-20, 1953.
8. EICHBAUM, F. W. A dilution-phenomenon in the titration of antivenins (Antibothropic sera). *J. Immunol.*, 57: 101-14, 1947.
9. ESQUERRE, A.M.C. The Minimum Lethal Dose (MLD) of venoms from Peruvian Crotalidae Snakes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIOAL TOXINS, 5th, San Jose, Costa Rica, 1976. Program and Abstracts. p. 115.
10. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2a. ed. São Paulo, Gráfica Siqueira, 1959. p. 1034-5.
11. FURLANETTO, R.S. Emprego de camundongos tratados com dose preparatória de venenos botrópicos para avaliação de DL50 desses venenos. São Paulo, 1965. /Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/.

12. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y.Q. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* — Linnaeus, 1758. I. Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50. *Mem. Inst. Butantan*, 37: 99-107, 1973.
13. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* — Linnaeus, 1758. II. Possibilidade de determinação da DL50 através da inoculação prévia de doses infraletais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan*, 37: 109-22, 1973.
14. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & NAVAS, J. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* — Linnaeus, 1758. III. Possibilidade de determinação da DL50, através da proteção cruzada conferida por doses infraletais de outros venenos de serpentes do mesmo gênero. *Mem. Inst. Butantan*, 37: 123-9, 1973.
15. KOCHOLATY, W.F.; LEDFORD, E.B.; DALY, J.G. & BILLINGS, T.A. Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of Crotolidae, Elapidae and Viperidae. *Toxicon*, 9: 131-8, 1971.
16. KONDO, H.; KONDO, S.; SADAHIRO, S.; YAMAUCHI, K. & MURATA, S. Standardization of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu) antivenin. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 24:323-7, 1971.
17. LEE, C.Y.; CHANG, S.L.; KAU, S.T. & LUH, S.H. Chromatographic separation of the venom of *Bungarus multicinctus* and characterization of its components. *J. Chromat.*, 72: 71-82, 1972.
18. REED, L.J. & MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-7, 1938.
19. ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 dos venenos de *Bothrops cotiara* (Gomes, 1913), *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron et Duméril, 1854 e *Crotalus durissus terrificus* (Linnaeus, 1768) em *Mus musculus* Linnaeus, 1758. São Paulo, 1973. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/
20. ROSENFIELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. IN: VERONESI, R., ed. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 5a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1972. p. 973-88.
21. ROSENFIELD, G.; HAMPE, O.F. & KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms. Determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29: 143-63, 1959.
22. SCHÖTTLER, W.H.A. Toxicity of the principal snake venoms of Brazil. *Amer. J. trop. Med.*, 31: 489-99, 1951.
23. SCHÖTTLER, W.H.A. Problems of antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 5: 293-320, 1952.
24. SCHÖTTLER, W.H.A. Aspectos metodológicos da titulação de soros antipeçonhentos. *Mem. Inst. Butantan*, 26: 249-56, 1954.
25. SCHÖTTLER, W.H.A. Serological analysis of venoms and antivenins. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 12: 877-903, 1955.
26. SCHÖTTLER, W. H.A. Observações miscelâneas sobre peçonhas ofídicas e antivenenos. *Mem. Inst. Butantan*, 27: 73-105, 1955/56.
27. SCHÖTTLER, W.H.A. Reference toxins for antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 19: 341-61, 1958.
28. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararacussu*, *B. atrox* e *B. cotiara*). São Paulo, 1972. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/

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*, 42/43:311-323, 1978/79.

29. SLOTTA, C.H. & SZYSZKA, G. Estudos chimicos sobre os venenos ophidicos. I. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 11: 109-19, 1937.
30. TU, A.T. & HOMMA, M. Toxicologic study of snake venoms from Costa Rica. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 16: 73-8, 1970.
31. YANG, C.C. Chemistry and evolution of toxins in snake venoms. *Toxicon*, 12: 1-43, 1974.

