

PADRONIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE ANTIVENENOS BOTRÓPICOS, EM CAMUNDONGOS

Medardo SILES VILLARROEL*
Raymundo ROLIM ROSA**
Flávio ZELANTE***
Reynaldo Schwindt FURLANETTO****

RESUMO: A comprovação de que a inoculação intraperitoneal em camundongos se presta satisfatoriamente para a determinação da toxicidade de venenos botrópicos, possibilitou aos autores adotarem o mesmo modelo experimental na avaliação da potência dos respectivos antivenenos. Assim, aplicando uma conduta técnica diversa da preconizada pela Farmacopéia Brasileira, os autores titularam 14 antivenenos botrópicos mono e polivalentes, em função da atividade tóxica dos venenos das espécies *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*. Baseados em seus resultados, os autores recomendam o método presentemente exposto como solução dos problemas verificados quando da titulação de antivenenos ofídicos, principalmente daqueles relacionados aos venenos dotados de marcante atividade coagulante. A inoculação intraperitoneal da mistura veneno-antiveneno em camundongos, mesmo com excesso de veneno, não altera a regularidade dos resultados, devido à eliminação das mortes imediatas consequentes ao fator coagulante.

UNITERMOS: antiveneno botrópico; doseamento de antivenenos botrópicos; avaliação da potência de antivenenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de métodos ideais para o doseamento dos antivenenos ofídicos tem sido uma constante, desde o advento da soroterapia antiofídica. Schöttler²² (1954) afirmou que "por mais laboriosa e custosa que esta tarefa possa parecer, ela deveria ser atacada com o objetivo

* Professor Livre Docente 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 Adjunto 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 — SP — Brasil.

de transformar o atual mistério que cerca a titulação dos soros antipeçonhentos em método prático, acessível e cientificamente fundado".

A eficiência do emprego da via intraperitoneal de camundongos, para a titulação de venenos de serpentes botrópicas, demonstrada por Siles Villarroel²⁷ (1977) e por Siles Villarroel e col.²⁸ (1978), permitiu antever a possibilidade da aplicação do método então proposto para o doseamento dos antivenenos botrópicos, pois pelo método original de Vital Brazil² (1907), não se quantificam os anticorpos antitóxicos, mas aqueles específicos à atividade coagulante, pois o pombo, após receber a inoculação por via intravenosa, é observado apenas durante um período de 20 a 30 minutos. É evidente que tal conduta técnica, embora utilizada até hoje em nosso meio e ainda preconizada pela Farmacopéia Brasileira⁸ (1959), apresenta uma série de inconvenientes^{10, 27, 28}.

Grasset¹¹ (1957), em revisão publicada no Boletim da Organização Mundial de Saúde, analisou os métodos para a avaliação da potência dos antivenenos ofídicos utilizados em 22 institutos de pesquisa, em diferentes partes do mundo. Constatou a existência de uma diversidade muito grande entre eles, principalmente no que se refere aos animais utilizados e às vias de inoculação empregadas.

As vias intravenosa e subcutânea de camundongos foram utilizadas por Calmette³ (1894), Eichbaum⁷ (1947), Schöttler^{20, 21, 22, 23, 24, 25}, Lin¹⁵ (1962), Kondo e col.¹³ (1965) e Kondo e col.¹⁴ (1971), Christensen⁵ (1966), Christensen⁶ (1967) e Puranananda e col.¹⁸ (1966), possibilitando, satisfatoriamente, o doseamento de antivenenos específicos a venenos desprovidos ou possuidores de pequena atividade coagulante. Ao contrário, quando do doseamento de antivenenos correspondentes a peçonhas dotadas de marcante atividade coagulante, a exemplo do que ocorre com o pombo, os camundongos ou outros animais que foram utilizados^{2, 3, 4}, não se prestaram adequadamente, devido à ocorrência de mortes imediatas e, consequentemente, resultando em falta de reprodutibilidade do método^{10, 24}.

Kocholaty e col.¹² (1968) abriram novas perspectivas quando, ao utilizarem diversas vias de inoculação de camundongos para o doseamento de antivenenos frente a uma variedade de venenos ofídicos, demonstraram que a intravenosa e a intraperitoneal se revelaram como as mais indicadas. Bolaños e col.¹ (1975) utilizaram a via intraperitoneal do camundongo para o doseamento de antivenenos do gênero *Micrurus*.

No presente trabalho, nos propusemos a verificar a possibilidade da utilização da via intraperitoneal de camundongos em substituição ao pombo como animal de prova, para o doseamento de antivenenos mono e polivalentes, específicos às peçonhas de serpentes botrópicas mais freqüentes no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Venenos botrópicos

Os venenos utilizados em nossos experimentos foram fornecidos pelo Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e obtidos de várias serpentes adultas,

por extração manual, submetidos à secagem a vácuo e que, após a cristalização, eram mantidos em geladeira entre 0 e 4°C.

Empregamos venenos das seguintes espécies: *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.

As soluções dos venenos foram preparadas a 1%, conforme Siles Villarroel e col.²⁸ (1978).

2. Antivenenos botrópicos

Os antivenenos utilizados, provenientes do Instituto Butantan, foram obtidos através de hiperimunização de cavalos e purificados pelo método de Pope^{16, 17}, modificado por Furlanetto⁹ (1961). Empregamos três antivenenos específicos para os venenos de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* e 11 antivenenos botrópicos polivalentes, com os seguintes títulos neutralizantes, determinados pelo Instituto Butantan segundo o método de Vital Brazil⁸:

ANTIVENENOS	PARTIDAS	TITULOS EM mg/ml
<i>B. jararaca</i>	1	10,0
<i>B. moojeni</i>	2	4,0
<i>B. neuwiedi</i>	3	2,0
Botrópico polivalente	B-21-76-88	4,0
Botrópico polivalente	B-26-76-125	4,0
Botrópico polivalente	B-27-76-126	5,0
Botrópico polivalente	B-28-76-127	4,0
Botrópico polivalente	B-31-76-133	4,0
Botrópico polivalente	B-32-76-134	3,5
Botrópico polivalente	B-33-76-135	3,5
Botrópico polivalente	B-34-76-136	4,0
Botrópico polivalente	P-127 (B-163)	3,0
Botrópico polivalente	P-128 (C-17)	3,0
Botrópico polivalente	P-132 (D-76)	3,0

3. Animais utilizados e via de inoculação

Foram utilizados camundongos brancos (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) de ambos os sexos, adultos jovens, pesando entre 18 e 22 gramas. As inoculações eram realizadas através da via intraperitoneal. Em todos os ensaios, cada dose era inoculada em lotes de seis animais.

4. Doseamento dos antivenenos botrópicos

Devido à sensibilidade do camundongo ao agente preservativo (fenol) normalmente adicionado aos antivenenos purificados, os imunesoros foram diluídos a 1/2. Na avaliação da potência dos antivenenos, mantivemos constantes os seus volumes (0,5 ml), adicionando doses variáveis do veneno e completando com solução salina, quando necessário, até o volume final de 1 ml. A mistura veneno-antiveneno era incubada a 37°C durante 30 minutos e integralmente inoculada. A exemplo do estabelecido em trabalho anterior²⁸, os animais foram observados durante um período de 48 horas.

RESULTADOS

As tabelas 1 a 7 apresentam os resultados das provas de soroneutralização, realizadas com o antiveneno botrópico polivalente purificado (Partida B-21-76-88) diluído a 1/2, frente às soluções a 1% dos venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

TABELA 1

Doseamento do antiveneno botrópico (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *Bothrops jararaca* (DL50 = 44,58 µg) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. jararaca</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,50	0,050	0,450	37°C	0/6	0/6
0,75	0,075	0,425		0/6	0/6
1,00	0,100	0,400	X	0/6	0/6*
1,25	0,125	0,375		0/6	3/6
1,50	0,150	0,350	30 min.	4/6	6/6
1,75	0,175	0,325		6/6	—

* Título: 1 ml neutraliza 4 mg de veneno de *B. jararaca*.

O título antitóxico de um antiveneno foi por nós estabelecido como equivalente à maior dose de veneno que, adicionada a uma quantidade fixa desse antiveneno seja neutralizada integralmente. Neste caso (tabela 1), 0,5 ml da diluição 1/2 do antiveneno botrópico polivalente, neutralizou 1 mg do veneno de *B. jararaca*. Assim, o título antitóxico corresponde a 4 mg/ml. O mesmo critério foi adotado para os demais doseamentos apresentados.

TABELA 2

Doseamento do antiveneno botrópico (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. alternatus* ($DL_{50} = 64,14 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. alternatus</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,50	0,050	0,450	37°C	0/6	0/6
0,75	0,075	0,425		0/6	0/6
1,00	0,100	0,400	X	0/6	0/6
1,25	0,125	0,375		0/6	0/6*
1,50	0,150	0,350	30 min.	4/6	4/6
1,75	0,175	0,325		6/6	—

* Título: 1 ml neutraliza 5 mg de veneno de *B. alternatus*.

TABELA 3

Doseamento do antiveneno botrópico (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. cotiara* ($DL_{50} = 106,86 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. cotiara</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,25	0,025	0,475	37°C	0/6	0/6
0,50	0,050	0,450		0/6	0/6
0,75	0,075	0,425	X	0/6	0/6*
1,00	0,100	0,400		5/6	6/6
1,25	0,125	0,375	30 min.	6/6	—
1,50	0,150	0,350		6/6	—

* Título: 1 ml neutraliza 3 mg de veneno de *B. cotiara*.

TABELA 4

Doseamento do antiveneno botrópico (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. neuwiedi* ($DL_{50} = 54,17 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. neuwiedi</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,75	0,075	0,425	37°C	0/6	0/6
1,00	0,100	0,400		0/6	0/6
1,25	0,125	0,375	X	0/6	0/6
1,50	0,150	0,350		0/6	0/6
1,75	0,175	0,325	30 min.	0/6	0/6*
2,00	0,200	0,300		1/6	4/6

* Título: 1 ml neutraliza 7 mg de veneno de *B. neuwiedi*.

TABELA 5

Doseamento do antiveneno botrópico (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. pradói* ($DL_{50} = 95,41 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. pradói</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,25	0,025	0,475	37°C	0/6	0/6
0,50	0,050	0,450		0/6	0/6*
0,75	0,075	0,425	X	2/6	3/6
1,00	0,100	0,400		3/6	5/6
1,25	0,125	0,375	30 min.	4/6	6/6
1,50	0,150	0,350		5/6	6/6

* Título: 1 ml neutraliza 2 mg de veneno de *B. pradói*.

TABELA 6

Doseamento do antiveneno botrópico (0,5 ml), colocado frente ao veneno *B. jararacussu* ($DL_{50} = 103,79 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. jararacussu</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,25	0,025	0,475	37°C	0/6	0/6
0,50	0,050	0,450		0/6	0/6*
0,75	0,075	0,425	X	2/6	3/6
1,00	0,100	0,400		6/6	—
1,25	0,125	0,375	30 min.	6/6	—
1,50	0,150	0,350		6/6	—

* Título: 1 ml neutraliza 2 mg de veneno de *B. jararacussu*.

TABELA 7

Doseamento do antiveneno botrópico (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. moojeni* ($DL_{50} = 105,5 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. moojeni</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,25	0,025	0,475	37°C	0/6	0/6
0,50	0,050	0,450		0/6	0/6
0,75	0,075	0,425	X	0/6	0/6
1,00	0,100	0,400		0/6	0/6*
1,25	0,125	0,375	30 min.	2/6	4/6
1,50	0,150	0,350		6/6	—

* Título: 1 ml neutraliza 4 mg de veneno de *B. moojeni*.

Com o objetivo de facilitar uma análise global, incluímos a tabela 8, correspondente aos resultados dos ensaios de doseamento do antiveneno botrópico polivalente purificado (Partida B-21-76-88) frente aos sete venenos utilizados.

TABELA 8

Títulos apresentados pelo antiveneno botrópico polivalente frente aos sete venenos estudados, expressos em mg/ml e suas correspondências em termos de DL50/ml.

Venenos	Títulos do antiveneno botrópico (mg/ml)	Títulos do antiveneno botrópico (DL50/ml)
<i>B. jararaca</i>	4,0	89,73
<i>B. alternatus</i>	5,0	77,95
<i>B. cotiara</i>	3,0	28,07
<i>B. neuwiedi</i>	7,0	129,22
<i>B. pradoi</i>	2,0	20,96
<i>B. jararacussu</i>	2,0	19,27
<i>B. moojeni</i>	4,0	37,91

Na realização das provas de soroneutralização específica, utilizamos dos antivenenos monovalentes purificados de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*.

TABELA 9

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno específico (DL50 = 44,58 µg) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. jararaca</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
2,50	0,250	0,250	37°C	0/6	0/6
2,75	0,275	0,225		0/6	0/6
3,00	0,300	0,200	X	0/6	0/6*
3,25	0,325	0,175		0/6	5/6
3,50	0,350	0,150	30 min.	4/6	6/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 12 mg de veneno específico.

TABELA 10

Doseamento do antiveneno de *B. moojeni* (0,5 ml), colocado frente ao veneno específico (DL50 = 105,50 µg) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. moojeni</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,75	0,075	0,425	37°C	0/6	0/6
1,00	0,100	0,400		0/6	0/6*
1,25	0,125	0,375	X	4/6	4/6
1,50	0,150	0,350		6/6	—
1,75	0,175	0,325	30 min.	6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. moojeni* neutraliza 4 mg de veneno específico.

TABELA 11

Doseamento do antiveneno de *B. neuwiedi* (0,5 ml), colocado frente ao veneno específico (DL₅₀ = 36,86 µg) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. neuwiedi</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,50	0,050	0,450	37°C	0/6	0/6
0,75	0,075	0,425		0/6	0/6*
1,00	0,100	0,400	X	5/6	5/6
1,25	0,125	0,375		6/6	—
1,50	0,150	0,350	30 min.	6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. neuwiedi* neutraliza 3 mg de veneno específico.

Foram executadas repetidas provas de soroneutralização, com a finalidade de comprovar a reprodutibilidade dos títulos neutralizantes dos antivenenos. Em virtude do comportamento uniforme apresentado por todos os antivenenos, tabulamos os resultados obtidos de quatro ensaios para dois antivenenos botrópicos polivalentes, (Part. B-21-76-88 e Part. P-128-C-17). Realizamos as titulações em dias diferentes e sempre com a utilização do veneno de *B. jararaca*, proveniente da mesma solução inicial.

TABELA 12

Resultados das provas de comprovação de reprodutibilidade no doseamento de antivenenos botrópicos, através da inoculação intraperitoneal em camundongos de 18 a 22 g.

Antivenenos	Títulos em. mg/ml obtidos			
	1. ^a prova	2. ^a prova	3. ^a prova	4. ^a prova
Botrópico polivalente Part. B-21-76-88	4,0	4,0	4,0	4,0
Botrópico polivalente Part. P-128-C-17	5,0	5,0	5,0	5,0

Os títulos neutralizantes dos demais antivenenos botrópicos polivalentes utilizados, estão apresentados na tabela 13.

TABELA 13

Títulos de dez antivenenos botrópicos polivalentes, expressos em mg/ml e em DL50/ml, determinados frente ao veneno de *B. jararaca* ($DL50 = 44,58 \mu g$), em camundongos de 18 a 22 g, inoculados intraperitonealmente.

Antivenenos	Títulos obtidos pelo método, por nós utilizado, expressos em	
	mg/ml	DL50/ml
B.P.* Part. B-26-76-125	5,0	112,16
B.P. Part. B-27-76-126	4,0	89,73
B.P. Part. B-28-76-127	4,0	89,73
B.P. Part. B-31-76-133	3,0	67,29
B.P. Part. B-32-76-134	5,0	112,16
B.P. Part. B-33-76-135	4,0	89,73
B.P. Part. B-34-76-136	3,0	67,29
B.P. Part. P-127 (B-163)	4,0	89,73
B.P. Part. P-128 (C-17)	5,0	112,16
B.P. Part. P-132 (D-76)	5,0	112,16

* Botrópico polivalente.

DISCUSSÃO

Em todos os ensaios realizados, constatamos a ausência de mortes imediatas e regularidade na sua ocorrência em função da progressão das doses de veneno inoculadas. As possíveis razões deste comportamento foram analisadas em trabalhos anteriores^{27, 28}.

Como já foi destacado, os títulos dos antivenenos botrópicos referem-se somente à neutralização da atividade coagulante, devido serem determinados segundo as normas constantes da atual Farmacopéia. Ora, permitimo-nos considerar incompleta e inadequada tal determinação, pois a concentração desse fator é variável conforme a natureza do veneno (Rosenfeld e col.¹⁹ (1959); Siles Villarroel²⁶ (1972) e conforme a proporção desses venenos na mistura imunogênica empregada na obtenção do soro antibotrópico polivalente. Conseqüentemente, os títulos atribuídos a estes produtos biológicos podem ser reconhecidos na atualidade, como incompletos, não devido a falhas técnicas introduzidas pelo grande mestre Vital Brazil mas, sim, à natural evolução dos conhecimentos científicos, pois o próprio pesquisador já antevia argumentos contrários à padronização por ele proposta².

A demonstração de nova metodologia para a determinação da toxicidade dos venenos botrópicos^{27, 28}, possibilitou-nos as condições para que revisássemos os métodos adotados entre nós para o doseamento dos antivenenos mono e polivalentes.

Os nossos resultados, constantes das tabelas 1 a 7, referentes ao doseamento do antiveneno botrópico polivalente frente aos sete venenos estudados e expressos em termos de mg de veneno neutralizado por ml

do antiveneno, demonstram satisfatoriamente a eficiência do método ora desenvolvido.

O período de observação do animal (48 horas) pareceu-nos ser perfeitamente adequado, pois conforme pôde-se verificar em praticamente todos os experimentos realizados, dentre os animais que sobreviveram às primeiras 24 horas, alguns deles vieram a morrer quando se prolongou a observação até 48 horas. Assim, pudemos detectar, com maior acuidade, os efeitos da atividade tóxica dos venenos testados.

A tabela 8, resumindo os resultados dos doseamentos realizados e constantes das tabelas 1 a 7, permite um confronto entre os valores expressos em termos de mg de venenos e as suas equivalências em DL50, neutralizados por 1 ml do antiveneno.

Todas estas informações, somadas às obtidas quanto da soroneutralização específica (tabelas 9, 10 e 11), comprovam a eficiência do modelo experimental ora utilizado, demonstrando que a inoculação intraperitoneal em camundongo é um processo plenamente satisfatório pois, além de eliminar os inconvenientes considerados, é perfeitamente reproduzível (tabela 12), permitindo que a potência dos antivenenos botrópicos seja avaliada em função dos componentes tóxicos dos respectivos venenos. Esta conduta técnica vai de encontro às recomendações emitidas por organismos internacionais como a Permanent Commission on Biological Standardization of the Health Organization of the League of Nations, Department of Biological Standardization of the Statens Serum Institut e WHO Expert Committee on Biological Standardization¹¹, que têm mantido constante preocupação com a padronização dos métodos utilizados para a avaliação da potência dos antivenenos ofídicos.

CONCLUSÕES

1. É possível o doseamento de antivenenos botrópicos mono e polivalentes através da inoculação intraperitoneal em camundongos de 18 a 22 g;
2. o método ora proposto, eliminando as mortes imediatas consequentes ao fator coagulante do veneno e tornando-as proporcionais às doses inoculadas, permite que os antivenenos botrópicos sejam aferidos frente aos componentes tóxicos dos venenos e em bases populacionais;
3. devido à sua reproduzibilidade e à utilização de animais de fácil controle e de baixo custo, o método por nós desenvolvido revelou-se plenamente satisfatório para o doseamento de antivenenos botrópicos.

ABSTRACT: The confirmation that an intraperitoneal inoculation in mice is satisfactory for the determination of the toxicity of bothropic venoms, permitted the adoption of the same experimental model for the evaluation of the respective antivenin potency. Therefore, in applying a technical method different as that preconized by the Brazilian Pharmacopoeia, the authors titrated 14 bothropic mono- and polyvalent antivenins, in function of the toxic activity of the venoms from *B. jararaca*, *B. alternatus*,

B. cotiara, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jararacussu* and *B. moojeni*. Based upon their results, the authors recommend the present method as a solution to the problems verified during the titration of ophidic antivenins, mainly those related to venoms endowed with marked coagulant activity. The intraperitoneal inoculation of the venom-antivenin mixture in mice, even with an excess of venom, does not bring about any alteration in the regularity of the results, due to the exclusion of immediate deaths in consequence of the coagulant factor.

KEYWORDS: bothropic antivenin; bothropic antivenin dosage; evaluation of bothropic antivenin potency.

REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. & TAYLOR, R. The production and characteristics of a coral snake (*Micrurus mipartitus* Hertwigi) antivenin. *Toxicon*, 13: 139-42, 1975.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo*, 10: 457-62, 1907.
3. 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.
4. CÉSARI, E. & BOQUET, P. Recherches sur les antigènes des venins et les anticorps des sérum antivenimeux. *Ann Inst. Pasteur*, 58: 6-25, 1937.
5. CHRISTENSEN, P.A. Venom and antivenom potency estimation. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 305-26, 1966.
6. CHRISTENSEN, P.A. Remarks on antivenin potency estimation. *Toxicon*, 5: 143-5, 1967.
7. ELCHBAUM, F.W. A dilution-phenomenon in the titration of antivenins (Antibothropic sera). *J. Immunol.*, 57:101-14, 1947.
8. FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2a. ed. São Paulo, Gráfica Siqueira, 1959. p. 1034-5.
9. FURLANETTO, R.S. Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico. São Paulo, 1961. p. 64-5 /Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/.
10. 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.
11. GRASSET, E. Survey of assay methods of antivenins. Immunological factors influencing antivenin standardization. *Bull. Org. mond. Santé*, 16: 79-122, 1957.
12. KOCHOLATY, W.F.; 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*, 5: 165-70, 1968.
13. KONDO, H.; KONDO, S.; SADAHIRO, S.; YAMAUCHI, K.; OHSAKA, A. & MURATA, R. Standardization of antivenine. I. Method for determination of antilethal potency of Habu antivenine. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 18: 101-10, 1965.
14. KONDO, H.; KONDO, S.; SADAHIRO, S.; YAMAUCHI, K. & MURATA, R. Standardization of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu) antivenin. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 24: 323-7, 1971.

15. LIN, C.G. Studies on the assay methods of antivenins. *J. Formosan med. Ass.*, 61: 170-80, 1962.
16. POPE, C.G. Disaggregation of proteins by enzymes. *Brit. J. exp. Path.*, 19: 245-51, 1938.
17. POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Brit. J. exp. Path.*, 20: 201-12, 1939.
18. PURANANANDA, C.; LAUHATIRANANDA, P. & GANTHAVORN, S. Cross immunological reactions in snake-venoms. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 327-30, 1966.
19. ROSENFIELD, G.; HAMPE, O.G. & 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.
20. SCHÖTTLER, W.H.A. Antigen-antibody relations in the present antivenin production of Brazil. *Amer. J. trop. Med.*, 31: 500-9, 1951.
21. SCHÖTTLER, W.H.A. Problems of antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 5: 293-320, 1952.
22. SCHÖTTLER, W.H.A. Aspectos metodológicos da titulação de soros anti-peçonhentos. *Mem. Inst. Butantan*, 26: 249-56, 1954.
23. SCHÖTTLER, W.H.A. Serological analysis of venoms and antivenins. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 12: 877-903, 1955.
24. SCHÖTTLER, W.H.A. Observações miscelâneas sobre peçonhas ofídicas e antivenenos. *Mem. Inst. Butantan*, 27: 73-105, 1955/56.
25. SCHÖTTLER, W.H.A. Reference toxins for antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 19: 341-61, 1958.
26. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de venenos 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 botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:311-23, 1978/79.
27. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos. São Paulo, 1977. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/.
28. 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*, 42/43:311-23, 1978/79.