

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Fábio Henrique Dias Martins Lima

**ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BIOSSEGURANÇA PARA MANIPULAÇÃO
E DESCARTE DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NO ÂMBITO DO
INCQS – FIOCRUZ/RJ**

Rio de Janeiro

2018

Fábio Henrique Dias Martins Lima

**ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BIOSSEGURANÇA PARA MANIPULAÇÃO
E DESCARTE DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NO ÂMBITO DO
INCQS – FIOCRUZ/RJ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Armi Wanderley da Nóbrega

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Dias Martins Lima, Fábio Henrique

Elaboração de um manual de biossegurança para manipulação e descarte do veneno botrópico de referência no âmbito do INCQS – FIOCRUZ/RJ / Fábio Henrique Dias Martins Lima. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

132 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária). Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2018.

Orientador: Armi Wanderley da Nóbrega.

Revisora: Helena Pereira da Silva Zamith.

1. Biossegurança. 2. *Bothrops*. 3. Resíduos Tóxicos. 4. Toxicidade.

Preparation of a biosafety manual for handling and disposal of brazilian bothropic reference venom within of INCQS – FIOCRUZ/RJ.

Fábio Henrique Dias Martins Lima

**ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BIOSSEGURANÇA PARA MANIPULAÇÃO
E DESCARTE DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NO ÂMBITO DO
INCQS – FIOCRUZ/RJ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___ / ___ / ____

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marcelo Salabert Gonzalez (Doutor)

Universidade Federal Fluminense

Humberto Pinheiro Araújo (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Armi Wanderley da Nóbrega (Doutor) - Orientador

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico esse trabalho à minha amada esposa que me impulsionou no início desse desafio e aos meus amigos e colegas da instituição que contribuíram para o enriquecimento do trabalho durante a jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, que ilumina o meu caminho durante todo o meu percurso e que me possibilitou fechar mais um ciclo em minha vida.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Lourival José, pelos quais rogo todas as noites pela minha existência e que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, dando-me uma educação de qualidade, apesar de todas as dificuldades da vida.

Ao meu irmão, minhas sobrinhas e minha cunhada que compreenderam a minha ausência nos encontros familiares.

A minha esposa Patrícia, pessoa com quem amo partilhar a vida, agradeço a sua capacidade de acreditar em mim, sacrificar-se por vários dias em que estive ausente, estar continuamente me incentivando, impulsionando-me a alcançar os meus sonhos e acima de tudo por carregar meu filho Bento Henrique no seu ventre, e mesmo com tantas alterações, principalmente hormonais, continuar sendo a pessoa maravilhosa que é e ao mesmo tempo me proporcionar paz e amor. Amo-te infinitamente.

As minhas amigas do Setor de Soros Antipeçonhentos por estarem sempre ao meu lado. A Maria Aparecida (Cida) por me “forçar” a fazer a inscrição no mestrado quando soube da abertura do edital, por convencer o meu orientador a me orientar, por ser minha “coorientadora”, mesmo que não oficialmente, por estar sempre presente com sua expertise e visão macro em todos os momentos que precisei, e foram vários. A Elizabeth (Beth) por sempre me apoiar, compreender meus momentos difíceis e participar de cursos comigo como forma de incentivo. A minha amiga maravilhosa Gabriele (Gabi) por contribuir inestimavelmente em todas as etapas do projeto, quer seja em todos os ensaios, contatos com amigos da Fiocruz ou mesmo incentivando-me nessa árdua missão. Não tenho palavras para descrever minha gratidão por todas vocês!

Ao Dr. Armi Wanderley da Nóbrega por aceitar ser meu orientador sem saber da “roubada” que estava entrando. Obrigado por me fazer acreditar que seria capaz de construir esse sonho. Espero não ter lhe desapontado.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Imunologia, agradeço o apoio e os momentos juntos, principalmente pelo apoio da Andréa, Alexandre, Daniela e Lúcia Werneck

Aos meus amigos da Pós-Graduação, que compartilharam das mesmas angústias, horas de estudo, trocas de mensagens de apoio, principalmente na realização do “Diário Reflexivo”.

Aos professores do PPGVS que sempre foram atenciosos e didáticos – obrigado pelos ensinamentos – especialmente a Professora Dra. Kátia Leandro, pelo apoio, incentivo e também pelo diário reflexivo, pode ter certeza que este contribuiu para meu crescimento e amadurecimento e, também as meninas da pós-graduação, muito obrigado pela prontidão e receptividade.

Ao Instituto de Ciências e Tecnologia de Biomodelos (ICTB), antigo Cecal, pelo fornecimento dos animais, assim como todos os profissionais do Laboratório de Histotécnica do ICTB, especialmente ao Igo e Margarida que foram extremamente amáveis, pacientes e por ter realizado os exames macroscópicos e microscópicos a tempo.

A toda equipe do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) de Biomanguinhos que enriqueceram meus conhecimentos sobre a ciência de animais de laboratório, proporcionando-me aprender novas técnicas. Agradeço, em especial ao Rodrigo Muller e a Mônica Nogueira, por estarem sempre disponíveis para me ajudar. Obrigado pelos vários empréstimos de materiais.

A equipe do SAL, Thaís, Jussara, Reginaldo e Marcos por sempre estarem disponíveis em resolver tudo que eu pedia.

Aos meus amigos que entenderam minha ausência, principalmente ao Cláudio Lau, por estar presente em minha vida, ajudando-me em tudo que pode, desde a graduação.

A todas as pessoas que de alguma maneira direta ou indiretamente me apoiaram no desenvolvimento desta dissertação. Muito obrigado e que Deus abençoe a todos!

Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Os acidentes ofídicos têm alta incidência no Brasil, sendo a espécie *Bothrops jararaca* a serpente de maior importância médica, apresentando aproximadamente 95.000 casos de acidentes notificados de 2011 a 2015. O único tratamento eficaz é a soroterapia, cujo soro antiofídico é produzido por laboratórios públicos e oferecido gratuitamente à população pelo Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde. O INCQS é o órgão técnico ligado a Anvisa responsável pelo controle da qualidade dos soros produzidos pelos laboratórios públicos. O veneno ofídico de referência nacional BraBot/005 é fornecido aos produtores para o controle da qualidade do soro antiofídico. Esses resultados informados pelos produtores são confrontados com os ensaios realizados no INCQS, ambos seguindo a Farmacopeia Brasileira. Não há estudos científicos sobre a biossegurança relacionados a manipulação e descarte do veneno ofídico. No presente estudo foram realizados testes para determinar a inativação do BraBot/005 em todas as formulações que são utilizadas para a realização dos ensaios no INCQS. As soluções empregadas nos testes foram submetidas ao processo físico de calor úmido a 121 °C por 60 minutos e constatou-se que 100% da inativação do BraBot/005, demonstrando a efetividade desse processo para eliminação dos riscos toxicológicos. Também foram conduzidos ensaios de toxicidade aguda em camundongos Swiss Webster machos e fêmeas com BraBot/005. No ensaio de toxicidade oral aguda, baseada na diretriz da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 423, nas doses de 50, 300 e 2000 mg/kg de BraBot/005 não foram evidenciados sinais clássicos de toxicidade nos animais. No ensaio de toxicidade dérmica aguda, através da diretriz OECD 434, foi utilizado um animal com a dose de 1000 mg/kg e posteriormente cinco animais com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005, não evidenciados sinais de toxicidade sistêmica em ambas as doses. Entretanto, os animais expostos à dose de 1000 e 2000 mg/kg, apresentaram sinais de irritação cutânea, desde o aparecimento de eritema leve à severo. Todos os animais apresentaram recuperação tecidual total visível até o oitavo dia. Foram realizados exames macroscópicos e microscópicos em todos os animais que foram expostos à dose de 2000 mg/kg e não foram observadas anormalidades. Concluiu-se que o veneno não apresenta riscos toxicológicos por

exposição aguda oral e dérmica e que o método de calor úmido é adequado para assegurar a inatividade toxicológica. Foi elaborado um manual de biossegurança para o manuseio e descarte do BraBot/005. Entretanto é necessário novos estudos na área para garantir a segurança por outras vias e tempo de exposição do veneno.

Palavras-chave: Biossegurança. *Bothrops*. Resíduos Tóxicos. Toxicidade.

ABSTRACT

The ophidian accidents have a high incidence in Brazil, being the species *Bothrops jararaca* the snake of major medical importance, presenting approximately 95,000 cases reported from 2011 to 2015. The only effective treatment is antivenom therapy, whose Bothrops Antivenom is produced by public laboratories and offered free of charge to the population by the National Immunization Program of the Ministry of Health. The INCQS is the technical entity linked to Anvisa responsible for the quality control of sera produced by public laboratories. The Brazilian Bothrops Reference Venom - BraBot / 005 - is supplied to the producers to the quality control of Brazilian Bothrops Antivenom. These results informed by the producers are confronted with the tests carried out in INCQS, both following the Brazilian Pharmacopoeia. There are no scientific studies on biosafety related to the handling and disposal of the poison. In the present study, tests were carried out to determine the inactivation of BraBot / 005 in all the formulations that are used to perform the tests in the INCQS. The solutions used in the tests were submitted to the physical process of humid heat at 121 °C for 60 minutes and it was verified that 100% of inactivation of the BraBot/005, demonstrating the effectiveness of this process to eliminate toxicological risks. Acute toxicity assays were also conducted in male and female Swiss Webster mice with BraBot / 005. In the acute oral toxicity test, based on the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guideline 423, at the doses of 50, 300 and 2000 mg / kg BraBot / 005 no classical signs of toxicity were shown in the animals. In the acute dermal toxicity test, using the OECD 434 guideline, one animal was used at the dose of 1000 mg / kg and subsequently five animals at the dose of 2000 mg / kg BraBot / 005, with no signs of systemic toxicity in both doses. However, the animals exposed to the dose of 1000 and 2000 mg / kg showed signs of skin irritation, from the appearance of mild to severe erythema. All animals presented total tissue recovery visible until the eighth day. Macroscopic and microscopic examinations were performed on all animals exposed to the 2000 mg / kg dose and no abnormalities were found. It was concluded that the poison does not present toxicological risks due to acute oral and dermal exposure and that the wet heat method is adequate to ensure toxicological inactivity. A biosafety manual has been

developed for the handling and disposal of BraBot / 005. However, further studies are needed in the area to ensure safety by other routes and exposure time of the venom.

Keywords: Biosafety. *Bothrops*. Toxic Wastes. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico no Brasil em 2013.....	29
Gráfico 1	Números de casos de ofidismo no Brasil entre 2011 e 2015.....	30
Gráfico 2	Distribuição mensal dos casos de ofidismo no Brasil, 2015.....	30
Quadro 2	Incidência de casos de ofidismo/ 100.000 habitantes notificados pelo SINAN, no Brasil, por região, no período de 2011 a 2015.....	31
Gráfico 3	Notificação de acidente por gênero de serpentes no Brasil no período de 2011 a 2015.....	32
Quadro 3	Quadro 3. Notificação de óbitos, acidentes e letalidade por tipo de serpente no Brasil, no período de 2011 a 2015.....	32
Quadro 4	Quadro 4. Soroterapia recomendada em função das manifestações clínicas do paciente e gravidade do acidente botrópico.....	36
Quadro 5	Faixas de categorias do Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) para a classificação toxicológica no ensaio de toxicidade oral aguda segundo a diretriz OECD nº 423.....	42
Figura 1	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade oral aguda com dose de entrada de 5 mg/kg.....	42
Figura 2	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade oral aguda com dose de entrada de 50 mg/kg.....	43
Figura 3	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade oral aguda com dose de entrada de 300	

	mg/kg.....	44
Figura 4	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade oral aguda com dose de entrada de 2000 mg/kg.....	45
Quadro 6	Faixas de categorias GHS para ensaio de toxicidade dérmica aguda segundo a diretriz OECD nº 434.....	46
Figura 5	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 50 mg/kg no estudo inicial	47
Figura 6	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 200 mg/kg no estudo inicial	47
Figura 7	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 1000 mg/kg no estudo inicial.....	48
Figura 8	Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 2000 mg/kg no estudo inicial.....	48
Figura 9	Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 50 mg/kg no estudo principal.....	49
Figura 10	Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 200 mg/kg no estudo principal.....	49
Figura 11	Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 1000 mg/kg no estudo principal.....	50
Figura 12	Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 2000 mg/kg no estudo principal.....	50
Quadro 7	Classes de risco para agentes biológicos.....	54

Quadro 8	Categorias de Níveis de Biossegurança (NB) em laboratórios de acordo com os riscos dos agentes biológicos manuseados ¹	56
Quadro 9	Classes de Resíduos de Serviço de Saúde biológico (Grupo A) ...	58
Quadro 10	Esquema de diluições empregado no preparo das soluções de soro antibotrópico administradas no volume de 0,5 mL/animal no teste de determinação da potência do soro antibotrópico.....	66
Quadro 11	Preparo da solução do Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005) equivalente a 5DL ₅₀	66
Quadro 12	Esquema de diluições empregados no preparo das soluções de veneno Botrópico de Referência Nacional(BraBot/005) no ensaio para a determinação da dose letal média de BraBot/005.....	67
Figura 13	Tricotomia da região dorsal dos animais nos ensaios de toxicidade dérmica aguda.....	71
Figura 14	Preparação com esparadrapo para adesão das compressas de gaze embebidas em solução.....	72
Figura 15	Grupo experimental de camundongos após 14 dias de observação administrado com dose única de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade oral aguda.....	81
Figura 16	Planilha de acompanhamento diário de camundongos machos Swiss Webster durante 14 dias do grupo controle (C) administrado com solução salina no teste de toxicidade oral aguda com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005.....	81
Figura 17	Planilha de acompanhamento diário de camundongos machos Swiss Webster durante 14 dias do grupo E administrado com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade oral aguda.....	82
Figura 18	Planilha de acompanhamento diário de camundongos fêmeas Swiss Wbebster durante 14 dias do grupo E administrado com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade dérmica aguda.....	86
Figura 19	Planilha de acompanhamento diário de camundongos fêmeas Swiss	

	Webster durante 14 dias do grupo controle (C) administrado com solução salina no teste de toxicidade dérmica aguda com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005.....	86
Figura 20	Grupo experimental de camundongos Swiss Webster fêmeas, após 24 horas de observação mostrando os animal E1 ao E0 em ordem crescente da esquerda para direita,administrados com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade dérmica aguda.....	87
Figura 21	Grupo experimental de camundongos Swiss Webster fêmeas, após 7 dias de observação mostrando os animal E1 ao E0 em ordem crescente da esquerda para direita, administrados com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade dérmica aguda.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Preparo da solução do Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005) baseado na média corporal de 3 camundongos Swiss Webster, machos, para as doses de 50, 300 e 2000 mg/kg do ensaio de toxicidade aguda oral 65
Tabela 2	Preparo da solução do Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005) baseado na média corporal de 5 dos camundongos Swiss Webster, fêmeas, para as doses de 1000 e 2000 mg/kg do ensaio de toxicidade aguda dérmica..... 65
Tabela 3	Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo controle (C) administrado com solução salina referente ao grupo E administrado com a dose de 50 mg/kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda..... 78
Tabela 4	Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo E administrado com a dose de 50 mg/Kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda..... 78
Tabela 5	Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo controle (C) administrado com solução salina referente ao grupo E administrado com a dose de 300 mg/kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda..... 79
Tabela 6	Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo E

administrado com a dose de 300 mg/Kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda.....

79

Tabela 7 Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo controle (C) administrado com solução salina referente ao grupo E administrado com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda..... 80

Tabela 8 Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo E administrado com a dose de 2000 mg/Kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda..... 80

Tabela 9 Área da superfície corporal total (ASCT) e peso (g) do camundongo Swiss Webster fêmea E administrado com a dose de 1000 mg/kg de BraBot/005 e camundongo fêmea C administrado com a solução salina no ensaio de toxicidade aguda dérmica..... 83

Tabela 10 Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo para cálculo da área da superfície corporal total (ASCT) e a relação de 10% da ASCT do grupo C (controle) administrado com solução salina no ensaio de toxicidade aguda dérmica..... 84

Tabela 11 Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo para cálculo da área da superfície corporal total (ASCT) e a relação de 10% da ASCT do grupo E (experimental) administrado com 2000 mg/kg de BraBot/005 no ensaio de toxicidade aguda dérmica..... 84

Tabela 12 Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo C (controle) administrado com solução salina no ensaio de toxicidade aguda dérmica..... 85

Tabela 13 Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo E (experimental) administrado com 2000 mg/kg de BraBot/005

	no ensaio de toxicidade aguda dérmica.....	85
Tabela 14	1º Ensaio da Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Amostras 3167/16 e 3168/16) e ensaio com dose equivalente a 5DL ₅₀ de BraBot/005 – Grupo Controle ¹ e Grupo Experimental ²	89
Tabela 15	2º Ensaio da Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Amostras 3639/16 e 3640/16) e ensaio com dose equivalente a 5DL ₅₀ de BraBot/005 – Grupo Controle ¹ e Grupo Experimental ²	89
Tabela 16	3º Ensaio da Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Amostra 3787/16) e ensaio com dose equivalente a 5DL ₅₀ de BraBot/005 – Grupo Controle ¹ e Grupo Experimental ²	90
Tabela 17	1º Ensaio da Determinação da Dose Letal Média do Veneno Botrópico de Referência BraBot/005 – Grupo Controle ¹ e Grupo Experimental ²	91
Tabela 18	2º Ensaio da Determinação da Dose Letal Média do Veneno Botrópico de Referência BraBot/005 – Grupo Controle ¹ e Grupo Experimental ²	91
Tabela 19	3º Ensaio da Determinação da Dose Letal Média do Veneno Botrópico de Referência BraBot/005 – Grupo Controle ¹ e Grupo Experimental ²	92
Tabela 20	1º Ensaio para avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico de referência BraBot/005 reconstituído na concentração de 1 mg/mL e do Liófilo do BraBot/005 - Grupo Controle e Grupo Experimental.....	93
Tabela 21	2º Ensaio para avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico de referência BraBot/005 reconstituído na concentração de 1 mg/mL e do Liófilo do BraBot/005 - Grupo Controle e Grupo Experimental.....	93
Tabela 22	3º Ensaio para avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico de referência BraBot/005 reconstituído na concentração de 1 mg/mL e do Liófilo do BraBot/005 - Grupo Controle e Grupo	

Experimental.....	93
-------------------	----

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANTT	Agência Nacional de Transporte Terrestre
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASCT	Área da Superfície Corporal Total
Ceua	Comissão de Ética no Uso de Animais
Ciats	Centros de Informação e Assistência Toxicológica
CBS	Comissão de Biossegurança em Saúde
Cm	Centímetro
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
Conama	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Concea	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPEA	Coordenação de Pesquisa e Experimentação Animal
DE ₅₀	Dose Efetiva Média
DGR	<i>Dangerous Goods Regulations</i>
DL ₅₀	Dose Letal Média
EPC	Equipamento de Proteção Coletiva
EPI	Equipamento de Proteção Individual
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Funed	Fundação Ezequiel Dias
FISPQ	Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
IATA	<i>International Air Transport Association</i>
IB	Instituto Butantan
IC	Intracerebral
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IM	Intramuscular
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
IVB	Instituto Vital Brazil
kDa	<i>KiloDalton</i>

LVBSH	Laboratório de Vacinas Bacterianas e Soros Hiperimunes
MSDS	<i>Material Safety Data Sheet</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
MTE	Ministério do Trabalho e Emprego
NBA-1	Nível de Biossegurança Animal 1
NBA-2	Nível de Biossegurança Animal 2
NBA-3	Nível de Biossegurança Animal 3
NBA-4	Nível de Biossegurança Animal 4
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/v	Parte por volume
PCMSO	Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional
PGRSS	Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde
PNI	Programa Nacional de Imunização
POP	Procedimento Operacional Padronizado
PPRA	Programa de Prevenção de Riscos Ambientais
PVC	Poli(Cloreto de Vinila)
Renaciat	Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica
rpm	Rotações por minuto
RSS	Resíduos de Serviço de Saúde
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SC	Subcutânea
SCTIE	Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
SDS/PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação

Sinitox	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
TAC	Teste Agudo de Classe
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Histórico.....	25
1.2 Epidemiologia.....	26
1.2.1 Epidemiologia do envenenamento ofídico no mundo.....	26
1.2.2 Epidemiologia do envenenamento por serpentes no Brasil.....	28
1.3 Envenenamento ofídico e tratamento.....	32
1.3.1 Composição geral dos venenos ofídicos.....	32
1.3.1.1 <i>Atividades tóxico-farmacológicas do veneno de Bothrops jararaca.....</i>	<i>33</i>
1.3.2 Tratamento com soros antipeçonhentos – “Soroterapia”.....	34
1.3.2.1 <i>Tratamento com o Soro Antibotrópico Pentavalente.....</i>	<i>35</i>
1.4 Controle da qualidade do soro antibotrópico.....	36
1.4.1 Veneno botrópico de referência nacional.....	36
1.4.2 Determinação da dose letal média (DL ₅₀) do veneno botrópico de referência nacional (BraBot/005).....	37
1.4.2.1 <i>Controle de estabilidade do veneno botrópico de referência nacional (BraBot/005).....</i>	<i>38</i>
1.4.3 Teste de potência do soro antibotrópico e determinação da dose efetiva média (DE ₅₀).....	38
1.5 Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) da OECD.....	39
1.5.1 Ensaio de toxicidade aguda oral segundo a diretriz OECD nº 423.....	40
1.5.2 Ensaio de toxicidade aguda dérmica segundo a diretriz OECD nº 434.....	46
1.6 Biossegurança.....	50
1.6.1 Tipos de riscos.....	52
1.6.1.1 <i>Riscos biológicos.....</i>	<i>53</i>
1.6.1.2 <i>Riscos químicos.....</i>	<i>54</i>
1.6.1.3 <i>Riscos físicos.....</i>	<i>55</i>
1.6.1.4 <i>Riscos de acidentes</i>	<i>55</i>

1.6.1.5 <i>Riscos de ergonômicos</i>	55
1.6.2 Biossegurança em laboratórios.....	55
1.6.3 Biossegurança em biotérios.....	56
1.6.4 Resíduos de Serviço de Saúde	57
1.6.4.1 <i>Gestão dos resíduos no INCQS</i>	60
2 JUSTIFICATIVA	62
3 OBJETIVOS	63
3.1 Objetivo geral	63
3.2 Objetivos específicos	63
4 METODOLOGIA	64
4.1 Preparo das soluções	64
4.2 Animais	67
4.3 Protocolo experimental	68
4.3.1 Ensaio para determinação da toxicidade aguda oral para o Veneno de Refência Nacional.....	68
4.3.2 Ensaio para determinação da toxicidade aguda dérmica para o Veneno de Refência Nacional.....	70
4.3.3 Ensaio para estabelecer os procedimentos para a manipulação e o tratamento dos resíduos do veneno botrópico, baseados nos ensaios de rotina do Setor de Soros Antipeçonhentos do INCQS.....	73
4.3.3.1 <i>Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 como resíduo do Ensaio de determinação de potência do soro antibotrópico</i>	73

4.3.3.2 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 como resíduo do Ensaio de Determinação da DL ₅₀ do Veneno Botrópico.....	74
4.3.3.3 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do veneno botrópico e de outros resíduos oriundos dos ensaios descritos no Ensaio de Determinação da Potência do Soro Antibotrópico e no Ensaio de Determinação da DL ₅₀ do Veneno Botrópico.....	75
4.4 Eutanásia dos animais.....	76
4.5 Exame anatomopatológico.....	76
4.5.1 Preparo histológico.....	77
5 RESULTADOS.....	78
5.1 Ensaio para determinação da toxicidade oral aguda do veneno botrópico de referência.....	78
5.2 Ensaio para determinação da toxicidade dérmica aguda para o veneno botrópico de referência.....	83
5.3 Avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico dos ensaios realizados no INCQS.....	88
5.3.1 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 para resíduos do Ensaio de Determinação de Potência do Soro Antibotrópico.....	88
5.3.2 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 para resíduos do Ensaio de Determinação da DL ₅₀ do Veneno Botrópico.....	90
5.3.3 Ensaio para determinação da inativação toxicológica do BraBot/005 e de outros resíduos oriundos dos ensaios descritos no Ensaio de Determinação da Potência do Soro Antibotrópico e no Ensaio de Determinação da DL ₅₀ do Veneno Botrópico.....	92
6 DISCUSSÃO.....	94
6.1 Considerações sobre a classificação oral aguda segundo a diretriz OECD Nº 423.....	95
6.2 Considerações sobre a classificação dérmica aguda segundo a diretriz OECD Nº 434.....	96

6.3 Considerações sobre a inativação da toxicidade do veneno botrópico.....	97
7 CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXO A – PERFIL ELETROFORÉTICO DO BRABOT/005.....	
107	
ANEXO B – CEUA.....	
108	
ANEXO C - DECLARAÇÃO DE REALIZAÇÃO DA NECROPSIA E PROCESSAMENTO DOS TECIDOS PELA CPEA/ICTB/FIOCRUZ.....	
109	
ANEXO D – LAUDO ANATOMOPATOLÓGICO DO ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA.....	
110	
ANEXO E – LAUDO ANATOMOPATOLÓGICO DO ENSAIO DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA.....	111
APÊNDICE A - PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS -14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA - GRUPO CONTROLE (C).....	112
APÊNDICE B - PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA - GRUPO EXPERIMENTAL (E).....	113
APÊNDICE C - PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS -14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA - GRUPO CONTROLE (C).....	114
APÊNDICE D - PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA - GRUPO EXPERIMENTAL (E).....	115

**APÊNDICE E – MANUAL DE BIOSSEGURANÇA PARA MANIPULAÇÃO E
DESCARTE DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NO ÂMBITO DO INCQS
- FIOCRUZ/RJ..... 116**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Os acidentes ofídicos representam um importante problema de saúde pública pela morbimortalidade que ocasionam desde o período pré-colonial. Os primeiros registros no Brasil foram realizados em 1560 por José de Anchieta, descrevendo importantes sinais clínicos e epidemiológicos, citada em sua carta escrita em São Vicente:

“E em primeiro lugar há diversos gêneros de cobras venenosas. Umas ,chamam-se jararaca, muitíssimo frequentes nos campos, nos matos e nas próprias casas, onde não raro as encontramos e cuja mordedura mata no espaço de vinte e quatro horas, se foram mordidos uma só vez e escapam à morte, mordidos daí por diante, não só não correm risco de vida, como até sentem menos dor.

Outro gênero se chama boicininga, isto é, ‘cobra que soa’ que tem na cauda um cascavel, que soa quando ataca alguma coisa. Quando mordem acabou-se: paralisam o ouvido, a vista, o andar e todos os movimentos. Há outras admiravelmente pintadas de diversas cores, negra, branca e vermelha, semelhante ao coral, que se chamam ibiboboca, estas são as mais peçonhentas de todas e, portanto, as mais raras” (CARDOSO et al., 2003).

Os acidentes ofídicos sempre estiveram no imaginário da população e aqueles acometiam principalmente trabalhadores agrícolas, ignorantes e analfabetos, que geralmente eram pobres e estavam permeados de credices, sendo um dos motivos para não impressionar de fato a opinião pública. Portanto, estes fatores não permitiam realizar uma estimativa precisa dos acidentes no país (CARDOSO et al., 2003).

No início do século XX, com base nos dados do Estado de São Paulo, estimava-se que ocorriam no país uma média anual de 4.800 óbitos e 19.200 acidentes ofídicos (BRAZIL, 1911). Atualmente a partir de dados estimados pelo Ministério da Saúde (MS), ocorreram em média, aproximadamente 26.000 casos/ano no Brasil de acidentes ofídicos, desde 2011, com aproximadamente 0,39% de óbitos e 1,72% de cura com sequela (PORTAL DA SAUDE, 2016a). Deste modo, pode-se inferir que os dados disponibilizados no início do século XIX estão

subestimados, devido à falta de registro eficaz de informação a época e considerando que o país era essencialmente agrícola e com pouca infraestrutura.

Apenas no século XX, após o início da produção de soro antiofídico no Brasil, foi realizado um estudo acerca dos acidentes ofídicos pelo Dr. Vital Brazil, a partir do envio de “Boletins para observação de acidentes ophídicos” juntamente com os frascos de soro, os quais deveriam ser respondidos e devolvidos aos laboratórios que produziam o soro. Esta estratégia foi utilizada pelo antigo “Instituto Serumtherápico do Estado de São Paulo”, atual Instituto Butantan (IB), e mais tarde pelo Instituto Vital Brazil (IVB) no Rio de Janeiro, possibilitando a produção de várias publicações sobre o ofidismo no Brasil, por quase cinco décadas (CARDOSO et al, 2003).

Mais do que propiciar o estudo do perfil epidemiológico do acidente, este boletim pode ser apontado como início dos Sistemas Nacionais de Informação que utilizamos atualmente no país. Quase todas as informações que contém no atual registro de notificação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), para Acidentes por Animais Peçonhentos, já constavam nesse boletim. Com isso, o atual IB foi o pioneiro no estudo do ofidismo, gerando resultados práticos capazes de garantirem em todo o país e até mesmo na América do Sul uma estratégia eficiente contra os acidentes ofídicos.

1.2 Epidemiologia

1.2.1 Epidemiologia do envenenamento ofídico no mundo

Aproximadamente 3.000 espécies de cobras existem no mundo e destas, aproximadamente 600 são venenosas, sendo 200 de interesse médico. As serpentes apresentam distribuição por quase todos os ambientes no globo terrestre, excetuando-se os ambientes congelados, algumas ilhas e regiões de altitudes elevadas, as quais impossibilitam a vida de vertebrados ectotérmicos (WHO, 2007; KASTURIRATNE et al., 2008).

O envenenamento ofídico representa um agravo à saúde importante em todo o mundo, sendo sistematicamente ignorado por inúmeras autoridades em vários países, constituindo-se uma doença tropical negligenciada (GUTIERREZ et al, 2006;

WHO, 2007, 2010). Cerca de 80% dos óbitos em decorrência dos acidentes com animais peçonhentos, são causados por serpentes, seguidas dos acidentes com escorpiões com 15% (CALVETE et al., 2009).

Recomendações estabelecidas pela *World Health Organization* (WHO, 2010), sugerem que para que haja a diminuição das morbidades e melhorias nas políticas públicas relacionadas aos acidentes ofídicos no mundo, é imperativo se que tenha um programa de formação de todo corpo médico para melhor interpretação dos casos de picadas de cobras, notificação obrigatória, levantamentos epidemiológicos confiáveis e implementação do uso da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde na sua 10ª Revisão (WHO, 2010).

A primeira estimativa de acidentes ofídicos e mortalidade no mundo foi relatada por Swaroop; Grab em 1954, reportando o número aproximado de 500.000 casos de envenenamento e 40.000 óbitos, excluindo países como a antiga União Soviética, a China e alguns países da Europa Central por não possuírem dados disponíveis (CHIPPAUX 1998a; GUTIERREZ et al., 2006).

Estudos apontam que ocorrem aproximadamente 5,5 milhões de acidentes ofídicos por ano no mundo. Estima-se aproximadamente a incidência de 1,8 milhões de envenenamentos, 94.000 óbitos e 375.000 sequelas graves e permanentes por ano. A incidência é maior no Sul e Sudeste Asiático e no Leste Subsaariano da África, respectivamente (KASTURIRATNE et al., 2008).

Estes números, provenientes de registros hospitalares e estatísticas de atendimento médico, estão provavelmente subestimados, uma vez que a maior parte dos acidentes ofídicos ocorre em áreas rurais de países pobres sem recursos, ou seja, com infraestrutura deficiente. Muitas vítimas não têm acesso a qualquer assistência, optando por remédios tradicionais e, eventualmente, muitos vêm a óbito antes de chegar a um hospital, além da escassez de antivenenos (soros antiofídicos). Desta forma, ocorre inconsistências no sistema de notificação de acidentes (GUTIERREZ et al., 2006; WHO, 2007; CHIPPAUX, 2008; KASTURIRATNE et al., 2008).

Há relatos que apenas 8,5% e 27% das vítimas de acidentes ofídicos na Nigéria rural e no Quênia, respectivamente, procuraram algum tipo de assistência (KASTURIRATNE et al., 2008).

As espécies de importância médica na América do Sul da família Viperidae são: *Bothrops alternatus*, *Bothrops asper*, *Bothrops atrox*, *Bothrops bilineatus*, *Bothrops brazili*, *Bothrops diporus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops matogrossensis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops pictus*, *Bothrops venezuelensis*; *Crotalus durissus*; *Lachesis muta* (WHO, 2010).

1.2.2 Epidemiologia do envenenamento por serpentes no Brasil

No Brasil existem 392 espécies de serpentes, das quais 76 são peçonhentas (SBH, 2015). Este termo refere-se ao animal que possui veneno e tenha algum mecanismo que permita a inoculação deste em outro organismo. Neste sentido, temos cobras, taxonomicamente descritas na Classe dos répteis e Subordem serpentes, que possuem veneno e não são peçonhentas. Apenas as famílias *Elapidae* e *Viperidae* são peçonhentas, tendo 40 e 36 espécies, respectivamente, com ocorrência no Brasil (BERNARDE, 2014; SBH, 2015).

Devido ao clima tropical, há uma presença expressiva na biodiversidade de animais ectotérmicos, permitindo com que o Brasil detenha a terceira maior riqueza de répteis do mundo (SBH, 2015).

As notificações sobre os acidentes ofídicos tornaram-se obrigatórias desde 1988/89, possibilitando uma melhor avaliação dos envenenamentos por serpentes no Brasil (MISE et al., 2007). A notificação compulsória imediata deve ser realizada em até 24 horas pelo responsável do local onde foi prestado o serviço assistencial ou pelo profissional de saúde, comunicando à Secretaria Municipal de Saúde (SMS) no caso de acidente com animais peçonhentos (BRASIL, 2017b).

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), criado em 1980 a partir da necessidade de um sistema de informação toxicológica e farmacológica de abrangência nacional, tem como principal atribuição a coordenação das coletas de dados e informações, a compilação, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento, anualmente, notificados no país. Os Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Ciats), quando integrantes da Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Renaciat), têm a função de disponibilizar ao Sinitox os registros das informações. Entretanto, houve uma menor participação dos Ciats nos levantamentos realizados pelo Sinitox, sugerindo assim a menor ocorrência de dados no Brasil (SINITOX,

2017). No entanto, segundo os últimos dados disponíveis no Sinitox em 2013, (Quadro 1), as intoxicações em humanos decorrentes de acidentes com animais peçonhentos representam a segunda maior causa de envenenamento, com 20,91% dos casos notificados no sistema, perdendo apenas para a intoxicação medicamentosa que representou 28,45% das notificações, sendo os números absolutos expressivamente elevados levando em consideração que houve subnotificações (SINITOX, 2016).

Quadro 1 - Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico no Brasil em 2013.

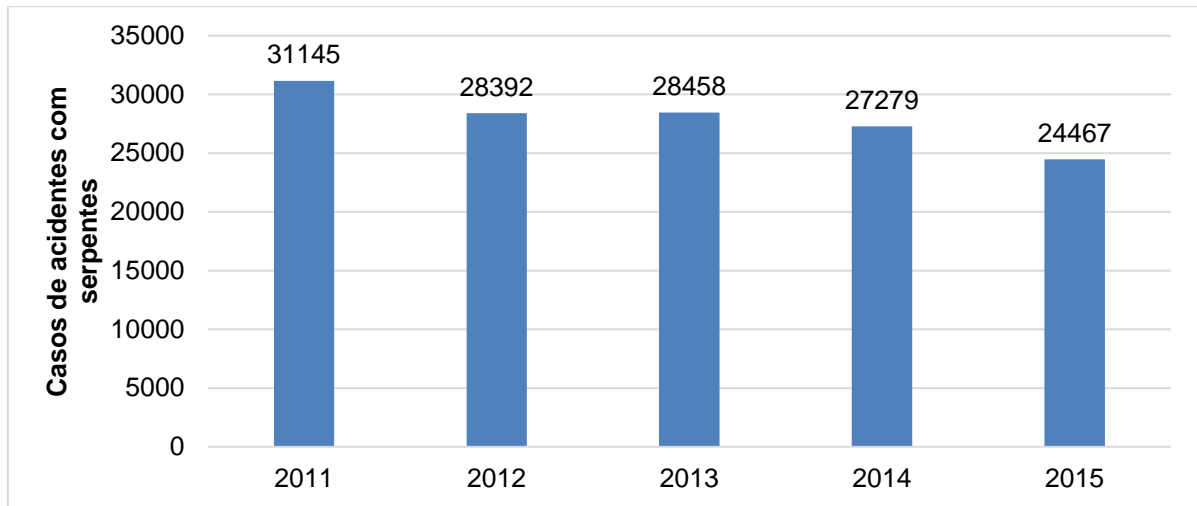
Agente	Número de casos	Freq. Relat. (%)
Medicamentos	11.985	28,45
Animais Peçonhentos/Serpentes	983	2,33
Animais Peçonhentos/Aranhas	774	1,84
Animais Peçonhentos/Escorpiões	5.903	14,01
Outros animais Peçonhentos/Venenosos	1.148	2,73
Drogas de Abuso	4.334	10,29
Domissanitários	3.601	8,55
Animais não peçonhentos	3.063	7,27
Produtos Químicos Industriais	2.420	5,74
Agrotóxicos/ Usos Agrícola	1.907	4,53
Agrotóxicos/ Usos Doméstico	967	2,30
Raticidas	1.126	2,67
Cosméticos	636	1,51
Alimentos	538	1,28
Plantas	441	1,05
Produtos Veterinários	307	0,73
Metais	157	0,37
Desconhecido	1.229	2,92
Outros	609	1,45
Total	42.128	100

Fonte: (Adaptado de SINITOX, 2016).

Dados mais recentes disponíveis no Portal da Saúde do MS (Gráfico 1) apontam que no ano de 2015 ocorreram 24.467 acidentes com serpentes no Brasil, representando uma incidência de 13,3 casos por 100.000 habitantes. Entretanto, esse número de notificações vem diminuindo a cada ano, desde 2011 com o registro

de 31.145 casos e uma incidência de 16,2 acidentes por 100.000 habitantes (PORTAL DA SAUDE, 2016a)

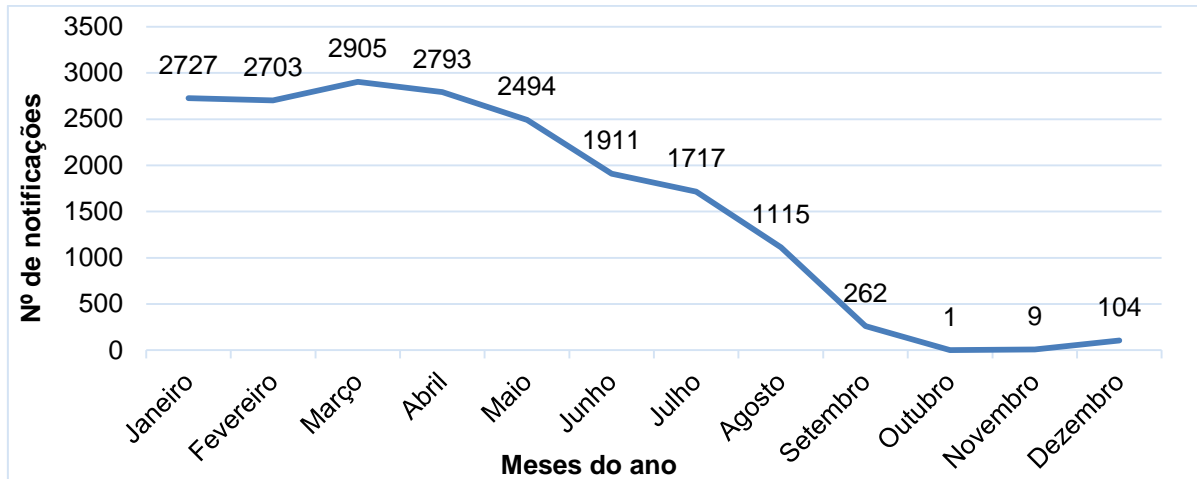
Gráfico 1 - Números de casos de ofidismo no Brasil entre 2011 e 2015.



Fonte: (Adaptado do Portal da Saúde, 2016a).

Os casos de ofidismo no Brasil apresentam um aumento da atividade de 40% nos meses de verão devido aos fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos rurais (PORTAL DA SAUDE, 2016b), conforme demonstrado no Gráfico 2, ocorrendo um decréscimo significativo em outras estações do ano conforme dados disponíveis no SINAN referente ao ano de 2015 (SINAN, 2016). A maior prevalência ocorre nas crianças e trabalhadores agrícolas jovens, do sexo masculino, representando desta forma um importante agravo à saúde e também um fator considerável na economia, pois muitas vezes os envenenamentos deixam sequelas físicas e psicológicas incapacitantes para retornar ao trabalho (GUTIERREZ et al., 2006; WHO, 2007).

Gráfico 2 - Distribuição mensal dos casos de ofidismo no Brasil em 2015.



Fonte: (Adaptado SINAN, 2016).

Existe uma variação significativa com relação à incidência nos acidentes com animais peçonhentos nas regiões brasileiras, com registros mais elevados na região Norte e Centro-Oeste. A região Norte manteve-se com uma incidência alta e apresentou uma discreta diminuição entre 2011 a 2015 (menos de 5% em relação a 2011) e nas demais regiões apresentaram uma diminuição de até 30% no mesmo período aproximadamente, sugerindo uma fuga do trabalhador rural do campo ou pelas campanhas de conscientização quanto ao risco envolvendo esse público (Quadro 2).

Quadro 2 - Incidência de casos de ofidismo/ 100.000 habitantes notificados pelo SINAN, no Brasil, por região, no período de 2011 a 2015.

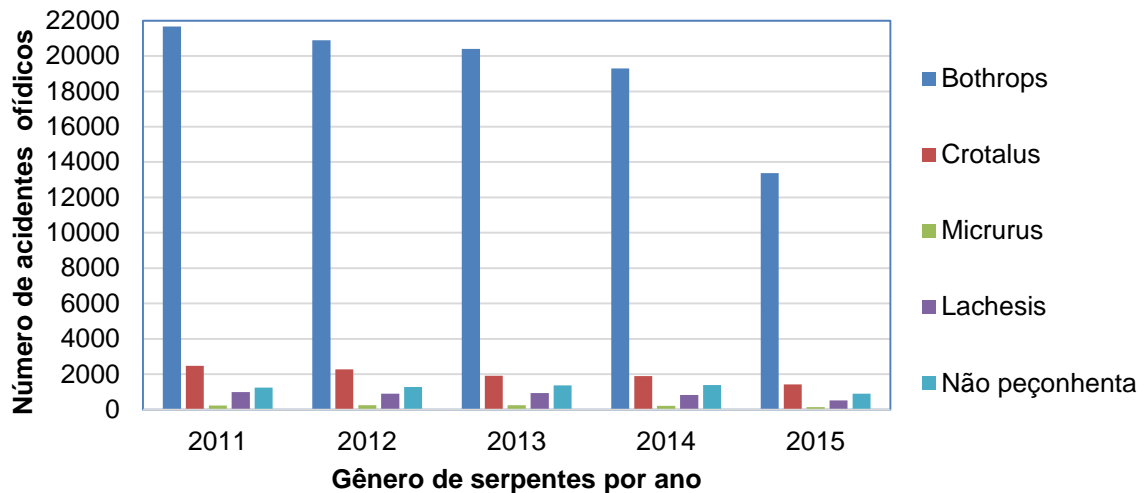
Região Geográfica	2011	2012	2013	2014	2015
	Número de casos de ofidismo/ 100.000 habitantes				
Região Norte	58,0	54,8	57,3	56,1	55,4
Região Nordeste	15,5	12,6	11,5	11,0	11,0
Região Sudeste	9,3	8,7	8,4	7,1	7,1
Região Sul	9,7	8,8	8,1	8,5	8,4
Região Centro-Oeste	23,4	21,4	19,0	18,9	18,6
Brasil	16,2	14,6	14,2	13,5	13,3

Fonte: (Adaptado de PORTAL DA SAÚDE, 2016b).

A maior ocorrência de acidentes ofídicos de importância médica no Brasil pertence às serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae), sendo responsáveis

por 81,7% dos casos, seguido das serpentes do gênero *Crotalus* com 8,53%, *Lachesis* com 4,18% e *Micrurus* com 1,07%, entre 2011 e 2015 (Gráfico 3). Acidentes com cobras não peçonhentas, correspondem a apenas 4,52%.

Gráfico 3 - Notificação de acidente por gênero de serpentes no Brasil no período de 2011 a 2015.



Fonte: (Adaptado de SINAN, 2016).

Apesar da serpente do gênero *Bothrops* apresentar uma grande incidência a letalidade é relativamente baixa (0,4%) em relação aos outros gêneros (Quadro 3).

Quadro 3 - Notificação de óbitos, acidentes e letalidade por tipo de serpente no Brasil, no período de 2011 a 2015.

Gênero de serpente	Número de óbitos	Número de Acidentes	Letalidade (%)
<i>Bothrops</i>	384	95635	0,4
<i>Crotalus</i>	103	9985	1,03
<i>Micrurus</i>	1	1070	0,09
<i>Lachesis</i>	31	4178	0,74

Fonte: (Adaptado de SINAN, 2016).

1.3 Envenenamento ofídico e tratamento

1.3.1 Composição geral dos venenos ofídicos

As serpentes possuem um sistema anatômico especial responsável pela produção (glândulas exócrinas) e inoculação do veneno (CALVETTE et al., 2009). Os venenos são constituídos por misturas complexas de proteínas e peptídeos, com diversas atividades biológicas. Apresentam ainda em sua composição cátions metálicos (Sódio, Zinco e Cálcio), nucleosídeos, carboidratos – na forma de glicoproteínas – aminoácidos, lipídios e metaloproteinases dependentes de zinco e cálcio. As proteínas representam cerca de 95% do peso seco, do veneno (MARKLAND, 1998).

As proteínas são basicamente divididas em toxinas e enzimas com base nas propriedades farmacocinéticas relacionadas à soroterapia. As toxinas possuem massa molecular variável, geralmente inferior a 30 kDa, ligando-se a receptores específicos, podendo ter especificidade neurológica, cardiovascular ou muscular, sendo o efeito farmacológico proporcional ao número de receptores. As enzimas, geralmente de massa molecular superior às toxinas, apresentando propriedades catalíticas. Primeiro, os produtos da degradação, mesmos que tóxicos, não apresentam efeitos imunogênicos ao organismo envenenado e, em segundo, farmacologicamente são mais dependentes do tempo de reação enzimática (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998b).

1.3.1.1 *Atividades tóxico-farmacológicas do veneno de Bothrops jararaca*

As principais atividades tóxico-farmacológicas dos venenos botrópicos incluem danos ao tecido local, caracterizados por processos inflamatórios agudos, inchaço, bolhas, hemorragia, necrose do músculo esquelético devido a ação de fosfolipases A2 e metaloproteinases dependentes de zinco. Tais efeitos tendem a se desenvolver abruptamente, conseqüentemente, uma demora na assistência médica pode resultar em danos irreversíveis ao tecido, levando a uma invalidez permanente (GUTIERREZ et al., 2006).

Além dos efeitos locais, as manifestações sistêmicas induzidas pelo veneno incluem hemorragia espontânea, hemorragia cerebral, disseminada coagulação intravascular, choque cardiovascular secundário, hipovolemia, vasodilatação e efeitos diretos no músculo do coração. Além disso, pode ocorrer insuficiência renal

aguda, em decorrência da presença das fosfolipases A2 que causam a rabdmiólise, insuficiência respiratória aguda e síndrome do desconforto (GUTIERREZ et al., 2006).

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS/PAGE) com gradiente de 7,5% a 17,5%, corado por Azul de Coomassie - do veneno botrópico de referência nacional BraBot/005 de *Bothrops jararaca* mostra a presença de 12 bandas de proteínas, sendo predominantes 5 bandas de pesos moleculares de 62, 32, 28, 18 e 14,4 kDa (ANEXO A) (INCQS, 2014).

1.3.2 Tratamento com soros antipeçonhentos – “Soroterapia”

Em paradoxo com muitos outros problemas de saúde, os casos de óbitos por envenenamento oriundos de acidentes por animais peçonhentos podem ser totalmente reversíveis, existindo assim um tratamento eficaz a partir da utilização de antivenenos, ou seja, soro específico para cada caso. Estes soros estão inseridos na Lista da Organização Mundial da Saúde (OMS) de Medicamentos Essenciais, sendo preconizado utilizá-los nos cuidados iniciais dos agravos à saúde ocasionados por animais peçonhentos (WHO, 2017).

A descoberta da soroterapia no mundo data de mais de um século. Surgiu a partir de experimentos realizados com pombos expostos ao veneno de *Sistrurus catenatus* (cascavel pigmeu), que demonstrou a resistência ao desafio de seis doses letais deste veneno. A partir destes, outros estudos e protocolos foram realizados por Calmette em Saygon – Vietnã e pelo Instituto Pasteur, em Paris – França, até que foi observado a atividade terapêutica do soro produzido a partir das imunizações. Calmette foi o pioneiro na produção de antiveneno para os médicos usarem contra a picada de cobra indiana. Logo a seguir, outros cientistas começaram a desenvolver antivenenos (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998).

No Brasil, os soros antipeçonhentos são produzidos por quatro laboratórios: IB, IVB, Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) e Fundação Ezequiel Dias (Funed), sob a forma de preparações líquidas injetáveis, a partir do plasma de equinos hiperimunizados com venenos específicos. Os seguintes soros hiperimunes são disponíveis: Soro Antibotóxico pentavalente (mistura de veneno de

B. jararaca 50%, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. neuwedi*, 12,5% cada), Soro anticrotálico (*C. durissus terrificus*), Soro antibotrópico-crotálico (*pool* do Soro Antibotrópico pentavalente com o Soro Anticrotálico), Soro antibotrópico-laquéutico (*pool* do Soro Antibotrópico pentavalente com *L. muta*), Soro anti-elapídico (*Frontalis micrurus*), Soro antiscorpiônico (*Tityus serrulatus*), Soro anti-aracnídico polivalente (*Tityus spp.*, *Phoneutria spp.* e *Loxosceles spp.*), Soro antiloxoscélico (*Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*), Soro antilatrodectico (*Latrodectus curacaviensis*) e Soro antilonômico (*Lonomia obliqua*). Estes antivenenos são distribuídos gratuitamente aos hospitais pelo Programa Nacional de Imunização (PNI) (ARAUJO et al., 2008).

1.3.2.1 Tratamento com o Soro Antibotrópico Pentavalente

A soroterapia deve ser conduzida em ambiente hospitalar pois pode ocasionar reações adversas graves, em decorrência da presença de proteínas heterólogas presentes na formulação do soro antibotrópico. Caso ocorra a reação adversa precoce (durante a infusão e nas duas primeiras horas subsequentes) é impreterível a interrupção da soroterapia e iniciar o tratamento. Caso evolua para um quadro de urticária generalizada, crise asmátiforme, edema de glote, colapso circulatório, perda de consciência, bradicardia, hipoxemia e choque anafilático, deve-se proceder a administração de adrenalina, corticosteroides e anti-histamínicos. Após a remissão do quadro de hipersensibilidade a soroterapia deverá ser reinstituída. As reações adversas podem ser classificadas em: (1) reações muito comuns, ocorrendo em 10% dos pacientes (inicia-se imediatamente e em até 24 horas da infusão do soro antibotrópico com sinais e sintomas como prurido, urticária, rubor facial, angioedema, exantema morbiliforme, taquicardia, rinorreia, espirros, tosse, náuseas, cólica abdominal e diarreia), (2) reações comuns, ocorrendo entre 1% a 10% dos pacientes (apresentam reações benignas locais como dor, edema, hiperemia e equimose, além de reação tardia, após 5 a 24 dias após a infusão, como a Doença do Soro, caracterizada por febrícula, urticária, erupções cutâneas, comprometimento articular e raramente pode ocorrer vasculite e nefrite), (3) reações incomuns, ocorrendo entre 0,1% a 1% dos pacientes (como a reação pirogênica acompanhada de calafrios e sudorese) e (4) reações raras, ocorrendo entre 0,01% a 0,1% dos

pacientes (reações imediatas evoluindo a quadros graves como: palidez, edema de glote, dispneia, insuficiência respiratória com hipoxemia, taquicardia intensa, bradicardia, hipotensão arterial, evoluindo para síncope e choque, perda de consciência e colapso respiratório persistente) (SORO ANTIBOTRÓPICO, 2017).

As doses preconizadas dependem da gravidade do envenenamento botrópico, os quais são avaliados conforme as manifestações clínicas do paciente (Quadro 4).

Quadro 4 - Soroterapia recomendada em função das manifestações clínicas do paciente e gravidade do acidente botrópico

Manifestações e tratamento	Classificação		
	Leve	Moderada	Grave
Locais: Dor; Edema; Equimose.	Ausentes ou discretas	Evidente	Intensas
Sistêmicas: Hemorragia grave; Choque; Anúria.	Ausentes	Ausentes	Presentes
Soroterapia (nº de frascos/ampolas-10 mL/frasco)	2 a 4	4 a 8	12
Via de Administração	Intravenosa		

Fonte:(Adaptado de SORO ANTIBOTRÓPICO, 2017).

1.4 Controle da qualidade do soro antibotrópico

1.4.1 Veneno botrópico de referência nacional

O veneno de referência é uma mistura homogênea de venenos de serpentes *Bothrops jararaca*, obtidos a partir da distribuição geográfica da espécie que o compõe. O veneno botrópico de referência deve ser padronizado através da determinação da dose letal média (DL₅₀) ou dose de veneno que leva a óbito 50% dos animais, no caso, camundongos da linhagem Swiss Webster. O valor de DL₅₀ obtido é utilizado nos ensaios de determinação da potência dos soros produzidos pelos laboratórios produtores. O veneno de referência, assim como, as instruções para sua utilização são fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (BRASIL, 1996; BRASIL, 2010a).

Atualmente, é utilizado como veneno botrópico de referência nacional o lote 5 (BraBot/005), produzido a partir de 4.430 extrações de veneno da serpente *B. jararaca*, coletadas em várias regiões do Brasil (49,2% no estado de São Paulo, 24,2% no Espírito Santo, 15,6% em Santa Catarina, 10,1% no Paraná, 0,8% em Minas Gerais e 0,1% no Rio de Janeiro). Em 2003, foram produzidos um total de 4.398 frascos com aproximadamente 30 mg de veneno botrópico liofilizado e aferida uma DL_{50} de 47,8 $\mu\text{g}/0.5 \text{ mL}$ em camundongos Swiss Webster, 20 g de peso corpóreo, por via IP (limite inferior de 45,65 $\mu\text{g}/0.5 \text{ mL}$ e limite superior de 50,13 $\mu\text{g}/0.5 \text{ mL}$). Em um estudo interlaboratorial, em 2008, com a participação do IB, Funed, IVB e o INCQS, realizou-se uma reavaliação da potência do BraBot/005 e atribuiu-se o valor de 40,29 $\mu\text{g}/0.5 \text{ mL}$ (limite inferior de 39,46 $\mu\text{g}/0.5 \text{ mL}$ e limite superior de 41,46 $\mu\text{g}/0.5 \text{ mL}$), sendo utilizado até o momento (ARAUJO et al., 2008, 2017; INCQS, 2014).

Os venenos são liofilizados e mantidos a uma temperatura de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2010a). Para o controle da estabilidade do veneno são realizados no mínimo três ensaios anuais para a determinação da DL_{50} de modo a aferir sua potência (INCQS, 2017a).

1.4.2 Determinação da dose letal média (DL_{50}) do veneno botrópico de referência nacional (BraBot/005)

A determinação da DL_{50} do BraBot/005 é realizada em camundongos convencionais Swiss Webster, machos ou fêmeas, com massa corporal de 18 a 22 g através da inoculação de 0,5 mL de diferentes concentrações de veneno botrópico diluídos em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,85% (salina) por via intraperitoneal (IP).

A reconstituição do veneno em salina ocorre na proporção de 1:1, ou seja, 1 mg de veneno botrópico para 1 mL de salina. Utilizam-se cinquenta camundongos, separados em cinco grupos de dez animais, os quais recebem diluições de veneno utilizando a salina como diluente, sendo o fator de diluição entre grupos de 1:1,2, igualando-se os volumes finais. O cálculo da DL_{50} é realizado pelo método estatístico de probitos, através do *software* CombStats®, a partir do resultado do número de óbitos ocorridos 48h após a inoculação do veneno. O ensaio é

considerado válido se: (1) os óbitos verificados estiverem proporcionalmente relacionados às doses do veneno, (2) a regressão for altamente significativa com relação linear significativa e (3) se o valor da DL_{50} estiver compreendido entre os limites de confiança de 50% e 200% do valor nominal do veneno botrópico de referência. Os valores são espessos em microgramas de veneno por 0,5 mL (ARAÚJO et al., 2008, 2017; BRASIL, 2010a).

1.4.2.1 *Controle de estabilidade do veneno botrópico de referência nacional (BraBot/005)*

São realizados no mínimo três ensaios anuais para aferir a toxicidade do BraBot/005 ao longo do tempo. Os resultados são plotados em um gráfico de controle através do *software* SPC Explorer RT® (Quality America Inc), de modo que possa ser identificada qualquer alteração que inviabilize o seu emprego ou que possa ter alterado o atual valor da toxicidade do BraBot/005, $DL_{50}=40,29 \mu\text{g}/0.5 \text{ mL}/20 \text{ g}$ em camundongos Swiss Webster, por via IP (INCQS, 2017a).

1.4.3 *Teste de potência do soro antibotrópico e determinação da dose efetiva média (DE_{50})*

No controle da qualidade dos soros anti-peçonhentos produzidos no país, as amostras são encaminhadas ao INCQS na modalidade de análise de orientação. A quantidade de ampolas por lote (amostras) tem que ser suficiente para atender todos os testes que a legislação impõe, tais como: análise e avaliação do rótulo e embalagem, teste de pirogênio, esterilidade, potência e análises físico-químicas. O Departamento de Imunologia do INCQS é o responsável pela análise de protocolo, rótulo, embalagem e pela realização do teste de determinação de potência biológica (doseamento).

O teste de potência do soro antibotrópico tem como objetivo determinar a dose efetiva média (DE_{50}) do soro necessária para neutralizar a ação do veneno nos

animais testados, ou seja, dos efeitos letais de uma dose fixa do BraBot/005 (soroneutralização). O soro antibotrópico deve conter no mínimo, em cada mililitro, imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg de veneno botrópico de referência (BRASIL, 2010a).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010a):

O soro antibotrópico pentavalente é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com antígeno do gênero Bothrops, composto por venenos das serpentes Bothrops jararaca, Bothrops jararacussu, Bothrops moojeni, Bothrops alternatus, Bothrops neuwiedi. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia Soros hiperimunes para uso humano. Contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg de veneno de referência de B. Jararaca. (BRASIL, 2010a)

A DE_{50} do soro é determinada utilizando-se camundongos Swiss Webster, machos ou fêmeas, com massa corporal de 18 a 22 g a partir da inoculação, por via IP, de 0,5 mL de solução contendo soro antibotrópico e BraBot/005 em salina a quatro grupos com oito animais cada. A reconstituição do líofilo do veneno botrópico é realizada da mesma forma como no ensaio de DL_{50} , contendo como dose o equivalente a 5 DL_{50} /animal em todos os grupos. Neste ensaio, o soro antibotrópico é diluído na proporção de 1:1,3 em salina e adicionado o veneno na quantidade mencionada. Esta mistura é incubada por 60 min. a 37 °C. A DE_{50} é calculada pelo método estatístico padrão – probitos - através do *software* CombStats®, a partir do resultado de número de óbitos ocorridos 48h após a inoculação das 4 diferentes doses do soro antibotrópico. Paralelamente ao ensaio da determinação da potência do soro antibotrópico é realizado outro ensaio com 10 animais, para o controle positivo administrados com a dose equivalente a 5 DL_{50} /animal de BraBot/005 diluído em salina. O ensaio é considerado válido se: (1) o valor de proteção de 50% dos animais (DE_{50}) estiver compreendida entre a maior e a menor dose de diluição, (2) regressão altamente significativa com relação linear significativa e (3) se o ensaio do controle positivo for considerado válido, neste caso com número de óbitos acima de 80% (ARAUJO *et al*, 2008; BRASIL, 2010a).

1.5 Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) da OECD

A classificação da toxicidade aguda das substâncias deve ser obtida para determinar o potencial das substâncias causarem danos à saúde humana, principalmente sob o ponto de vista de letalidade ou toxicidade severa. Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) incorporou o Teste de DL₅₀ (OECD nº 401) em suas diretrizes e em 2002 o Conselho da OECD eliminou esta diretriz pois foi amplamente aceito que a precisão estatística, inclinação da curva dose-resposta, intervalo de confiança da DL₅₀ e sinais tóxicos não eram necessários para estabelecer a avaliação de risco (VALADARES, 2006)

O Teste de Toxicidade Agudo Oral pelo método Tóxico Agudo de Classe (TAC) – OECD nº 423 (OECD, 2001) e o Teste de Toxicidade Dérmica – procedimento de doses fixas (PDF) – OECD nº 434 (OECD, 2004) permitem a partir de doses fixas, classificar as substâncias químicas ou misturas de acordo com valores próximos aos obtidos no teste de DL₅₀, porém com número menor de animais, baseando-se na letalidade (VALADARES, 2006).

Os animais que estejam em sofrimento ou dor severa e morte iminente devem ser submetidos a eutanásia humanitária, classificando-os como óbitos decorrentes do ensaio, devendo ser avaliado por um médico-veterinário. São sinais evidentes para a realização da eutanásia: óbito previsível (incapacidade de chegar à água ou à comida, perda excessiva de peso, convulsões, tremores substanciais ou incapacidade de sobreviver mesmo após tratamento), dor intensa (automutilações, infecções locais, feridas abertas ou ulcerações na pele, diminuição da ingestão de alimentos, proteção das partes afetadas e aversão ou evasão ativa a estímulos), sofrimento (realizar uma analogia entre o sofrimento que acomete ao homem pela mesma condição que se encontra o animal) e angústia (mudança comportamental) (OECD, 2000).

A classificação toxicológica preconizada nas diretrizes 423 e 434 (categorias 1,2,3,4 e 5 do Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente -GHS) baseia-se em um procedimento passo-a-passo com um número mínimo de animais por etapa para obtenção de informação suficiente da toxicidade aguda e permitir a sua classificação. O grau maior de toxicidade está presente na menor categoria GHS 1,

por ser necessário uma quantidade menor da substância-teste para causar danos à saúde humana (OECD, 2001; OECD, 2004).

1.5.1 Ensaio de toxicidade aguda oral segundo a diretriz OECD nº 423

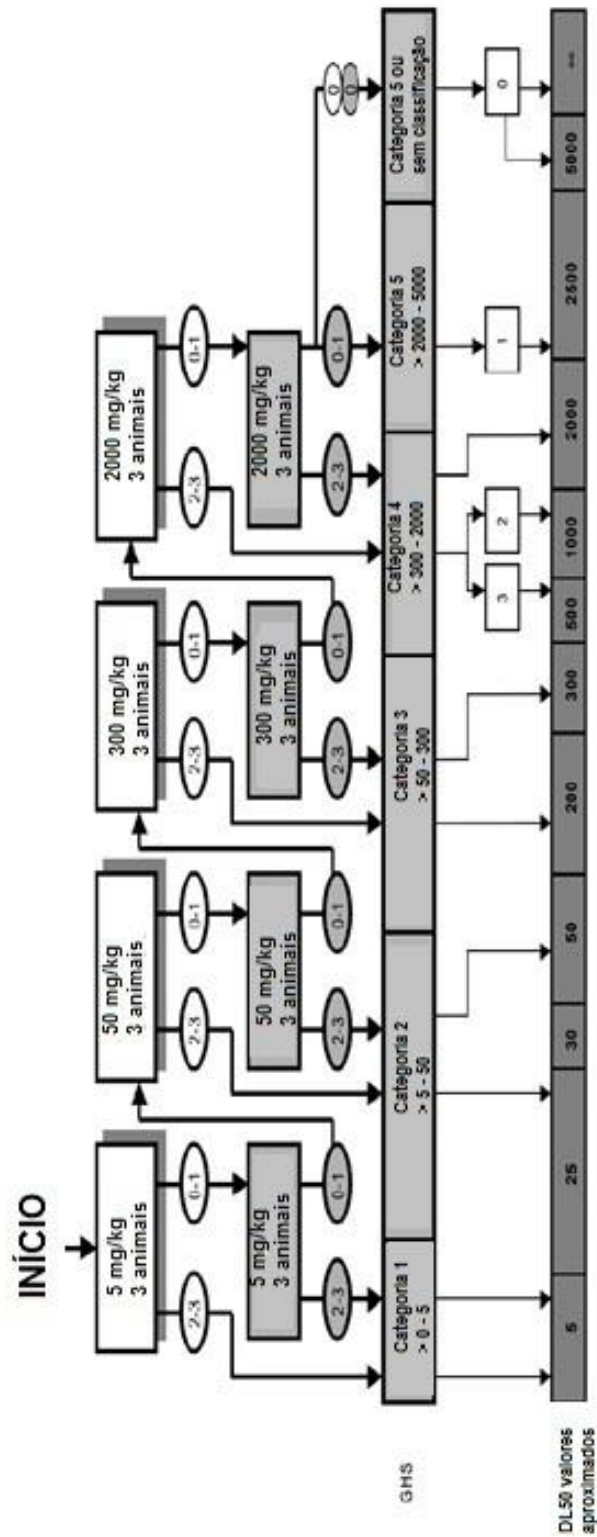
Para o ensaio de toxicidade oral aguda, baseado na diretriz da OECD nº 423 – *Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001), aprovado pela Portaria Normativa nº 18 de 24 de setembro de 2014 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) (BRASIL, 2014), são preconizadas dose de 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg por animal, preparadas no dia do ensaio levando em consideração a massa corpórea dos animais. O método baseia-se na observação do número de animais moribundos ou de óbitos para determinar sua classificação (Quadro 5), sendo utilizado apenas 3 animais por etapa (dose). Caso haja a presença de 2 ou 3 animais com sofrimento severo (moribundos) e/ou óbitos é imediatamente atribuída a classificação nesta etapa. Caso ocorra, como dose inicial de partida, apenas 1 óbito e/ou sofrimento severo ou nenhuma morte e/ou sofrimento severo, o teste prossegue administrando-se a dose subsequente (Figuras 1,2,3 e 4). A dose inicial deve ser escolhida conforme informações prévias existentes acerca da substância, caso não seja possível preconiza-se a dose de 300 mg/Kg.

Quadro 5 – Faixas de categorias do Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) para a classificação toxicológica no ensaio de toxicidade oral aguda segundo a diretriz OECD nº 423

Categorias	Faixas em mg/kg
1	> 0 – 5
2	> 5 – 50
3	>50 – 300
4	> 300 – 2000
5	> 2000 – 5000

Fonte: (Adaptado de OECD, 2001).

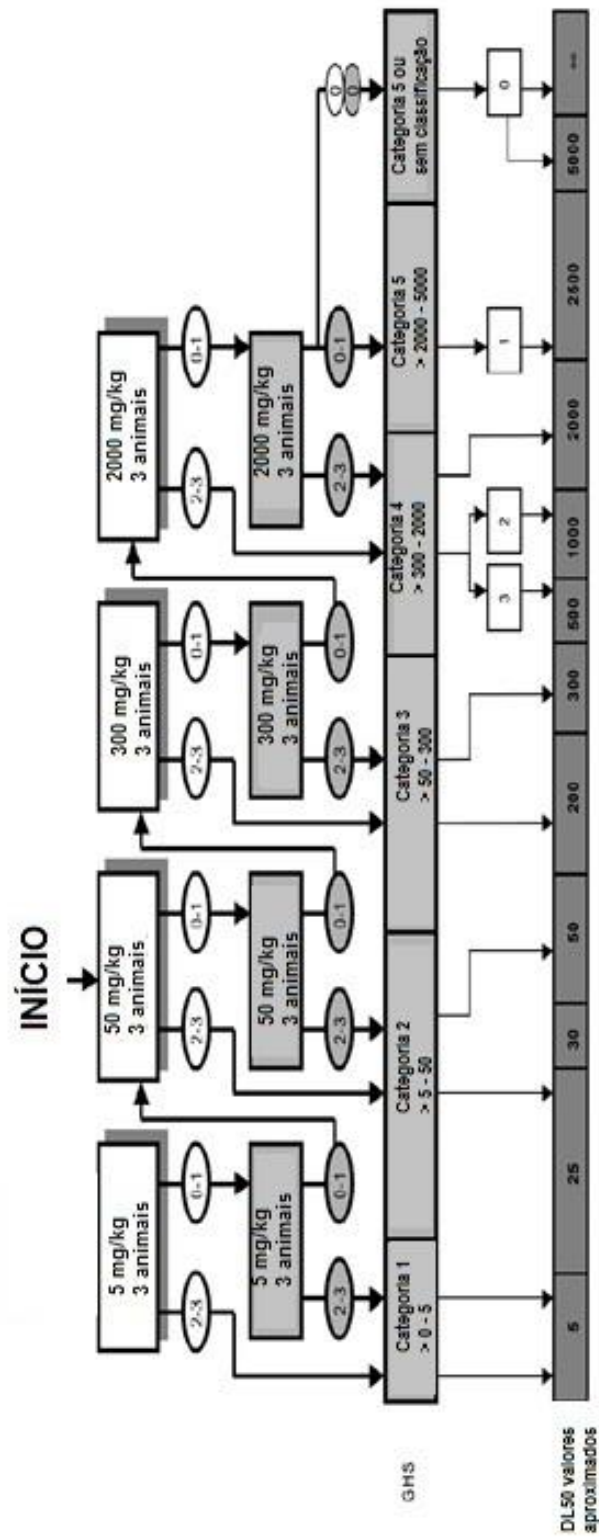
Figura 1 -
(GHS) na
da
aguda
entrada de



Sistema de
Classificação
Harmonizado
Globalmente
determinação
toxicidade oral
com dose de
5 mg/kg

Fonte: OECD, 2001).

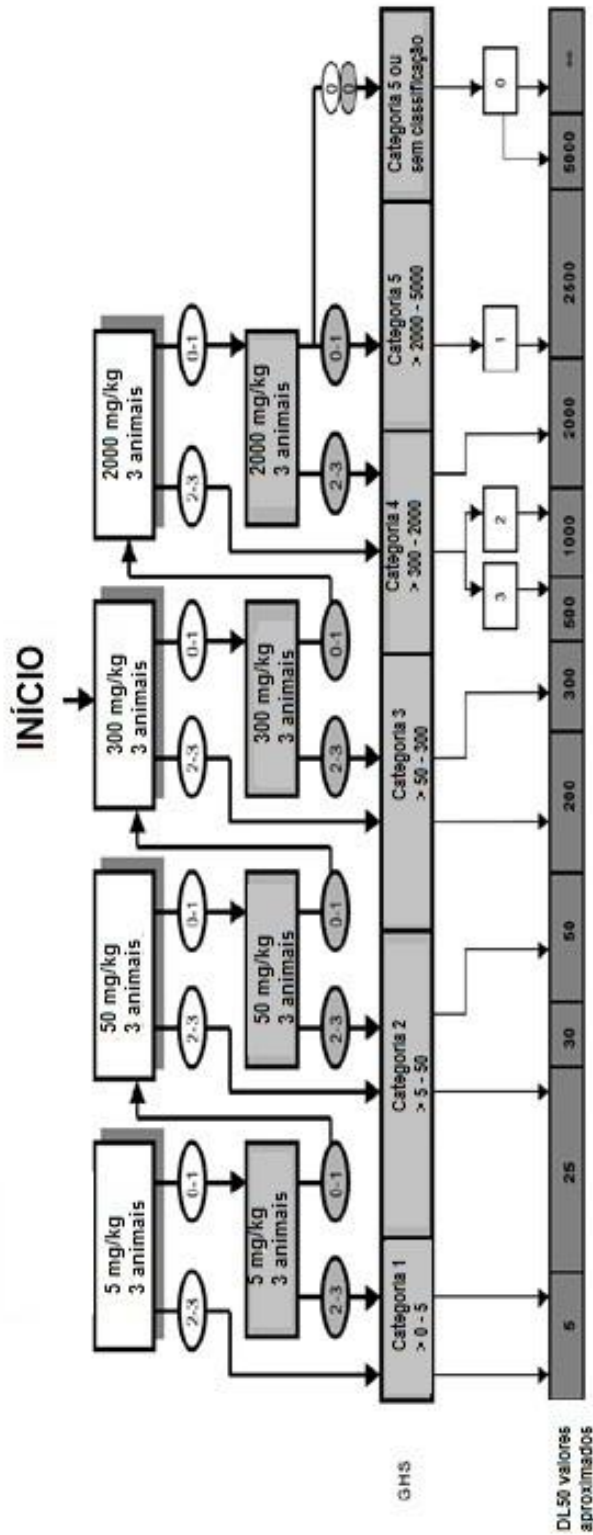
Figura 2 - Classificação Harmonizado Globalmente determinação toxicidade com dose de 50 mg/kg



(Adaptado de Sistema de (GHS) na da oral aguda entrada de

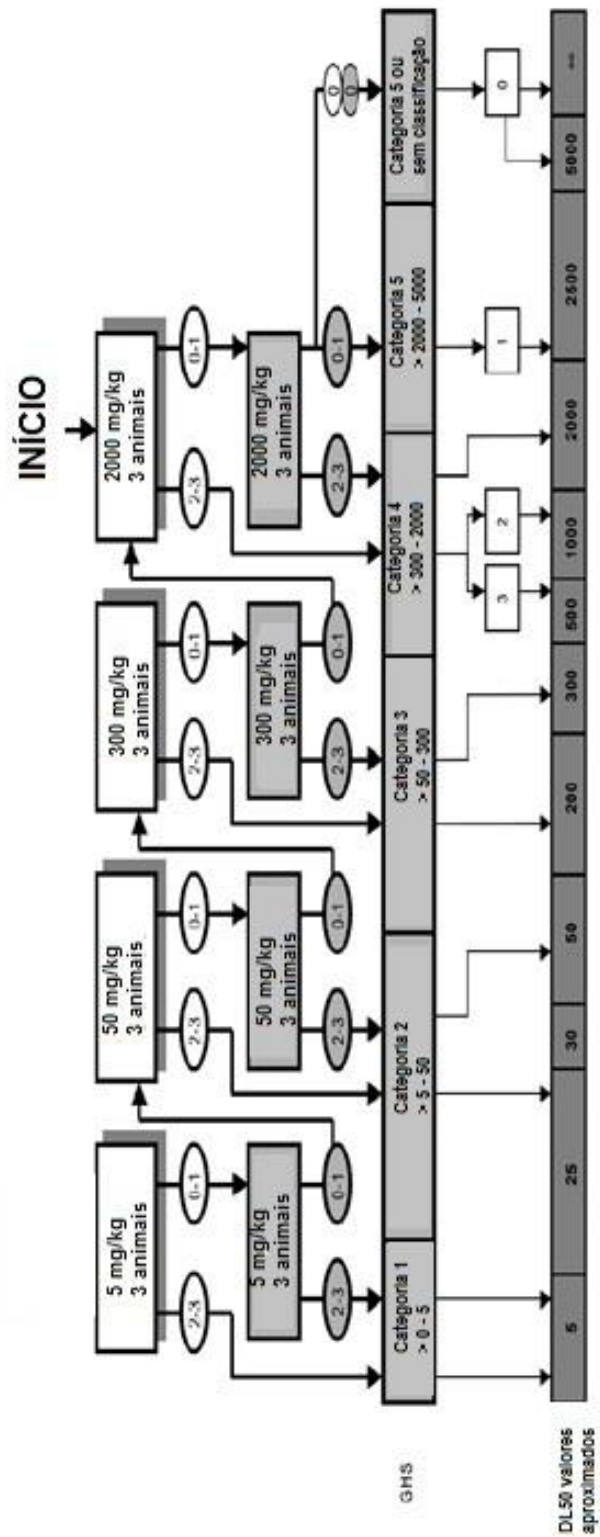
fonte: (Adaptado de OECD, 2001).

Figura 3 - Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade oral aguda com dose de entrada de 300 mg/kg



Fonte: (Adaptado de OECD, 2001).

Figura 4 - Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade oral aguda com dose de entrada de 2000 mg/kg



Fonte: (Adaptado de OECD, 2001).

1.5.2 Ensaio de toxicidade aguda dérmica segundo a diretriz OECD nº 434

Para o ensaio de toxicidade dérmica aguda, baseado na diretriz da OECD nº 434 – *Acute Dermal Toxicity – Fixed Dose Procedure* (OECD, 2004) são preconizadas doses de 50, 200, 1000 ou 2000 mg/kg por animal, preparadas no dia do ensaio levando em consideração a massa corpórea dos animais. O método baseia-se na observação do número de animais sem sinais evidentes de toxicidade ou o número de animais com sinais evidentes de toxicidade ou do número de óbitos para determinar sua classificação (Quadro 6), sendo utilizado no estudo inicial apenas 1 animal por etapa (Figuras 5, 6, 7 e 8) para seleção da dose inicial do estudo principal com 5 animais por etapa (Figuras 9, 10, 11 e 12). A dose inicial empregada deve ser escolhida conforme informações prévias existentes acerca da toxicidade da substância, caso não seja possível preconiza-se a dose de 1000 mg/Kg como dose inicial.

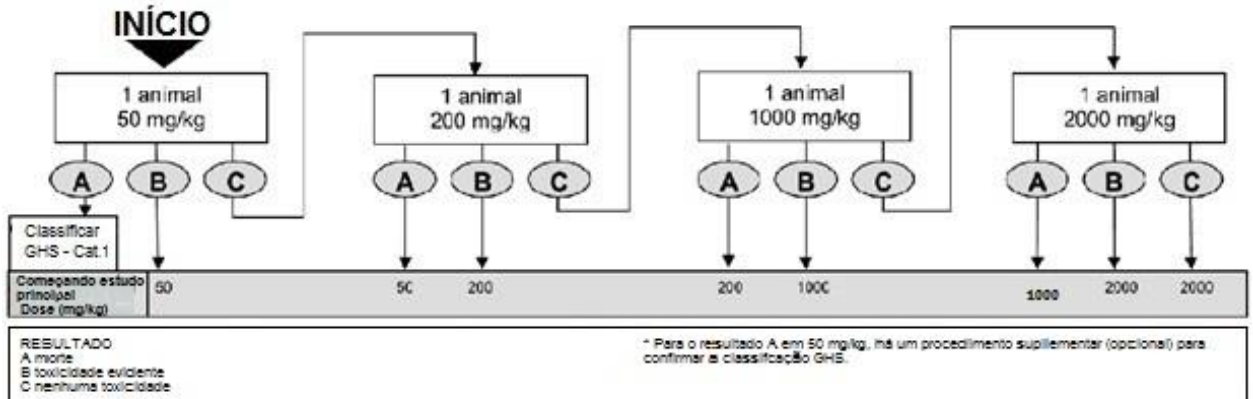
No ensaio para aferir a dose inicial podem ocorrer três situações distintas: (I) caso ocorra o óbito do animal, utiliza-se a dose anterior, (II) caso sejam evidentes os sinais de toxicidade utiliza-se a dose empregada para o ensaio no estudo principal com 5 animais e (III) caso não ocorra sinais evidentes de toxicidade, utiliza-se a dose subsequente com apenas 1 animal. No entanto, caso a dose inicial seja a menor possível (50 mg/kg) é atribuída a classificação 1. Porém, se for necessária a confirmação do resultado, faz-se novamente o ensaio com 1 animal que, (a) ocorrendo o óbito é definitivamente classificado na categoria 1 e (b) caso não ocorra o óbito, utilizam-se mais 3 animais em um terceiro ensaio, levando em consideração os resultados dos 2 ensaios anteriores, realizados com 1 animal cada, para compor o estudo principal com 5 animais (2 animais referentes aos dois ensaios e mais 3 animais referente ao terceiro ensaio).

Quadro 6 - Faixas de categorias GHS para ensaio de toxicidade dérmica aguda segundo a diretriz OECD nº 434

Categorias	Faixas em mg/kg
1	> 0 - 50
2	> 50 - 200
3	> 200 - 1000
4	> 1000 - 2000
5	> 2000 - 5000

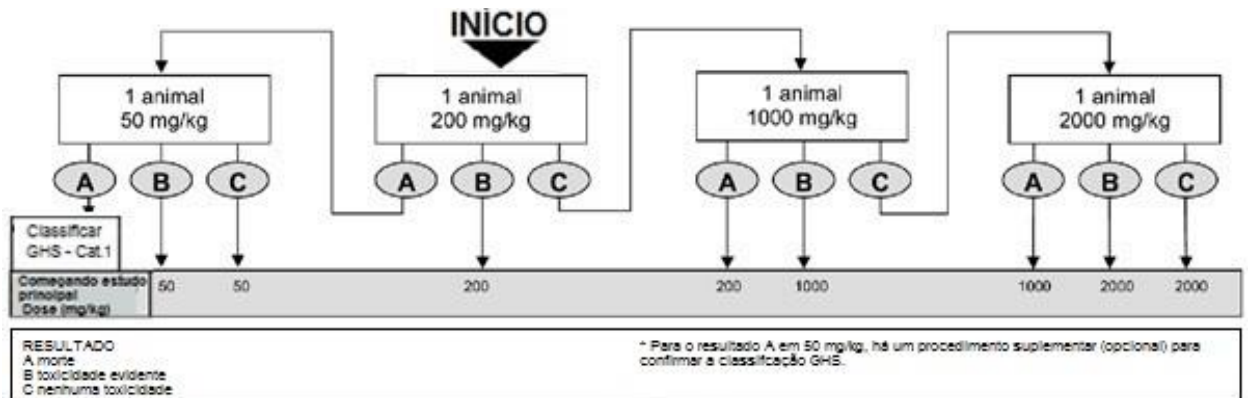
Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Figura 5 - Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 50 mg/kg no estudo inicial



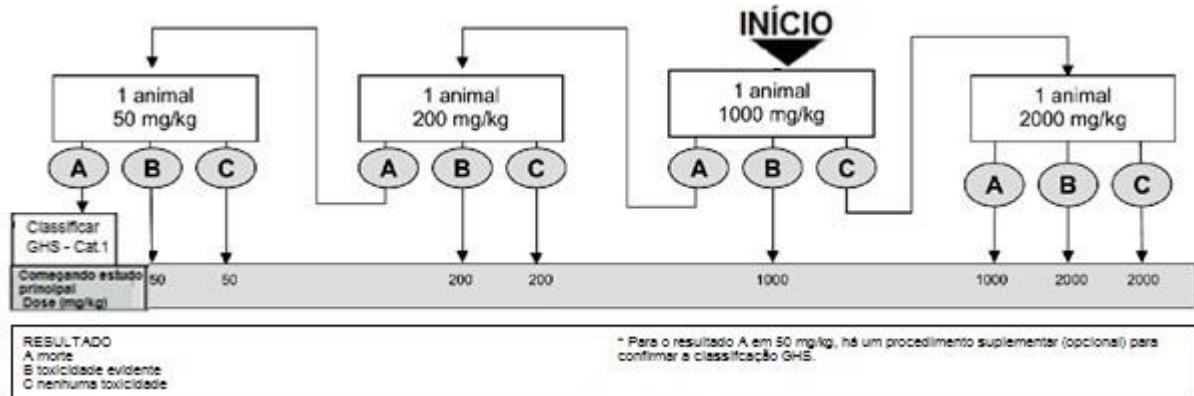
Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Figura 6 – Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 200 mg/kg no estudo inicial



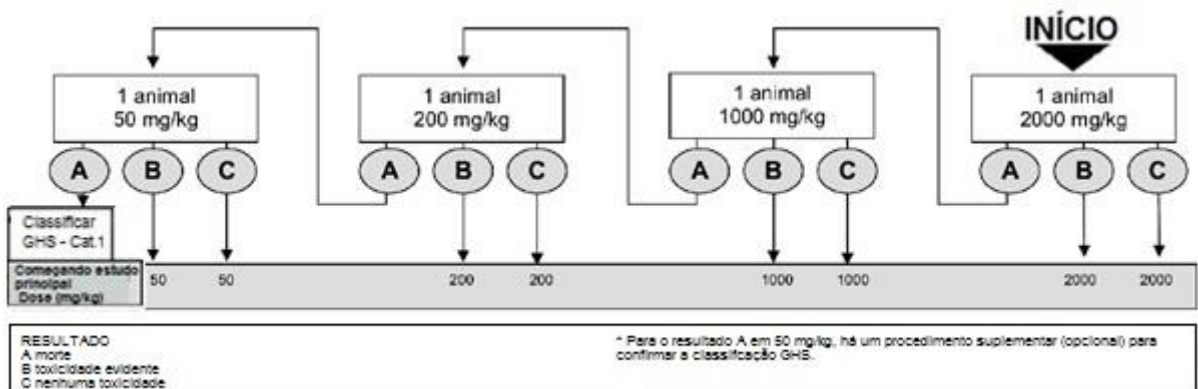
Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Figura 7 - Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 1000 mg/kg no estudo inicial



Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Figura 8 - Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) na determinação da toxicidade dérmica aguda, com dose de entrada de 2000 mg/kg no estudo inicial

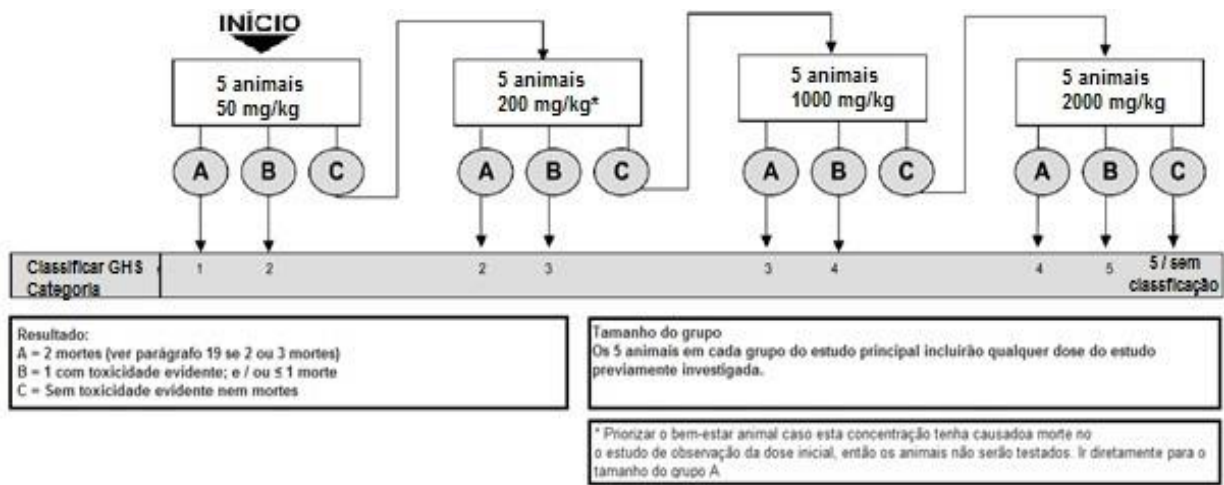


Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Após conhecida a dose de entrada do ensaio no estudo inicial, utilizam-se 5 animais, sendo contabilizado a utilização do animal proveniente do ensaio para estabelecer a dose inicial. Caso haja o óbito de 2 animais (resultado A), utiliza-se a dose anterior a que foi realizada o ensaio [no caso da dose inicial seja a menor dose - 50 mg/Kg - atribui-se a classificação 1 com 2 óbitos (resultado A), classificação 2 com 1 óbito e/ou 1 com sinal evidente de toxicidade (resultado B) ou na ausência de toxicidade evidente ou óbitos (C) utiliza-se a dose subsequente para avaliar a classificação em outro ensaio com 5 animais. Ressalta-se que nesta dosagem são levados em consideração os animais provenientes do ensaio com 1 animal e sua

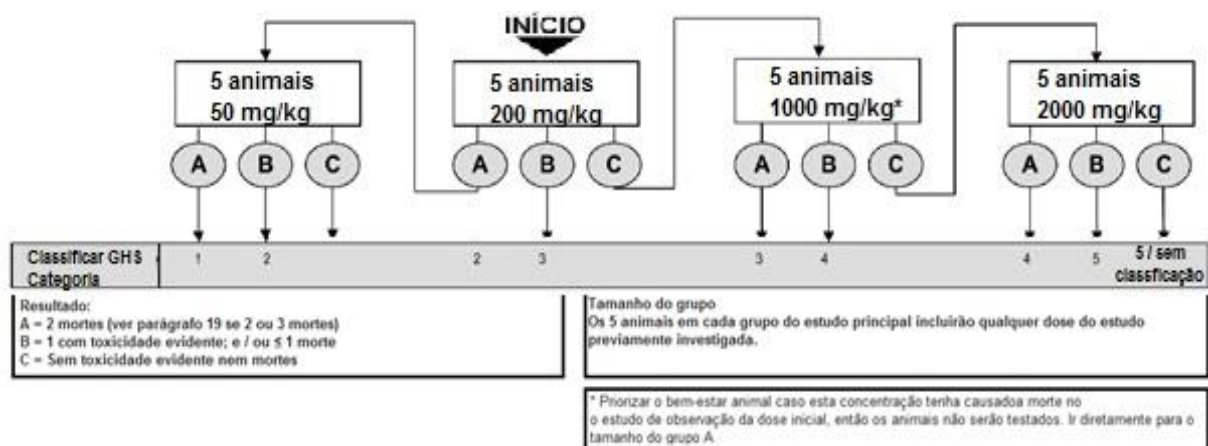
repetição, mencionadas no parágrafo anterior. No caso da presença de 1 animal com sinais evidentes de toxicidade e/ou o óbito de 1 animal (resultado B), classifica-se de acordo com a categoria da dose testada. Entretanto, não havendo animais com sinais de toxicidade (resultado C) é realizado outro ensaio com a dosagem superior à preconizada na diretriz (Figuras 9, 10, 11 e 12) (OECD, 2004).

Figura 9 - Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 50 mg/kg no estudo principal



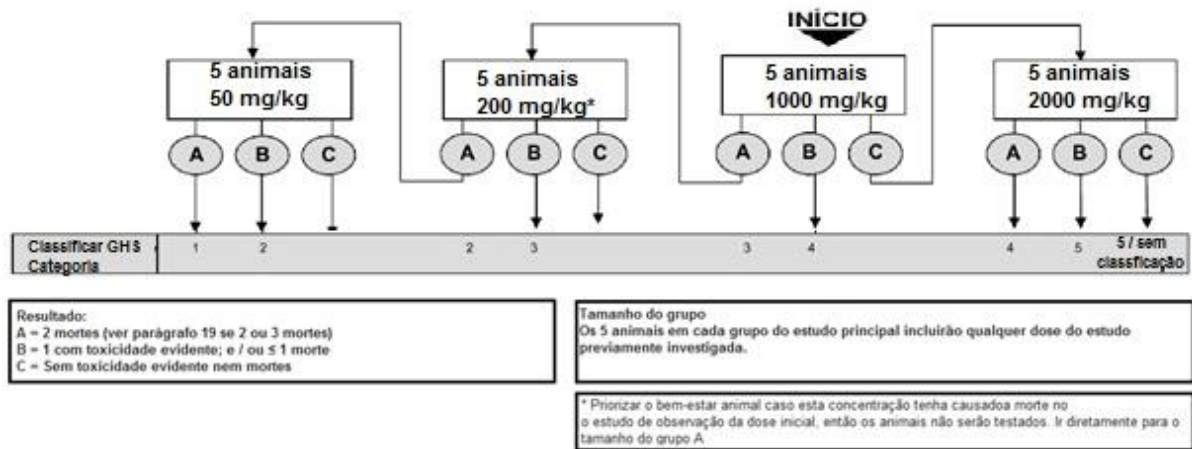
Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Figura 10 - Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 200 mg/kg no estudo principal



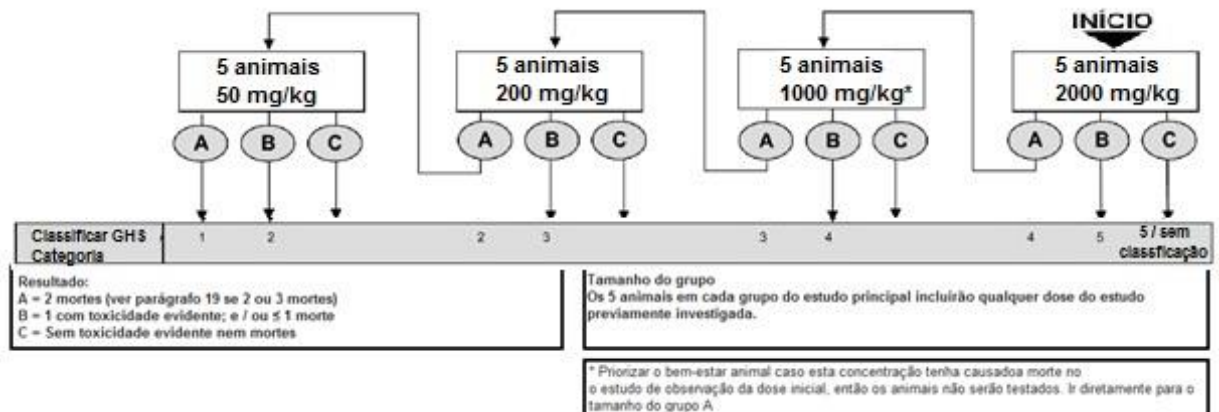
Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Figura 11 - Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 1000 mg/kg no estudo principal



Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

Figura 12 - Sistema de Classificação e Harmonização Globalizado, toxicidade dérmica aguda, com dose de estudo de 2000 mg/kg no estudo principal



Fonte: (Adaptado de OECD, 2004).

1.6 Biossegurança

A Comissão Técnica de Biossegurança da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 2005; *apud* SIMONETTI, 2014) define biossegurança como o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização, controle ou a eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos resultados.

A biossegurança está relacionada aos agravos proporcionados pelos agentes químicos, físicos, biológicos, ergonômicos e psicossociais, em ambientes de trabalho do campo da saúde em geral (BORBA et al., 2009). A Constituição Federal de 1988, no seu artigo nº 225 e Inciso primeiro estabelece que:

...Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

§ 1º - Para assegurar a efetividade desse direito, incumbe ao Poder Público:

I - preservar e restaurar os processos ecológicos essenciais e prover o manejo ecológico das espécies e ecossistemas;

II - preservar a diversidade e a integridade do patrimônio genético do País e fiscalizar as entidades dedicadas à pesquisa e manipulação de material genético;

III - definir, em todas as unidades da Federação, espaços territoriais e seus componentes a serem especialmente protegidos, sendo a alteração e a supressão permitidas somente através de lei, vedada qualquer utilização que comprometa a integridade dos atributos que justifiquem sua proteção;

IV - exigir, na forma da lei, para instalação de obra ou atividade potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, estudo prévio de impacto ambiental, a que se dará publicidade;

V - controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente;

VI - promover a educação ambiental em todos os níveis de ensino e a conscientização pública para a preservação do meio ambiente;

VII - proteger a fauna e a flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais a crueldade (BRASIL, 1988).

No Brasil, existem duas vertentes da biossegurança, sendo uma delas com fundamentação legal, ou seja, regulamentada pela Lei nº 11.105/05 que define os parâmetros quanto à manipulação de organismos geneticamente modificados

(OGM's) e de células tronco. A segunda, não regulamentada e denominada praticada, está voltada e relacionada aos riscos químicos, físicos, biológicos, ergonômicos e de acidentes encontrados nos ambientes laborais (BORBA et al., 2009; SIMONETTI, 2014), amparada principalmente pelas normas regulamentadoras não específicas como do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE), Resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), entre outras.

Os acidentes e doenças decorrentes do ambiente laboral constituem um problema de saúde considerável em todo o mundo e, historicamente, os trabalhadores da área da saúde não eram percebidos como profissionais de alto risco. Estudos realizados nas últimas três décadas demonstraram dados alarmantes quanto aos acidentes de trabalho e doenças ocupacionais nesta categoria de trabalhadores, uma vez que são expostos a inúmeros riscos, como: físicos, químicos, biológicos, ergonômicos, psicossociais e acidentes (BRASIL, 2010b).

Medidas de segurança e proteção à saúde dos trabalhadores ligados aos serviços de laboratório, bem como de promoção e assistência à saúde devem ser direcionadas onde houver qualquer probabilidade de exposição aos riscos citados. Essas medidas perpassam por ações do Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA) e do Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), os quais determinam as medidas de prevenção necessárias para minimização dos riscos, como: utilização adequada de equipamento de proteção individual (EPI) e equipamento de proteção coletiva (EPC), treinamentos, transporte e armazenamento de resíduos, medidas de prevenção de exposição a perfurocortantes, limpeza e conservação entre outros (BRASIL, 2005b).

1.6.1 Tipos de riscos

Os profissionais de laboratório devem considerar todos os fatores de risco que estão sujeitos no seu cotidiano. Os principais riscos são: (1) riscos físicos (equipamentos que geram calor ou chamas, baixas temperaturas, umidade, ruídos e vibrações, radiação não ionizante como a luz natural, ultravioletas e outras), (2) riscos químicos (substâncias voláteis, inflamáveis, irritantes e outras), (3) riscos ergonômicos, (4) riscos de acidentes (equipamentos de vidro, perfurocortantes, entre

outros) e (5) os riscos com os agentes biológicos. Conhecer o material que está sendo manuseado, principalmente se houver patogenicidade e virulência, permite que o trabalhador avalie sua conduta e evite uma exposição desnecessária, ou seja, que se coloque em uma situação de risco (HIRATA, 2012a).

1.6.1.1 *Riscos biológicos*

Segundo Hirata (2012a), estão enquadrados nos riscos biológicos os materiais biológicos provenientes de seres vivos como: animais, plantas, fungos, parasitas, bactérias, leveduras, amostras biológicas provenientes de animais e do homem e OGM's.

Conforme o último levantamento dos agentes biológicos realizado pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS), do Ministério da Saúde (MS), não há menção aos riscos inerentes às toxinas e/ou venenos utilizados na fabricação de medicamentos (BRASIL, 2017a), mesmo constando como agentes manipulados (venenos de *B. jararaca*, *C. durissus terrificus*, *M. frontalis*, *L. muta*, *L. intermedia*) pelo INCQS em levantamentos anteriores (FIOCRUZ, 2005).

A Associação Internacional de Transportes Aéreos (IATA - *International Air Transport Association*), através do regulamento para mercadorias perigosas (DGR – *Dangerous Goods Regulations*), estabelece que são considerados produtos biológicos, os produtos derivados de organismos vivos, os quais são fabricados e distribuídos de acordo com as autoridades nacionais, sendo estes utilizados para prevenção, tratamento e diagnóstico de doenças em seres humanos ou animais, assim como para o desenvolvimento, experimentos ou investigação de produtos relacionados a estes, como vacinas. Entretanto, consideram as toxinas oriundas de vegetais, bactérias ou animais que não contenham substâncias infecciosas como substâncias tóxicas, classe 6.1, que são substâncias susceptíveis de prejudicar a saúde humana, causar lesões e até a morte, caso sejam inaladas, engolidas ou em contato com a pele. (IATA, 2017). No mesmo sentido, a Agência Nacional de Transportes Terrestres (ANTT) em sua Resolução nº 5232 de dezembro de 2016, estabelece que toxinas extraídas de organismos vivos, devem ser enquadradas como produtos perigosos na classe tóxica - 6.1 (BRASIL, 2016).

Os agentes biológicos representam um risco real ou iminente para o meio ambiente e ao homem, sendo necessário que sejam estabelecidas medidas para prevenção dos riscos em laboratórios de pesquisa. São agrupados em quatro classes de risco (Quadro 7) com base na patogenicidade, virulência, endemicidade, modo de transmissão, profilaxia e terapêutica (WHO, 2004; TEIXEIRA, BORBA, 2010).

Quadro 7 – Classes de risco para agentes biológicos

Risco 1	Agentes jamais descritos como causadores de doenças para o homem e animal e que não oferecem risco ao meio ambiente. Possuem baixo risco individual e coletivo
Risco 2	Agentes patogênicos ao homem e ao animal, pouca probabilidade de alto risco aos profissionais do laboratório, sendo limitada sua propagação e disseminação ao meio ambiente, com medidas profiláticas e terapêuticas eficazes. Possuem risco individual moderado e coletivo limitado
Risco 3	Agentes patogênicos potencialmente letais ao homem e aos animais, com capacidade de transmissão por via respiratória de pessoa a pessoa, representando risco ao meio ambiente e a comunidade se disseminado. Existem medidas profiláticas e terapêuticas. Possuem risco individual elevado e coletivo baixo
Risco 4	Agentes patogênicos altamente infecciosos, de rápida propagação e potencialmente letais ao homem e aos animais e com alto risco aos profissionais do laboratório. Possuem alto risco individual e coletivo.

Fonte: (Adaptado de TEIXEIRA; BORBA, 2010).

1.6.1.2 Riscos químicos

Existem diversas substâncias químicas para as quais se desconhecem seus efeitos ao homem, animais e ao meio ambiente. São manuseados nas mais diversas atividades (saúde, indústria, comércio e à domicílio). As informações básicas a respeito dos efeitos sobre os seres vivos, ao ambiente de trabalho e ao meio ambiente devem ser disponibilizadas aos profissionais que utilizam os agentes químicos durante o manuseio, armazenamento e descarte, de modo que possam ser tomadas medidas eficazes com o objetivo de antever, prevenir e administrar no caso de acidentes (CARVALHO; COSTA, 2010).

Os agentes químicos podem ser considerados explosivos, oxidantes, inflamáveis, tóxicos, corrosivos, irritantes e perigosos ao meio ambiente (CARVALHO; COSTA 2010; INCQS, 2016a).

1.6.1.3 *Riscos físicos*

São os riscos provocados por algum tipo de energia, tais como: calor, frio, vibrações, ruídos, variações de pressão, umidade, radiações (ionizantes, não-ionizantes, ultravioleta) e outros (HIRATA, 2012a).

1.6.1.4 *Riscos de acidentes*

São todos os riscos que possam gerar acidentes ao se manipular utensílios e equipamentos. Utensílios frágeis (vidraria), perfurocortantes (agulhas, bisturis, equipamentos) ou equipamentos pesados, com engrenagens ou com gás comprimidos são suscetíveis aos acidentes (HIRATA, 2012a).

1.6.1.5 *Riscos ergonômicos*

Considera-se risco ergonômico qualquer fator que possa interferir nas características psicofisiológicas do trabalhador causando desconforto ou afetando sua saúde. São os riscos inerentes às condições de trabalho e que podem incluir aspectos relacionados ao levantamento, transporte e descarga de materiais, ao mobiliário, aos equipamentos e às condições ambientais do posto de trabalho e à própria organização do trabalho (BRASIL, 1990), ou seja, esforço físico intenso, postura inadequada resultante de não-adequação de mobiliário, controle rígido de produtividade, longas jornadas de trabalho, monotonia e repetitividade.

1.6.2 *Biossegurança em laboratórios*

Apesar dos avanços em relação à biossegurança de laboratórios, a legislação de biossegurança vigente no Brasil, criada em 1995, enfoca apenas a tecnologia de engenharia genética, estabelecendo os requisitos para o manejo de OGM's. No

entanto, é sabido que o trabalho em laboratório transcende aos parâmetros das pesquisas com manipulação genética. Por isso, foi criada a CBS, instituída pela Portaria GM/SM nº 1.683, de 28 de agosto de 2003, para tratar as questões relativas à biossegurança. A CBS está vinculada ao MS, sob coordenação da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE) e tem como meta traçar estratégias que permitam estabelecer uma ligação entre o MS e outras instituições de forma a atuar, acompanhar e avaliar as ações ligadas à biossegurança (BRASIL, 2010b).

Os níveis de biossegurança em laboratórios são divididos em quatro categorias, baseadas nos riscos biológicos dos agentes biológicos manuseados que, apresentados no Quadro 8, devem atender a requisitos de segurança para contenção física (HIRATA, 2012b)

Quadro 8 - Categorias de Níveis de Biossegurança (NB) em laboratórios de acordo com os riscos dos agentes biológicos manuseados¹

NB 1	Manuseio de organismo do grupo de risco 1. Bom planejamento espacial e funcional, adotando práticas seguras de laboratório
NB 2	Manuseio de organismo do grupo de risco 2. Necessária adoção de práticas de maior contenção para equipe laboral
NB 3	Manuseio de organismo do grupo de risco 3. Construção com especificações especiais, restrição à profissionais autorizados e equipe com treinamento especializado
NB 4	Manuseio de organismo do grupo de risco 4. Área de maior contenção. Deve ser restrito às demais áreas. Laboratório com barreiras de contenção, equipamentos de segurança biológica especiais, com ventilação e suporte laboratorial específico. Pessoal com treinamento especializado.

¹Quadro 7 (TEIXEIRA; BORBA, 2010)
fonte: (Adaptado de HIRATA, 2012b)

1.6.3 Biossegurança em biotérios

Os animais representam um risco para os profissionais que os manipulam, mesmo que não experimentalmente estejam infectados, pois podem carrear agentes patogênicos, como zoonóticos. As atividades realizadas em biotérios devem ser executadas de acordo com as boas práticas, as normas e os procedimentos técnicos de biossegurança. Esses procedimentos devem se basear nas classes de risco dos agentes biológicos, as quais norteiam as medidas de prevenção. As práticas em

biotérios devem levar em consideração a classificação dos agentes de riscos biológicos, citados no Quadro 7 e, conseqüentemente o nível de biossegurança apresentado no Quadro 8 (ANDRADE, 2010; SOUZA, 2015).

O Nível de Biossegurança Animal 1 (NBA-1) é considerado de risco baixo, exigindo instalações básicas, manejo padrão para as colônias convencionais. O NBA-2 representa um risco individual moderado e comunitário limitado, requerendo instalações básicas, com uso obrigatório de EPIs como luvas e jalecos, além da restrição do acesso, sinalização e desinfecção dos materiais infectados e gaiolas. O NBA-3 requer instalações de alta segurança, envolvendo risco individual elevado e comunitário baixo. As práticas desenvolvidas devem seguir os padrões do NBA-2 com uniforme especial e acesso mais rigoroso. O NBA-4, com alto risco individual e comunitário, requer os procedimentos adotados no NBA-3, acrescidas das exigências que envolvem práticas direcionadas à contenção máxima nas atividades com os patógenos desse nível (ANDRADE, 2010).

1.6.4 Resíduos de Serviço de Saúde

No Brasil, a Anvisa e o Conama têm como objetivos: orientar, definir regras e regular a conduta dos agentes de risco no tocante ao manejo e descarte dos resíduos de serviço de saúde (RSS), com a finalidade de preservar o meio ambiente e a saúde, garantindo assim a sustentabilidade (BRASIL, 2006). Logo, O Conama através da Resolução nº 358/2005 e a Anvisa, por meio da Resolução RDC nº 306/2004, definem como geradores de RSS todos os serviços relacionados ao atendimento à saúde humana ou animal, incluindo os serviços de laboratórios analíticos de produtos para saúde, assistência domiciliar e de trabalhos de campo; necrotérios, funerárias e serviços onde se realizem atividades de embalsamamento (tanatopraxia e somatoconservação); serviços de medicina legal; drogarias e farmácias inclusive as de manipulação; estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde; centros de controle de zoonoses; distribuidores de produtos farmacêuticos, importadores, distribuidores e produtores de materiais e controles para diagnóstico *in vitro*; unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura; serviços de tatuagem, dentre outros similares, não sendo aplicada às fontes radioativas seladas (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005a).

Os RSS são classificados em cinco grupos:

- Grupo A: RSS biológico

O Quadro 9 abaixo define as 5 classes de resíduos biológicos (A1 a A5) de serviços de saúde (BRASIL, 2004)

Quadro 9 - Classes de Resíduos de Serviço de Saúde biológico (Grupo A)

Classe	Resíduos
A1	<p>Culturas e estoques de microrganismos resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética;</p> <p>Resíduos resultantes de atividades de vacinação com microrganismos vivos ou atenuados, incluindo frascos de vacinas com expiração do prazo de validade, com conteúdo inutilizado, vazios ou com restos do produto, agulhas e seringas;</p> <p>Resíduos resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação biológica por agentes Classe de Risco 4, microrganismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido;</p> <p>Bolsas transfusionais contendo sangue ou hemocomponentes rejeitadas por contaminação ou por má conservação, ou com prazo de validade vencido, e aquelas oriundas de coleta incompleta; sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, contendo sangue ou líquidos corpóreos na forma livre.</p>
A2	<p>Carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microorganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anatomopatológico ou confirmação diagnóstica.</p>
A3	<p>Peças anatômicas (membros) do ser humano;</p> <p>Produto de fecundação sem sinais vitais, com peso menor que 500 gramas ou estatura menor que 25 centímetros ou idade gestacional menor que 20 semanas, que não tenham valor científico ou legal e não tenha havido requisição pelo paciente ou seus familiares.</p>
A4	<p>Kits de linhas arteriais, endovenosas e dialisadores;</p> <p>Filtros de ar e gases aspirados de área contaminada; membrana filtrante de equipamento médico-hospitalar e de pesquisa, entre outros similares;</p> <p>Sobras de amostras de laboratório e seus recipientes contendo fezes, urina e secreções, provenientes de pacientes que não contenham e nem sejam suspeitos de conter agentes Classe de Risco 4, e nem apresentem relevância epidemiológica e risco de disseminação, ou microrganismo causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido ou com suspeita de contaminação com príons;</p> <p>Tecido adiposo proveniente de lipoaspiração, lipoescultura ou outro procedimento de cirurgia plástica que gere este tipo de resíduo; Recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, que não contenham sangue ou líquidos corpóreos na forma livre; peças anatômicas (órgãos e tecidos) e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de estudos anátomo-patológicos ou de confirmação diagnóstica;</p>

Continuação do Quadro 9

	Carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microorganismos, bem como suas forrações; cadáveres de animais provenientes de serviços de assistência; Bolsas transfusionais vazias ou com volume residual pós-transfusão.
A5	Órgãos, tecidos, fluidos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e demais materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação com príons.

Fonte: (BRASIL, 2004).

- Grupo B: RSS químico

Segundo descrito no apêndice I da RDC 306/2004, os RSS químicos são resíduos que contenham substâncias químicas que possam representar risco à saúde pública ou ao meio ambiente devido às características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade. Como exemplos apresentados pela resolução constam: os produtos hormonais e produtos antimicrobianos, antineoplásicos, citostáticos, imunossupressores, imunomoduladores, resíduos de saneantes, desinfetantes, desinfestantes, resíduos contendo metais pesados, reagentes para laboratório e demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da NBR 10.004 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), entre outros (BRASIL, 2004).

A norma ABNT NBR 10.004:2004, classifica e lista os resíduos sólidos conforme o risco potencial de contaminação ao meio ambiente em: Classe I – perigosos; Classe II – não perigosos (Classe IIa – não inertes e Classe IIb – inertes) (ABNT, 2004; PALMA; VITTA, 2012)

- Grupo C: RSS radioativo

Aplica-se a todos os rejeitos radioativos oriundos da atividade humana que contenham radionuclídeos presente e em limites superiores aos estabelecidos pela Norma 6.05 da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), sendo considerados resíduos não radioativos após o tempo necessário para que haja o decaimento até os valores limites estabelecidos pela norma (BRASIL, 2004)

- Grupo D: RSS comum ou domiciliar

Compõem-se de resíduos que não apresentam riscos à saúde humana ou ao meio ambiente, sendo assemelhados aos resíduos domiciliares, tais como papéis, metais, vidros, plásticos e resíduos orgânicos (BRASIL, 2004).

- Grupo E: RSS perfurocortantes e abrasivos

São resíduos resultantes da assistência à saúde e que podem conter agentes biológicos, químicos ou radioativos, além de apresentar riscos aos manuseios inerentes à sua finalidade. São considerados perfurocortantes: agulhas, lâminas de bisturi, ampolas de vidro, tubos capilares, escalpes, micropipetas; lâminas e lamínulas; espátulas; e todos os utensílios de vidro quebrados no laboratório e similares (BRASIL, 2004; INCQS, 2016a).

1.6.4.1 *Gestão dos resíduos no INCQS*

A gestão dos RSS no INCQS segue as fundamentações legais da Anvisa - RDC 306/2004 e do Conama 358/2005, através do Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS), o qual compreende um conjunto de ações que englobam a segregação do resíduo na fonte, acondicionamento, identificação, coleta interna, armazenamento temporário, transporte e destinação final do RSS, visando as questões relativas à biossegurança com intuito de reduzir a geração de resíduos, prevenção de acidentes de trabalho e impactos ao meio ambiente (BRASIL, 2004; INCQS, 2015a).

De acordo com a Resolução RDC 306/2004 da Anvisa:

Todo gerador deve elaborar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde - PGRSS, baseado nas características dos resíduos gerados e na classificação constante do Apêndice I, estabelecendo as diretrizes de manejo dos RSS. (BRASIL, 2004).

É impreterível que os resíduos estejam em condições seguras para que haja o descarte, os RSS podem ser tratados a partir de um método, técnica ou processo

que modifique as características dos riscos inerentes aos resíduos, reduzindo ou eliminando o risco de contaminação, de acidentes ocupacionais ou de dano ao meio ambiente.

Segundo a Resolução 358/2005 do Conama:

X – Resíduos de serviços de saúde: são todos aqueles resultantes de atividades exercidas nos serviços definidos no art. 1o desta Resolução que, por suas características, necessitam de processos diferenciados em seu manejo, exigindo ou não tratamento prévio à sua disposição final” (BRASIL, 2005a).

“Art. 21. Os resíduos pertencentes ao Grupo B, constantes do Anexo I desta Resolução, com características de periculosidade, quando não forem submetidos a processo de reutilização, recuperação ou reciclagem, devem ser submetidos a tratamento e disposição final específicos.

§ 1o As características dos resíduos pertencentes a este grupo são as contidas na Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos-FISPQ.

§ 2o Os resíduos no estado sólido, quando não tratados, devem ser dispostos em aterro de resíduos perigosos - Classe I. § 3o Os resíduos no estado líquido não devem ser encaminhados para disposição final em aterros. (BRASIL, 2005a).

2 JUSTIFICATIVA

Diante da ausência de estudos sobre biossegurança que aborde o correto manuseio e descarte de venenos ofídicos, torna-se necessária a realização e padronização dos métodos de descarte e manipulação de produtos perigosos, assim como estimar a toxicidade em relação à exposição dos trabalhadores e aos resíduos ambientais durante o seu manuseio (BRASIL, 2004; 2005a; 2005b)

A biossegurança é considerada um tema de extrema relevância por estar relacionada aos agravos causados pelos agentes de riscos (BORBA et al., 2009). Medidas de segurança e proteção ao trabalhador e ao meio ambiente devem ser elaboradas para a minimização dos riscos (BRASIL, 2005b).

Este estudo busca um diagnóstico da situação atual de descarte dos rejeitos dos ensaios realizados no INCQS que utilizam o BraBot/005, avaliando a efetividade da inativação da toxicidade do BraBot/005 após o tratamento pelo processo de autoclavação. Conjuntamente, avaliar a toxicidade aguda pela via oral e dérmica do BraBot/005 de modo a fornecer informações sobre os riscos à saúde em eventuais exposições aguda por estas vias, subsidiando assim a elaboração de um manual de biossegurança específico para os procedimentos que envolvam o BraBot/005 nos ensaios realizados no âmbito do INCQS/Fiocruz. Além disso, poderá ser utilizado como fonte de referência atualizada para outros estudos na área de biossegurança relacionadas ao manuseio e descarte de outros venenos de animais peçonhentos.

O estudo se justifica também pela própria missão do INCQS, uma vez que, a instituição é referência nacional para as questões científicas, normativas e tecnológicas de diversos produtos, tendo a função de executar ações analítico-laboratoriais previstas na legislação sanitária ou por demanda de órgãos oficiais; desenvolver, adequar ou implantar metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de saúde; emitir pareceres sobre questões técnico-científicas relacionadas à Vigilância Sanitária; elaborar normas técnicas e procedimentos operacionais padronizados relacionados ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços, entre outros (INCQS, 2016b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Elaborar um manual de biossegurança para manipulação e descarte do veneno botrópico de referência (BraBot/005) no âmbito do INCQS – Fiocruz/RJ”

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a toxicidade oral aguda do BraBot/005 em camundongos Swiss Webster segundo o Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) constante na Diretriz OECD nº 423;

Avaliar a toxicidade dérmica aguda do BraBot/005 em camundongos Swiss Webster segundo o Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente (GHS) constante na Diretriz OECD nº 434;

Avaliar a inativação da toxicidade do BraBot/005 como resíduos dos ensaios de determinação de potência do soro antibotrópico;

Avaliar a inativação da toxicidade do BraBot/005 como resíduos dos ensaios de determinação de DL₅₀ do veneno botrópico;

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi dividido em três etapas:

- I. Na primeira etapa foram determinadas a toxicidade oral aguda e a toxicidade dérmica aguda do BraBot/005 em categorias GHS constantes nas diretrizes da OECD número 423 e 434 (OECD, 2001; 2004). Além destes 2 ensaios foram realizados ensaios biológicos para verificação da inativação do BraBot/005.
- II. Na segunda etapa foram estabelecidos os procedimentos de descarte dos rejeitos oriundos dos ensaios realizados no INCQS que utilizam o BraBot/005. Esses rejeitos incluem todas as soluções preparadas nos ensaios da determinação da DL_{50} do BraBot/005 e da determinação da potência do soro antibotrópico (DE_{50}), além do próprio veneno liofilizado que é diluído na proporção de 1 mg/mL (1 mg de líofilo para 1 mL de salina) e utilizado em todas as soluções dos ensaios, visando um diagnóstico do procedimento de descarte realizado no INCQS/Fiocruz.
- III. A terceira etapa envolveu a elaboração de um manual de biossegurança para uso de todas as pessoas envolvidas no processo do controle da qualidade do soro antibotrópico.

4.1 Preparo das soluções

A pesagem do BraBot/005 empregado em todos os ensaios foi realizada em balança analítica (Shimadzu[®], modelo AY 220, série D305600158) e calibrada para a faixa de peso de 0,001 g a 220 g.

Para o ensaio de toxicidade aguda oral foram preparadas 3 soluções de BraBot/005 em salina nas concentrações indicadas na Tabela 1, nas doses de 50, 300 e 2000 mg/kg de acordo com a média do peso corpóreo dos animais obtidos no dia do ensaio, no volume de 0,5 mL/animal. As concentrações preparadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Preparo da solução do Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005) baseado na média corporal de 3 camundongos Swiss Webster, machos, para as doses de 50, 300 e 2000 mg/kg do ensaio de toxicidade aguda oral

Dose (mg/kg)	Média Corporal (g)	Desvio Padrão (g)	Concentração (mg/mL)	BraBot/005 (mg)	Salina (mL)
50	40	0,41	4	8	2
300	39,83	0,47	23,9	47,8	2
2000	39,83	0,24	159,32	318,64	2

Ponte: (Próprio autor, 2017).

No ensaio de toxicidade aguda dérmica foram preparadas 3 soluções de BraBot/005 em salina, correspondentes às doses de 1000 e 2000 mg/kg de acordo com a média do peso corpóreo dos animais obtidos no dia deste ensaio, no volume de 0,5 mL/animal. As concentrações preparadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Preparo da solução do Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005) baseado na média corporal de 5 dos camundongos Swiss Webster, fêmeas, para as doses de 1000 e 2000 mg/kg do ensaio de toxicidade aguda dérmica

Dose (mg/kg)	Média Corporal (g)	Desvio Padrão (g)	Concentração (mg/mL)	BraBot/005 (mg)	Salina (mL)
1000	39 ¹	-	78	78	1
2000	34,4	1,39	137,6	412,8	3

Fonte: (Próprio autor, 2017).

¹ Peso corporal referente a 1 camundongo Swiss Webster, fêmea, de 11 semanas

Em ambos os ensaios, as soluções foram preparadas em tubos plásticos cônicos (marca BD[®]) de 15 mL, homogeneizados em vortex (IKA[®] modelo MS 3D) até que o veneno liofilizado fosse totalmente dissolvido, a 3000 rpm e deixados em repouso em estufa a 37 °C por 30 min para manter a temperatura mais próxima à temperatura dos animais no momento da administração.

As soluções empregadas nos ensaios destinados a estabelecer a eficácia da inativação da toxicidade do BraBot/005, foram preparadas e formuladas em volume igual ao dobro do que foi apresentado nos Quadros 10, 11 e 12, para que fossem submetidas também ao processo de autoclavação.

O esquema de diluição empregado no preparo das soluções no ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico (DE_{50}) está descrito no Quadro 10; o preparo da solução de BraBot/005 correspondentes a 5 DL_{50} no Quadro 11 e o esquema de diluições do ensaio de determinação da DL_{50} do BraBot/005 está descrito no Quadro 12. O volume aplicado foi de 0,5 mL/animal para as três preparações.

São considerados resíduos dos procedimentos laboratoriais: O veneno botrópico na concentração de 1 mg/mL, diluído em solução salina, utilizados nos ensaios de determinação da potência do soro antibotrópico e de determinação da DL_{50} , o veneno liofilizado que é manipulado para a formulação desta solução mencionada, soro antibotrópico com volumes variáveis de 0,23 a 0,5 mL (Quadros 10 e 12) e solução contendo 5 doses letais médias utilizadas como controle positivo nos ensaios de determinação da potência do soro antibotrópico (Quadro 11).

Quadro 10 - Esquema de diluições empregado no preparo das soluções de soro antibotrópico administradas no volume de 0,5 mL/animal no teste de determinação da potência do soro antibotrópico

Caixa (8 animais cada)	Micrograma/ animal	Salina 0,85% (mL)	Soro Antibotrópico (mL)	Veneno Botrópico (mL)
1	42,41	3,1	0,5	2,4
2	32,23	3,22	0,38	2,4
3	24,79	3,31	0,29	2,4
4	19,18	3,37	0,23	2,4

Fonte: (Adaptado de INCQS,2017b).

Quadro 11 - Preparo da solução do Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005) equivalente a 5 DL_{50}

Salina	Veneno (mL) (1 mg/mL)
3,6	2,4

Fonte: (Adaptado de INCQS,2017b).

Quadro 12 - Esquema de diluições empregados no preparo das soluções de Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005) no ensaio para a determinação da dose letal média de BraBot/005

Caixa (10 animais cada)	Micrograma/ animal	Solução de Veneno (1 mg/ mL)	Salina 0,85% (mL)
1	62,2	0,74 mL	5,26 mL
2	51,8	0,62 mL	5,38 mL
3	43,2	0,51 mL	5,49 mL
4	36,0	0,43 mL	5,57 mL
5	30,0	0,36 mL	5,64 mL

Fonte: (Adaptado de INCQS, 2017a).

Nestes ensaios, as soluções foram preparadas em tubos de ensaios, homogeneizados em vortex (IKA®, modelo MS 3D) até que o veneno liofilizado fosse totalmente dissolvido, a 2500 rpm e deixados em repouso em estufa a 37 °C por 60 minutos. As soluções destinadas ao estabelecimento da inativação da ação tóxica do veneno botrópico foram autoclavadas no ciclo de descontaminação em autoclave calibrada e validada (Luferto®, modelo 39206) por 60 minutos, a 121 °C, resfriado até atingir 37 °C.

4.2 Animais

Os animais utilizados em todos os ensaios foram camundongos (*Mus musculus*), da linhagem *Swiss Webster*. Estes são utilizados rotineiramente nos ensaios de determinação da potência do soro antibotrópico e na determinação da DL₅₀ do veneno botrópico preconizados na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010a). Adicionalmente, a linhagem *Swiss Webster* foi empregada por ser amplamente utilizada em pesquisas biomédicas, especialmente em farmacologia (NEVES et al, 2013) e extensivamente utilizada em testes de pesquisas e segurança de drogas (TACONIC, 2018).

A OECD preconiza a utilização de roedores, de preferência ratos, fêmeas, de 8 a 12 semanas de vida. Entretanto, não há restrições quanto ao uso de camundongos (OECD, 2001; 2004). A escolha deste modelo animal deu-se por

possuir uma massa corporal menor, utilizando menos insumos, principalmente do BraBot/005.

Os camundongos foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz, aclimatados no biotério do Serviço de Animais de Laboratório (SAL) vinculado ao Departamento de Farmacologia e Toxicologia/INCQS de acordo com cada protocolo experimental, descritos no item 4.3 e seus subitens.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), licenciado sob o número LW-26/17 (ANEXO B) e acompanhados pela médica-veterinária responsável pela licença.

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Ensaio para determinação da toxicidade aguda oral para o Veneno de Referência Nacional.

Foram utilizados camundongos machos, Swiss Webster, com idade de 10 semanas, com 37 a 40,5 g de peso corporal, aclimatados por 5 dias no SAL, separados em grupos de 3 animais durante todo o período no SAL, em caixas de polipropileno de tamanho 29 x 12 x 17 cm, contendo enriquecimento ambiental (papel toalha alternando a cada troca com tubo de PVC com 3,5cm de diâmetro, seccionado na metade com 7 cm de comprimento para propiciar condição de realização de ninho e abrigo) e livre acesso à água e ração (Nuvilab®) não autoclavadas (jejum de ração nas 4 h antecedentes a gavagem). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, que possuem características físicas de um ambiente de fluxo de ar coletivo, em condições controladas de temperatura (22 °C +/- 3), umidade (55% +/- 10%) e ciclo alternado claro/escuro de 12 h.

Os grupos experimentais foram:

- Grupo controle negativo (C) presente na 1ª, 2ª e 3ª etapas: Solução salina
- Grupo experimental (E) 1ª etapa: Dose inicial de 50 mg/Kg – Administração de solução de BraBot005 em salina na concentração de 3,82 mg/mL no volume de 0,5 mL/animal

- Grupo experimental (E) 2ª etapa: Dose de 300 mg/Kg– Administração de solução de BraBot005 em salina na concentração de 23,9 mg/mL no volume de 0,5 mL/animal
- Grupo experimental (E) 3ª etapa: Dose de 2000 mg/Kg– Administração de solução de BraBot005 em salina na concentração de 159,32 mg/mL no volume de 0,5 mL/animal

Foram separados dois grupos contendo 3 camundongos machos. Os animais foram pesados e realizada a média do peso dos animais do grupo experimental (E), sendo preparada a solução baseado na média do grupo. No grupo E, os animais foram expostos ao veneno botrópico com salina como veículo. No grupo Controle (C), os animais foram expostos apenas à solução salina. Em ambos os grupos, a administração foi realizada em dose única (0,5 mL), no período matutino, por via oral com sonda orogástrica apropriada (gavagem), cânula em aço inox BD-10, com 1 mm de diâmetro, esfera de 1,74 mm, raio de 40 mm e comprimento de 31 mm em camundongos jovens adultos, sendo privados de alimento 3 h antes do procedimento.

Para o acompanhamento, os animais foram marcados com solução de azul de metileno na cabeça (animal 1), no dorso (animal 2) e na cauda (animal 3). Os animais foram designados C1 (animal 1 do grupo controle), C2 (animal 2 do grupo controle), C3 (animal 3 do grupo controle), E1 (animal 1 do grupo experimental), E2 (animal 2 do grupo experimental) e E3 (animal 3 do grupo experimental). Estes foram pesados antes do início do ensaio e nos dias 1, 7 e 14 de ensaio. Foram observados diariamente (APÊNDICE A e B), sendo nas primeiras 4 h de início, a cada 30 min até 120 min e cada 60 min de 120 a 240 min, fornecendo um registro que subsidiou a verificação da evolução dos sinais clínicos de toxicidade (OECD, 2000 e 2001). Foram realizados ensaios com a dose de 50, 300 e 2000 mg/Kg (OECD, 2001). O grupo C esteve presente em todas as doses empregadas no grupo E como o controle negativo deste. Quanto ao controle positivo do efeito do veneno, não houve a necessidade de realizar o ensaio em paralelo devido a estabilidade do veneno mencionada no item 1.4.2.1, diminuindo assim o uso de animais de laboratório. Todos os animais foram submetidos a eutanásia humanitária e realizada a

necropsia, coleta dos órgãos (fígado, baço, estômago, intestino delgado e rins) e processamento dos tecidos.

Durante o período de observação, os animais foram avaliados quanto aos sinais clínicos clássicos de toxicidade como perda de peso, prostração, hipoatividade e letalidade. Os protocolos experimentais foram baseados na diretriz OECD nº 423 – *Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001).

4.3.2 Ensaio para determinação da toxicidade aguda dérmica para o Veneno de Referência Nacional.

Foram utilizados camundongos fêmeas, Swiss Webster, com idade de 11 semanas, com 33 a 39,5 g de peso corpóreo, aclimatadas por 5 dias no SAL, em condições semelhantes as descritas no ensaio para determinação da toxicidade aguda oral, exceto que não houve restrição ao acesso a água e ração durante todo o protocolo e com relação aos grupos de animais por caixa, formando grupos de 5 animais durante o período de aclimação e individualmente após o início dos ensaios.

Os grupos experimentais foram:

- Grupo controle negativo (C) presente na 1ª e 2ª etapas: Solução salina
- Grupo experimental (E) 1ª etapa: Dose inicial de 1000 mg/Kg de solução de BraBot005 em salina na concentração de 78 mg/mL
- Grupo experimental (E) 2ª etapa: Dose de 2000 mg/Kg de solução de BraBot005 em salina na concentração de 137,6 mg/mL

Os camundongos foram submetidos a tricotomia na região dorsal (Figura 13), 48 h antes do início do experimento, com aparelho de tosquiar (Oster®, modelo 78997-010), sendo os animais previamente anestesiados com a associação de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e quetamina (80 – 100 mg/Kg), via I.M, no músculo posterior da coxa (agulha de 13 X 0,45 mm e volume ajustado para o peso do animal) de modo a conferir sedação e analgesia (conferida pela ausência de respostas aos pinçamentos interdigitais) necessária para realizar a tricotomia sem causar estresse ao animal.

Figura 13 - Tricotomia da região dorsal dos animais nos ensaios de toxicidade dérmica aguda



Fonte: (Próprio autor, 2017).

Foi utilizada a fórmula de Meeh para o cálculo da área da superfície corporal total: $ASCT = k \times p^{2/3}$, onde ASCT é expresso em cm^2 , $k = 9,1$ é uma constante específica para camundongos, p é a massa corporal do camundongo expressa em gramas. O resultado em cm^2 foi utilizado para confecção de compressas de gaze estéreis utilizadas como superfície de contato entre a pele do animal e a solução do BraBot/005 embebida nesta (ROCHA, 2010)

Foi utilizado apenas um animal para determinação da dose de entrada, como ensaio piloto. A dose inicial utilizada foi de 1000 mg/kg sugerida pela diretriz OECD nº 434 quando não há evidências da toxicidade da substância, seguida pela dose de 2000 mg/kg, sendo esta a dose utilizada no ensaio para a classificação da toxicidade dérmica aguda. Assim sendo, foram separados dois grupos contendo 5 animais cada.

No dia do início do experimento, os animais de ambos os grupos foram pesados, realizada a média corporal do grupo, o cálculo da superfície corporal e corte das compressas de gaze. A dose de veneno utilizada foi de 2000mg/Kg

baseada nesta média, diluída com salina como veículo para o grupo E. No grupo C, os animais foram expostos apenas à solução salina. Em ambos os grupos, a exposição foi realizada em dose única (0,5 mL), no período matutino, com uma compressa de gaze embebida na solução previamente preparada para cada grupo, colocada sobre a região dorsal do animal, envolvida com esparadrapo hipoalergênico de modo a conferir a adesão necessária por 24 horas, em camundongos jovens adultos (Figura 14).

Figura 14 - Preparação com esparadrapo para adesão das compressas de gaze embebidas em solução.



Fonte: (Próprio autor, 2017).

Para o acompanhamento, os animais foram marcados com caneta atóxica de tinta resistente (Sharpie®, séries n°37000), na base da cauda, sendo designados C1 (animal 1 do grupo controle), C2 (animal 2 do grupo controle), C3 (animal 3 do grupo controle), C4 (animal 4 do grupo controle), C0 (animal 5 do grupo controle), E1 (animal 1 do grupo experimental), E2 (animal 2 do grupo experimental) e E3 (animal 3 do grupo experimental) E4 (animal 4 do grupo experimental) e E0 (animal 5 do grupo experimental). Estes foram pesados antes do início do ensaio, nos dias 1, 7 e 14 de ensaio. Foram observados diariamente (APÊNDICE C, D), sendo nas primeiras 4 h de início, a cada 30 min até 120 min e a cada 60 min de 120 a 240 min, fornecendo um registro que subsidiou a verificação da evolução dos sinais clínicos de toxicidade (OECD, 2000; OECD, 2004). O grupo C foi considerado o controle negativo em relação ao grupo E. Quanto ao controle positivo do efeito do veneno, não houve a necessidade de realizar o ensaio em paralelo devido a

estabilidade do BraBot/005 mencionada anteriormente. Todos os animais foram submetidos a eutanásia humanitária e realizada a necropsia, coleta dos órgãos (fígado, baço, pele e rins) e processamento dos tecidos.

Durante o período de observação, os animais foram avaliados quanto aos sinais clínicos clássicos de toxicidade como perda de peso, prostração, hipoatividade e letalidade. Os protocolos experimentais foram baseados na diretriz OECD nº 434 – *Acute Dermal Toxicity – Fixed Dose Procedure* (OECD 2004).

4.3.3 Ensaio para estabelecer os procedimentos para a manipulação e o tratamento dos resíduos do veneno botrópico, baseados nos ensaios de rotina do Setor de Soros Antipeçonhentos do INCQS.

Foram utilizados camundongos machos ou fêmeas, com peso corpóreo de 18 a 22 g, aclimatados por 24 horas no SAL e mantidos em condições semelhantes às descritas nos ensaios de determinação da toxicidade aguda oral e dérmica.

Os animais foram observados por 48 h, sendo retirados os animais que vieram a óbito no decorrer do experimento. Os protocolos experimentais foram baseados na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010a).

4.3.3.1 *Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 como resíduo do Ensaio de determinação de potência do soro antibotrópico*

Foram realizados 3 ensaios distintos para a determinação de potência do soro antibotrópico (amostras 3167/16 e 3168/16; 3639/16 e 3640/16; e 3787/16) recebidas para análise de orientação no Setor de Soros Antipeçonhentos. Os animais foram distribuídos em 2 grupos, grupo I e grupo II. O grupo I, sendo o controle, ou seja, referente ao ensaio oficial realizado no INCQS e o grupo II sendo o grupo experimental.

Para os ensaios oficiais de determinação da potência do soro antibotrópico foram utilizados 42 camundongos de 18 a 22g, machos ou fêmeas, separados em 4 caixas contendo oito animais cada e 1 caixa contendo dez animais como controle positivo do ensaio mencionado, administrados com a dose equivalente a 5DL₅₀ do BraBot/005 (200 µg/animal). Os grupos foram formados com animais do mesmo

sexo. Os animais foram inoculados por via IP, com volume fixo de 0,5 mL da solução/animal contendo soro antitoxinico em 4 diferentes diluições e dose equivalente a 5DL₅₀ de BraBot/005, utilizando agulha 13 x 0,45 mm e seringas de 1 mL. As soluções administradas estão descritas nos Quadros 10 e 11. Estes animais foram acompanhados por 48 h para verificação de ocorrência de óbitos e animais sobreviventes para efeito de cálculo estatístico, usando o método de probitos, a partir do programa estatístico CombiStats® (BRASIL, 2010a).

Concomitantemente, foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, para o grupo II, com as mesmas soluções utilizadas nos ensaios oficiais, porém as soluções foram previamente autoclavadas no período matutino, a 121 °C por 60 min. Após o resfriamento das soluções a 37 °C, os animais do grupo II foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo I no período da tarde, seguindo o mesmo padrão de acompanhamento por 48 h.

Os animais sobreviventes, de cada grupo, foram submetidos a eutanásia, (descrita no item 4.4) no final do período de observação de 48 h.

4.3.3.2 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 como resíduo do Ensaio de Determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico.

Foram realizados 3 ensaios anuais para a determinação da toxicidade do BraBot005 conforme preconiza o POP 65.3440-006 em sua 8ª revisão para estudo de estabilidade do veneno ao longo do tempo. Os animais foram distribuídos em 2 grupos, grupo I e grupo II. O grupo I, sendo o controle, ou seja, referente do ensaio oficial realizado no INCQS e o grupo II sendo o grupo experimental.

Para os ensaios oficiais foram utilizados 50 camundongos de 18 a 22g, machos ou fêmeas, separados em 5 caixas contendo dez animais do mesmo sexo. Os animais foram inoculados via IP, com volume fixo de 0,5 mL da solução de BraBot/005 em 5 diferentes concentrações, utilizando agulha 13 x 0,45 mm e seringas de 1 mL. As soluções administradas nos animais estão descritas no Quadro 12. Os animais foram acompanhados por 48 h, para verificação de ocorrência de óbitos e animais sobreviventes para efeito de cálculo estatístico, usando o programa estatístico pelo método de probitos, a partir do programa estatístico CombiStats® (BRASIL, 2010a).

Concomitantemente, foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, para o grupo II, com as mesmas concentrações de soluções utilizadas nos ensaios oficiais, porém as soluções foram previamente autoclavadas no período matutino, a 121 °C por 60 minutos. Após o resfriamento das diluições até 37 °C, os animais do grupo II foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo I no período da tarde, seguindo o mesmo padrão de acompanhamento por 48 h.

Os animais sobreviventes, de cada grupo, foram submetidos a eutanásia (descrita no item 4.4) no final do período de observação de 48 h.

4.3.3.3 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do veneno botrópico e de outros resíduos oriundos dos ensaios descritos no Ensaio de Determinação da Potência do Soro Antibotrópico e no Ensaio de Determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico.

Foram considerados como outros resíduos dos ensaios oficiais do INCQS a solução de BraBot/005 na concentração de 1 mg/mL e o BraBot/005 liofilizado. Estes resíduos foram provenientes dos 3 ensaios de determinação da DL₅₀ do BraBot/005. Os animais foram distribuídos em 2 grupos, grupo I (controle) e grupo II (experimental). No grupo I, foram utilizados 10 camundongos, machos ou fêmeas, de 18 a 22 g, inoculados no período da manhã, via IP, com o volume fixo de 0,5 mL/animal da solução de 1 mg/mL de BraBot/005 reconstituído em solução salina, utilizando agulha 13 x 0,45 mm e seringas de 1 mL. Estes foram acompanhados por um período 48 h.

No grupo II, foram utilizados 20 camundongos, machos e fêmeas, de 18 a 22 g, sendo distribuídos em 2 caixas, contendo 10 animais do mesmo sexo em cada (caixa IIa e IIb). Previamente, as soluções contendo 1 mg/mL de BraBot/005 reconstituído em solução salina e o frasco contendo 25 mg de BraBot/005 liofilizado, aberto, foram autoclavados no período matutino, a 121 °C por 60 min. Após o resfriamento da solução e do veneno liofilizado a 37 °C, este foi reconstituído em solução salina a 0,85%, homogeneizado em vortex por 5 min a 3000 rpm. Os animais das caixas IIa e IIb foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos acima no período da tarde, sendo inoculados 0,5 mL da solução de BraBot/005

autoclavada por animal na caixa IIa e 0,5 mL da solução obtida pela reconstituição do líófilo de BraBot/005 autoclavado na caixa IIb. Estes animais foram acompanhados por um período 48 h. Os animais sobreviventes, de cada grupo, foram submetidos a eutanásia no final do período de observação de 48 h.

4.4 Eutanásia dos animais

Após o período de acompanhamento experimental, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados. A eutanásia foi precedida pela administração prévia da associação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (80 – 100 mg/kg) por via I.P. Os animais foram contidos mecanicamente, usando a pele do dorso, próximo a cabeça, realizando a antissepsia com compressa de gaze e álcool 70%, inclinando-o ligeiramente para baixo, permitindo que os órgãos do abdome se acomodassem de modo a deixar um flanco vazio no quadrante inferior direito, possibilitando um melhor resultado na administração, utilizando agulhas de calibre 13 x 4,5 mm, com profundidade de penetração de 6 mm e administrando o volume de até 0,5 mL da associação anestésica mencionada conforme peso no momento da administração da medicação. Após a indução da pré-anestesia, a eutanásia foi realizada através da administração do anestésico inalatório isoflurano 4,5%, insuflado por 2L/min de oxigênio em câmara de indução anestésica no SAL. Após 10 min. foi realizada a confirmação do óbito através da observação do cessamento dos batimentos cardíacos com auxílio de um estetoscópio cardíaco (CFMV, 2012; NEVES et al., 2013)

4.5 Exame anatomopatológico

Foram realizadas as coletas dos órgãos e processamentos histológicos para a realização do exame anatomopatológico dos animais.

Todo procedimento de necropsia, processamento dos tecidos e análise anatomopatológica foram autorizados pela Coordenação de Pesquisa e

Experimentação Animal (CPEA) / ICTB e realizado pelo médico-veterinário responsável pelo Laboratório de Histotécnica da CPEA (ANEXO C)

A necropsia, técnica que possibilita descrever alterações macroscópicas, tem a função de identificar processos patológicos oriundos de agentes infecciosos, químicos, processos neoplásicos entre outros. Durante a necropsia, foram coletados para o ensaio de toxicidade aguda oral o fígado, baço, rins, estômago e intestino delgado e para o ensaio de toxicidade aguda dérmica o fígado, baço, rins e pele (epiderme, derme e hipoderme).

4.5.1 Preparo histológico

Os órgãos foram coletados, fixados em formaldeído a 10% (por 24 a 48 h) e clivados a uma espessura de 3 mm. O processamento histológico foi realizado em um processador automático (Lupetec[®] PT 05) que consistiu na desidratação com álcool etílico, clarificação com xilol e impregnação com parafina. Foi realizada a técnica de inclusão (imersão do tecido previamente impregnado com parafina em um molde com parafina líquida) e posteriormente, os moldes de parafinas foram seccionados, com espessura de aproximadamente 4 µm, com auxílio de um micrótomo (Leica[®] RM 2125RT). Foram preparadas as lâminas, as quais receberam o tratamento de desparafinização, hidratação, coloração com hematoxilina e eosina, desidratação, clarificação e selagem da lâmina. Foi utilizado o microscópio, marca Zeiss[®] e modelo Primo Star para a análise das lâminas e a captação das imagens foi realizada através da câmera, marca Zeiss[®], modelo AxioCam ERc 5s, acoplada ao microscópio, sendo as imagens disponíveis no formato eletrônico através do software AxioVision SE64 Rel.4.9.1(CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio para determinação da toxicidade oral aguda do veneno botrópico de referência

O ensaio de toxicidade oral aguda com a dose inicial de 50 mg/kg (Figura 2) administrados a 3 camundongos Swiss Webster, machos, do grupo experimental (E), foi realizado concomitantemente com o grupo controle (C). Após os acompanhamentos, durante 14 dias (Tabela 3 e 4), verificou-se que não houve sinais evidentes de toxicidade, tanto em relação a perda de peso quanto aos sinais clínicos dos animais.

Tabela 3 - Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo controle (C) administrado com solução salina referente ao grupo E administrado com a dose de 50 mg/kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda.

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Animal	Peso em gramas			
C1	38	38	40	42,5
C2	37,5	37	41	44
C3	39	38,5	41,5	42,5
Média do grupo	38,17	37,83	40,83	43

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Tabela 4 - Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo E administrado com a dose de 50 mg/Kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda.

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Animal	Peso em gramas			
E1	40	39,5	42	45
E2	39,5	39	43	45,5
E3	40,5	39,5	41,5	43
Média do grupo	40	39,33	42,17	44,5

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Utilizou-se o mesmo protocolo experimental com a dose de 300 mg/kg (grupo E) preconizada na diretriz OECD n^o 423 (Figura 3) junto ao grupo controle negativo (C). Após o período de acompanhamento foi constatado também que não houve indícios de sinais tóxicos e perda de pesos dos animais conforme Tabelas 5 e 6 (acompanhamento do peso) e também da observação clínica dos animais.

Tabela 5 - Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo controle (C) administrado com solução salina referente ao grupo E administrado com a dose de 300 mg/kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Animal	Peso em gramas			
C1	39,5	39	41	44
C2	37	36,5	39	42
C3	38,5	38,5	40	43,5
Média do grupo	38,33	38	40	43,17

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Tabela 6 - Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo E administrado com a dose de 300 mg/Kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda.

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Animal	Peso em gramas			
E1	39,5	39,5	42	43
E2	39,5	38,5	41,5	43,5
E3	40,5	39,5	43	45
Média do grupo	39,83	39,17	42,17	43,83

Fonte: (Próprio autor, 2017).

No último ensaio com a dose preconizada pela diretriz da OECD n^o 423, de 2000 mg/kg (Figura 4) verificou-se que também não houve sinais de toxicidade, observado através do peso e pelo acompanhamento clínico dos animais. Constatou-se o ganho de peso ao final do ensaio em ambos os grupos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo controle (C) administrado com solução salina referente ao grupo E administrado com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Animal	Peso em gramas			
C1	39,5	39	43	45
C2	39,5	38,5	42	43,5
C3	40	40	40,5	42
Média do grupo	39,67	39,17	41,83	43,50

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Tabela 8 - Peso corpóreo (g) por camundongo, Swiss Webster, machos e média de peso (g) por dia de acompanhamento para o grupo E administrado com a dose de 2000 mg/Kg de BraBot/005 no Teste de Toxicidade Oral Aguda.

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Animal	Peso em gramas			
E1	40	40	42,5	44,5
E2	40	39,5	43	45
E3	39,5	38	41	42,5
Média do grupo	39,83	39,17	42,17	44,00

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Além disso, os animais do grupo controle e do grupo experimental administrado com 2000 mg/kg de BraBot/005 não tiveram alterações físicas e comportamentais alterados (Figura 15, 16 e 17).

Figura 15 - Grupo experimental de camundongos após 14 dias de observação administrado com dose única de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade oral aguda.



Fonte: (Próprio autor, 2017).

Figura 16 - Planilha de acompanhamento diário de camundongos machos Swiss Webster durante 14 dias do grupo controle (C) administrado com solução salina no teste de toxicidade oral aguda com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005.

PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA - Grupo Controle (C)																			
Material Administrado: SOLUÇÃO FISIOLÓGICA										Data: 06/06/17									
Pesquisador Responsável: FABIO H. D. M. LIMA / MARIA APARECIDA A. BOLIVE																			
Linhagem: S. WEBSTER			Sexo: MACHO		Idade:			Via: ORAL		Vol.: 0,5 ML		Diluição: 0,85%							
DIA	1						2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	< 30'	60'	90'	120'	180'	240'													
Cabeça (C1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dorso (C2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cauda (C3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Rubrica	N	N	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Legenda: (S) Sintoma (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas																			
Obs.:																			

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Figura 17 - Planilha de acompanhamento diário de camundongos machos Swiss Webster durante 14 dias do grupo E administrado com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade oral aguda

PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS																			
TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA - Grupo Experimental (E)																			
Material Administrado: <u>VENENO BOTÂNICO + SUCUAS fitotóxicas 985%</u>										Data: <u>06/06/17</u>									
Pesquisador Responsável: <u>FABIO H.D.M LIMA / MARIA APARECIDA P. BAKER</u>																			
Linhagem: <u>Swiss Webster</u>			Sexo: <u>MACHO</u>			Idade:			Via: <u>ORAL</u>		Vol.: <u>0,5 mL</u>		Diluição: <u>2000 mg/kg</u>						
DIA	1						2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	< 30'	60'	90'	120'	180'	240'													
Cabeça (E1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dorso (E2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cauda (E3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Rubrica	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u
Legenda: (S) Sintoma (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas																			
Obs.:																			

Fonte: (Próprio autor, 2017).

A necropsia foi realizada nos animais do grupo C e do grupo E apenas para a dosagem de 2000 mg/kg nos órgãos: baço, fígado, rins, estômago e intestino delgado. Não foram observadas alterações macroscópicas significativas em nenhum animal de ambos os grupos (grupo controle - C1, C2, C3 e grupo experimental - E1, E2 e E3) (ANEXO D)

No exame microscópico, em nenhum animal (C1, C2, C3, E1, E2 e E3), não foram encontradas alterações nos órgão coletados, apresentando resultados compatíveis com órgãos normais, ou seja, o fígado com integridade nos hepatócitos com presença de um ou dois núcleos (podendo conter um ou dois nucléolos e células de Kuppfer – nos sinusóides hepáticos – e veia centrolobular); baço com presença de cápsula de tecido conjuntivo denso, nódulos linfáticos, cordões esplênicos, sinusóides esplênicos, macrófagos, células e fibras reticulares íntegros; intestino delgado íntegro com presença de vilosidades e criptas intestinais com epitélio colunar absorptivo e células caliciformes; estômago com presença de fossetas gástricas, células mucosas superficiais, parietais e zimogênicas e rins normais com presença cápsula e corpúsculos renais com artéria, veias interlobares e túbulos renais íntegros (ANEXO D)

5.2 Ensaio para determinação da toxicidade dérmica aguda para o veneno botrópico de referência

O ensaio foi realizado com a dose inicial de 1000 mg/kg de BraBot/005 administrada a um camundongo Swiss Webster, fêmea (animal E) e em paralelo com um camundongo Swiss Webster fêmea do controle negativo, administrado com solução salina (animal C). Foram realizados os cálculos para determinação da área da superfície corporal total (ASCT) (Tabela 9) e recortada uma compressa de gaze no tamanho de 3,2 cm X 3,3 cm (10,56 cm²) correspondente à aproximadamente 10 % do ASCT para a administração das soluções para ambos os grupos. Após o acompanhamento, foi observado que não houve sinais evidentes de toxicidade, como perda de peso ou alterações nos sinais clínicos, apenas o aparecimento de eritema leve (sinal de irritação dérmica).

Tabela 9 - Área da superfície corporal total (ASCT) e peso (g) do camundongo Swiss Webster fêmea E administrado com a dose de 1000 mg/kg de BraBot/005 e camundongo fêmea C administrado com a solução salina no ensaio de toxicidade aguda dérmica

Animal	ASCT (cm ²)	10% da ASCT (cm ²)	Dia 0 (g)	Dia 1 (g)	Dia 7 (g)	Dia 14 (g)
E	104,65	10,465	39	38,5	39,5	40,5
C	103,75	10,375	38,5	38	39,5	41

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Foi realizado o ensaio com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 com grupos de cinco animais, uma vez que é a dose máxima preconizada pela diretriz nº 434 (OECD, 2004). Foram realizados o cálculo da ASCT de todos os animais e recortada uma compressa de gaze com base na média de 10% da ASCT para administração da solução, sendo 3,2 x 3,2 cm para o grupo C e 3,1 x 3,1 cm para o grupo E (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo para cálculo da área da superfície corporal total (ASCT) e a relação de 10% da ASCT do grupo C (controle) administrado com solução salina no ensaio de toxicidade aguda dérmica.

Animal	Peso (g)	ASCT (cm²)	10% da ASCT (cm²)
C1	40,5	107,32	10,732
C2	39,5	105,54	10,554
C3	35	97,37	9,737
C4	37,5	101,95	10,195
C0	36	99,21	9,921
Média do grupo	37,7	102,278	10,2278

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Tabela 11 - Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo para cálculo da área da superfície corporal total (ASCT) e a relação de 10% da ASCT do grupo E (experimental) administrado com 2000 mg/kg de BraBot/005 no ensaio de toxicidade aguda dérmica.

Animal	Peso (g)	ASCT (cm²)	10% da ASCT (cm²)
E1	33	93,62	9,362
E2	33	93,62	9,362
E3	35,5	98,29	9,829
E4	36,5	100,13	10,013
E0	34	95,5	9,55
Média do grupo	34,4	96,232	9,6232

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Os animais foram acompanhados por 14 dias e não foram observadas alterações nos sinais clínicos como a incapacidade de chegar à água ou à ração, perda excessiva de peso (Tabelas 12 e 13) convulsões, tremores substanciais ou incapacidade de sobreviver mesmo após tratamento, automutilações, infecções locais, feridas abertas ou ulcerações severas na pele, diminuição da ingestão de alimentos, proteção das partes afetadas e aversão ou evasão a retina ativa de estímulos, mudança comportamental ou qualquer tipo de sofrimento intenso (OECD,

2000) (Figuras 18; 19). Foi observada uma pequena perda de peso nos animais do grupo E

Tabela 12 - Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo C (controle) administrado com solução salina no ensaio de toxicidade aguda dérmica.

	Dia 0 (g)	Dia 1 (g)	Dia 7 (g)	Dia 14 (g)
C1	38,5	38	40	40
C2	39,5	39	40,5	41,5
C3	35	35	35	37,5
C4	37,5	36,5	36,5	37,5
C0	36	35	36,5	37,5
Média do grupo	37,7	35,9	37,7	38,8

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Tabela 13 - Peso por camundongo fêmea Swiss Webster e média de peso do grupo E (experimental) administrado com 2000 mg/kg de BraBot/005 no ensaio de toxicidade aguda dérmica.

Animal	Dia 0 (g)	Dia 1 (g)	Dia 7 (g)	Dia 14 (g)
E1	33	31,5	33,5	33,5
E2	33	31	30,5	32,5
E3	35,5	34,5	35	34,5
E4	36,5	35	36,5	36
E0	34	33,5	34	34,5
Média do grupo	34,4	33,1	33,9	34,2

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Figura 18 - Planilha de acompanhamento diário de camundongos fêmeas Swiss Webster durante 14 dias do grupo E administrado com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade dérmica aguda

PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA- Grupo Experimental (E)																			
Material Administrado: <i>solução fisiológica (BraBot/005) + salina 0,85%</i>														Data: <i>06/09/17</i>					
Pesquisador Responsável: <i>FABIO H. SILVA / MARIA TEREZA P. B. SILVA</i>																			
Linhagem: <i>Swiss</i>		Sexo: <i>fêmeas</i>		Idade: <i>11 semanas</i>		Via: <i>dérmica</i>		Vol.: <i>0,5 mL</i>		Diluição: <i>2000 mg/kg</i>									
DIA	1						2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	< 30'	60'	90'	120'	180'	240'													
E1	-	-	-	-	-	-	ER4	ER4	ER3	ER2	ER1	ER1	-	-	-	-	-	-	-
E2	-	-	-	-	-	-	ER2	ER2	ER2	ER1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-	ER2	ER2	ER1	ER1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	-	-	-	-	-	-	ER2	ER2	ER2	ER1	ER1	-	-	-	-	-	-	-	-
E0	-	-	-	-	-	-	ER4	ER4	ER3	ER2	ER1	ER1	-	-	-	-	-	-	-
Total	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rubrica	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>
Legenda: (S) Sintoma (S1- perda de peso; S2 - dor; S3- alteração comportamental) (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas (ER/ED) Sinais de irritação (ER1 - Pouco sinal de eritema; ER2 - Eritema bem definido; ER3 - Eritema moderado/severo; ER4 - Eritema severo ED1- Edema pouco perceptível; ED2 - Edema bem definido; ED3 - Edema moderado (prox. 1mm); ED4 - Edema severo (>1mm)).																			

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Figura 19 - Planilha de acompanhamento diário de camundongos fêmeas Swiss Webster durante 14 dias do grupo controle (C) administrado com solução salina no teste de toxicidade dérmica aguda com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005

PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA- Grupo Controle (C)																			
Material Administrado: <i>solução fisiológica</i>														Data: <i>06/09/17</i>					
Pesquisador Responsável: <i>FABIO H. SILVA / MARIA TEREZA P. B. SILVA</i>																			
Linhagem: <i>Swiss</i>		Sexo: <i>fêmeas</i>		Idade: <i>11 semanas</i>		Via: <i>dérmica</i>		Vol.: <i>0,5 mL</i>		Diluição: <i>0,85%</i>									
DIA	1						2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	< 30'	60'	90'	120'	180'	240'													
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rubrica	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>W</i>
Legenda: (S) Sintoma (S1- perda de peso; S2 - dor; S3- alteração comportamental) (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas (ER/ED) Sinais de irritação (ER1 - Pouco sinal de eritema; ER2 - Eritema bem definido; ER3 - Eritema moderado/severo; ER4 - Eritema severo ED1- Edema pouco perceptível; ED2 - Edema bem definido; ED3 - Edema moderado (prox. 1mm); ED4 - Edema severo (>1mm)).																			

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Entretanto, os animais apresentaram sinais de irritação cutânea, sendo o eritema bem definido em 3 animais (E2, E3 e E4) e severo em 2 animais (E1 e E0), não sendo observado a formação de edema (Figura 20) e após 7 dias todos os animais tiveram uma recuperação tecidual considerável (Figura 21). No oitavo dia, todos os animais apresentaram a pele visualmente íntegra.

Figura 20 - Grupo experimental de camundongos Swiss Webster fêmeas, após 24 horas de observação mostrando os animais E1 ao E0 em ordem crescente da esquerda para direita, administrados com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade dérmica aguda.



Fonte: (Próprio autor, 2017).

Figura 21 - Grupo experimental de camundongos Swiss Webster fêmeas, após 7 dias de observação mostrando os animais E1 ao E0 em ordem crescente da esquerda para direita, administrados com a dose de 2000 mg/kg de BraBot/005 no teste de toxicidade dérmica aguda.



Fonte: (Próprio autor, 2017).

A necropsia foi realizada nos animais do grupo C e do grupo E apenas para a dosagem de 2000 mg/kg nos órgãos: pele e anexos, baço, fígado e rins. Não foram encontradas alterações macroscópicas significativas em nenhum animal dos grupos

(grupo controle - C1, C2, C3, C4 e C0; grupo experimental – E1, E2, E3, E4 e E0) (ANEXO E)

No exame microscópico, em nenhum animal (C1, C2, C3, C4, C0, E1, E2, E3, E4 e E0) também não foram encontradas alterações nos órgãos coletados, apresentando resultados compatíveis com órgãos normais. O fígado apresentou integridade nos hepatócitos com presença de um ou dois núcleos (podendo conter um ou dois nucléolos e células de Kupffer – nos sinusóides hepáticos – e veia centrolobular); baço com presença de cápsula de tecido conjuntivo denso, nódulos linfáticos, cordões esplênicos, sinusóides esplênicos, macrófagos, células e fibras reticulares íntegros; rins normais com presença cápsula e corpúsculos renais com artéria, veias interlobares e túbulos renais íntegros e pele íntegra com epiderme constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, rico em folículos pilosos com derme e hipoderme com tecido conjuntivo frouxo, compatíveis com órgãos normais (ANEXO E).

5.3 Avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico dos ensaios realizados no INCQS

5.3.1 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 para resíduos do Ensaio de Determinação de Potência do Soro Antibotrópico

Abaixo os resultados dos 3 ensaios realizados com o *pool* das amostras 3167/16 a 3168/16; 3639/16 e 3640/16 e com a amostra 3787/16 em dias diferentes de acordo com a entrada no INCQS, sendo estes o grupo controle, concomitantemente com o grupo experimental, advindos da sobra da diluição do grupo controle previamente tratados em autoclave.

Observou-se que no grupo controle, para os três ensaios realizados para a determinação da potência do soro antibotrópico (soroneutralização), as amostras submetidas ao controle pelo LVBSH foram consideradas satisfatórias, apresentando o valor da DE_{50} dentro dos valores previstos na legislação ($>5,0$ mg/mL), DE_{50} igual a 6,55 mg/mL (Amostras 3167/16 e 3168/16), 7,29 mg/mL (3639/16 e 3640/16) e 7,74 mg/mL (3787/16) com o número de óbitos adequados para cada fator de diluição. No grupo de controle positivo destes ensaios com administração de $5DL_{50}$,

apresentaram óbitos acima de 80% para os ensaios das amostras 3167/16 e 3168/16 e 3639 e 3640/16 e de 100% para a amostra 3787/16. Com relação ao grupo experimental não foram observados óbitos (Tabelas 14, 15 e 16).

Tabela 14 - 1º Ensaio da Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Amostras 3167/16 e 3168/16) e ensaio com dose equivalente a 5DL₅₀ de BraBot/005 – Grupo Controle¹ e Grupo Experimental²

Caixa (8 animais cada)	Soro / Animal (µg)	48 horas (Vivos/Inoculados) Grupo I - Controle	48 horas (Vivos/Inoculados) Grupo II - Experimental
1	42,41	8/8	8/8
2	32,23	8/8	8/8
3	24,79	3/8	8/8
4	19,18	1/8	8/8
Caixa (10 animais cada)	Veneno / Animal (µg)	48 horas (Óbitos/Inoculações) Grupo I - Controle	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II - Experimental
5DL ₅₀	201,45	8/10	0/10

Fonte: (Próprio autor, 2017).

¹ Camundongos administrados com volume fixo da solução de BraBot/005 (2,4 mL) e volumes variáveis de salina e soro antibotrópico para o ensaio de Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Quadro 10) e volume de 2,4 mL de BraBot/005 e 3,6 mL de salina para o ensaio com 5DL₅₀ (Quadro 11)

² Solução previamente autoclavada proveniente do ensaio com o grupo controle

Tabela 15 - 2º Ensaio da Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Amostras 3639/16 e 3640/16) e ensaio com dose equivalente a 5DL₅₀ de BraBot/005 – Grupo Controle¹ e Grupo Experimental²

Caixa (8 animais cada)	Soro / Animal (µg)	48 horas (Vivos/Inoculações) Grupo I - Controle	48 horas (Vivos/Inoculados) Grupo II - Experimental
1	42,41	8/8	8/8
2	32,23	8/8	8/8
3	24,79	4/8	8/8
4	19,18	3/8	8/8
Caixa (10 animais cada)	Veneno / Animal (µg)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I - Controle	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II - Experimental
5DL ₅₀	201,45	8/10	0/10

Fonte: (Próprio autor, 2017).

¹ Camundongos administrados com volume fixo da solução de BraBot/005 (2,4 mL) e volumes variáveis de salina e soro antibotrópico para o ensaio de Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Quadro 10) e volume de 2,4 mL de BraBot/005 e 3,6 mL de salina para o ensaio com 5DL₅₀ (Quadro 11)

² Solução previamente autoclavada proveniente do ensaio com o grupo controle.

Tabela 16 - 3º Ensaio da Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Amostra 3787/16) e ensaio com dose equivalente a 5DL₅₀ de BraBot/005 – Grupo Controle¹ e Grupo Experimental²

Caixa (8 animais cada)	Soro / Animal (µg)	48 horas (Vivos/Inoculações) Grupo Controle	48 horas (Vivos/Inoculados) Grupo Experimental
1	42,41	8/8	8/8
2	32,23	8/8	8/8
3	24,79	6/8	8/8
4	19,18	3/8	8/8

Caixa (10 animais cada)	Veneno / Animal (µg)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I - Controle	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II - Experimental
5DL ₅₀	201,45	10/10	0/10

Fonte: (Próprio autor, 2017).

¹ Camundongos administrados com volume fixo da solução de BraBot/005 (2,4 mL) e volumes variáveis de salina e soro antibotrópico para o ensaio de Determinação da Potência do Soro Antibotrópico (Quadro 10) e volume de 2,4 mL de BraBot/005 e 3,6 mL de salina para o ensaio com 5DL₅₀ (Quadro 11).

² Solução previamente autoclavada proveniente do ensaio com o grupo controle.

5.3.2 Ensaio para determinação da inativação da toxicidade do BraBot/005 para resíduos do Ensaio de Determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico

Para a determinação da DL₅₀ do BraBot/005 foram realizados 3 ensaios ao longo de 1 ano, os quais serviram como grupo controle. Concomitantemente, foram realizados em paralelo os ensaios com o grupo experimental. Nos ensaios do grupo controle, foi aferida a potência do BraBot/005 a partir do resultado dos óbitos dos animais em cada diluição, sendo estes resultados plotados no gráfico de controle descritos no item 1.4.2.1. Foram obtidos os seguintes resultados da DL₅₀ do veneno botrópico: 43,92, 43,52 e 43,93 µg/0,5 mL respectivamente. Nos três ensaios do grupo experimental não foram observados óbitos e nem qualquer alteração nos sinais clínicos e comportamentais dos animais (Tabelas 17, 18 e 19).

Tabela 17 - 1º Ensaio da Determinação da Dose Letal Média do Veneno Botrópico de Referência BraBot/005 – Grupo Controle¹ e Grupo Experimental²

Caixa (10 animais cada)	Veneno / Animal (µg)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I - Controle	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II - Experimental
1	62,2	8/10	0/10
2	51,8	7/10	0/10
3	43,2	6/10	0/10
4	36	2/10	0/10
5	30	2/10	0/10
DL₅₀ (µg/0,5 mL)	-	43,92	-

Fonte: (Próprio autor, 2017).

¹ Camundongos administrados com volume variáveis de BraBot/005 e salina para o ensaio de Determinação da Dose Letal Média (Quadro 12)

² Solução previamente autoclavada proveniente do ensaio com o grupo controle

Tabela 18 - 2º Ensaio da Determinação da Dose Letal Média do Veneno Botrópico de Referência BraBot/005 – Grupo Controle¹ e Grupo Experimental²

Caixa (10 animais cada)	Veneno / Animal (µg)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I - Controle	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II - Experimental
1	62,2	9/10	0/10
2	51,8	8/10	0/10
3	43,2	5/10	0/10
4	36	2/10	0/10
5	30	3/10	0/10
DL₅₀ (µg/0,5 mL)	-	43,52	-

Fonte: (Próprio autor, 2017).

¹ Camundongos administrados com volume variáveis de BraBot/005 e salina para o ensaio de Determinação da Dose Letal Média (Quadro 12)

² Solução previamente autoclavada proveniente do ensaio com o grupo controle

TABELA 19 - 3º ENSAIO DA DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MÉDIA DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA BRABOT/005 – GRUPO CONTROLE¹ E GRUPO EXPERIMENTAL²

Caixa (10 animais cada)	Veneno / Animal (µg)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I - Controle	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II - Experimental
1	62,2	8/10	0/10
2	51,8	9/10	0/10
3	43,2	4/10	0/10
4	36	1/10	0/10
5	30	1/10	0/10
DL₅₀ (µg/0,5 mL)	-	43,93	-

Fonte: (Próprio autor, 2017).

¹ Camundongos administrados com volume variáveis de BraBot/005 e salina para o ensaio de Determinação da Dose Letal Média (Quadro 12).

² Solução previamente autoclavada proveniente do ensaio com o grupo controle.

5.3.3 Ensaio para determinação da inativação toxicológica do BraBot/005 e de outros resíduos oriundos dos ensaios descritos no Ensaio de Determinação da Potência do Soro Antibotrópico e no Ensaio de Determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico.

Constatou-se que a solução de BraBot/005 (1 mg/mL) obtida pela reconstituição do veneno botrópico liofilizado quando administrada por via IP aos 10 animais do grupo I (C), nos três ensaios realizados determinou o óbito de todos os animais nas primeiras 4.

Nos ensaios do grupo II (experimental), cujos produtos passaram pelo processo de autoclavação, não foram observados óbitos, assim como alterações nos sinais clínicos e comportamentais dos animais, tanto na solução de BraBot/005 reconstituído antes de ser autoclavado, quanto no BraBot/005 liofilizado reconstituído somente após a autoclavação (Tabelas 20, 21 e 22).

Tabela 20 - 1º Ensaio para avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico de referência BraBot/005 reconstituído na concentração de 1 mg/mL e do Liófilo do BraBot/005 - Grupo Controle e Grupo Experimental.

Caixa (10 animais cada)	Veneno (1 mg/mL)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I – Controle (Sem autoclavação)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II – Experimental (Com autoclavação)
a	Liófilo reconstituído salina	10/10	0/10
b	Liófilo	-	0/10

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Tabela 21 - 2º Ensaio para avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico de referência BraBot/005 reconstituído na concentração de 1 mg/mL e do Liófilo do BraBot/005 - Grupo Controle e Grupo Experimental.

Caixa (10 animais cada)	Veneno (1 mg/mL)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I – Controle (Sem autoclavação)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II – Experimental (Com autoclavação)
a	Liófilo reconstituído salina	10/10	0/10
b	Liófilo	-	0/10

Fonte: (Próprio autor, 2017).

Tabela 22 - 3º Ensaio para avaliação da inativação da toxicidade do veneno botrópico de referência BraBot/005 reconstituído na concentração de 1 mg/mL e do Liófilo do BraBot/005 - Grupo Controle e Grupo Experimental.

Caixa (10 animais cada)	Veneno (1 mg/mL)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo I – Controle (Sem autoclavação)	48 horas (Óbitos/Inoculados) Grupo II – Experimental (Com autoclavação)
a	Liófilo reconstituído salina	10/10	0/10
b	Liófilo	-	0/10

Fonte: (Próprio autor, 2017).

6 DISCUSSÃO

Atualmente não existem estudos acerca da atividade toxicológica do veneno da *B. jararaca* quanto a exposição dos trabalhadores na manipulação e no processo de descarte do veneno durante o controle de qualidade dos soros antiofídicos produzidos no país. Os ensaios para classificação da toxicidade aguda oral e dérmica permitiram o conhecimento e contribuiu para identificação e classificação toxicológica através da exposição por estas vias. Assim também, a avaliação da inativação da toxicidade do BraBot/005 dos ensaios realizados no INCQS permitiu assegurar o correto descarte dos resíduos gerados dos ensaios realizados na mesma instituição. Deste modo, não é possível a contextualização dos resultados com outros estudos.

Inicialmente, foi observada uma grande dificuldade em classificar o veneno botrópico quanto a origem, ou seja, se é um composto biológico ou químico. De fato, o veneno botrópico não é um agente patogênico, porém, segundo Hirata (2012a) pode-se considerá-lo como de origem biológica por ser proveniente de amostras de seres vivos. Entretanto, devido a natureza bioquímica do veneno botrópico (composto por cátions metálicos - Sódio, Zinco e Cálcio - nucleosídeos, carboidratos – na forma de glicoproteínas – aminoácidos, lipídios e metaloproteínas dependentes de zinco e cálcio (MARKLAND, 1998) e sua atividade tóxica (INCQS, 2015b), também é possível considerá-lo como produto químico. O estudo baseou-se na recomendação da IATA, que considera as toxinas oriundas de vegetais, bactérias ou animais que não contenham substâncias infecciosas como substâncias tóxicas. Sabe-se que a toxicidade é uma das características dos produtos químicos (BRASIL, 2004).

Após pesquisas em *sites* de empresas que manipulam substâncias químicas, foi encontrado na empresa Sigma-Aldrich, o *Material Safety Data Sheet* - MSDS (SIGMA-ALDRICH, 2018), equivalente a Ficha de Informação Sobre Produtos Químicos (FISPQ) no Brasil (BORBA et al., 2009), sobre as informações químicas do veneno da serpente *B. jararaca*. A ficha apresenta os valores de toxicidade por via intraperitoneal (IP), intracerebral (IC), subcutânea (SC) e intravenosa (IV). O ensaio de DL₅₀ pela via IP é realizado rotineiramente no INCQS (INCQS, 2017b). O estudo apresenta apenas o valor da toxicidade pela via IP e não foram avaliados os demais ensaios realizados pela empresa, pois baseou-se nas principais vias de exposição

do trabalhador: via oral, dérmica e inalatória (não realizada por inviabilidade de materiais).

Estudos recentes apontam que a toxicidade do BraBot/005 (*B. jararaca*), por via IP, em camundongos Swiss Webster apresenta uma DL₅₀ aferida de 40,29 µg/0,5 mL por camundongo (20 g) (ARAUJO *et al*, 2008, 2017) ou seja, DL₅₀ de 2,014 mg/kg, divergindo dos valores apresentados pela empresa Sigma-Aldrich, cuja DL₅₀, em camundongos, não disponível a linhagem, pela mesma via é de 1,2 mg/kg (SIGMA-ALDRICH, 2018).

Além disso, há uma discrepância considerável na temperatura de acondicionamento do veneno, sendo de 2 a 8 °C a recomendação da empresa Sigma-Aldrich (SIGMA-ALDRICH, 2018) e o compêndio oficial do Brasil indica o armazenamento a – 20 °C (BRASIL, 2010a).

6.1 Considerações sobre a classificação oral aguda segundo a diretriz OECD Nº 423

Os dados obtidos no estudo demonstraram que na dose máxima empregada de 2000 mg/kg por via oral, não houve qualquer alteração nos padrões comportamentais e nos sinais clínicos dos camundongos machos Swiss Webster. Os sinais mais evidentes relacionados a toxicidade não foram observados, tais como: incapacidade de acesso à água ou à ração, perda excessiva de peso, convulsões, tremores substanciais, automutilações, diminuição da ingestão de alimentos ou mudança comportamental (OECD, 2000). Os animais apresentaram ganho de peso e comportamento padrão da espécie. Acredita-se que a dose seja bem superior a 2000 mg/kg para causar algum efeito tóxico. Não se justificou a necessidade de continuidade do teste com a dose de 5000 mg/kg por não representar riscos durante a manipulação, uma vez que não é manuseado essa quantidade durante os ensaios ou por envio de amostras por qualquer meio de transporte, se for o caso. Desta forma, segundo o critério de classificação GHS, pode-se atribuir a categoria 5 (>2000 mg/kg) na toxicidade aguda do BraBot/005 por via oral (OECD, 2004).

6.2 Considerações sobre a classificação dérmica aguda segundo a diretriz OECD Nº 434

Inicialmente foi utilizado a dose de 1000 mg/kg para avaliar a toxicidade do BraBot/005 pela via dérmica, uma vez que não há informações acerca da toxicidade por esta via. Foi utilizado apenas um camundongo fêmea Swiss Webster para o grupo controle e outro para a exposição ao veneno. O animal exposto ao veneno apresentou sinais de irritação cutânea leve, com a presença de uma pequena região com eritema. Ambos os animais não tiveram perda de peso ou alterações nos sinais clínicos ou comportamentais. Os sinais clássicos de toxicidade esperados seriam a perda excessiva de peso com incapacidade de chegar à água ou à ração, diminuição da ingestão alimentar, convulsões, tremores substanciais, automutilações, feridas purulentas, ulcerações serveras ou mudança comportamental (OECD, 2000).

Uma vez estabelecido que a dose utilizada seria de 2000 mg/kg, foram empregos grupos de cinco animais para a realização dos ensaios experimentais e de controle negativo e realizada a observação clínica e controle do peso dos animais, sendo uma excelente ferramenta na avaliação toxicológica dos animais.

Após 24 horas de exposição ao veneno (grupo experimental) e à solução salina (grupo controle negativo), ambos os grupos tiveram uma perda não significativa de peso. Acredita-se que o estresse em decorrência do contato com o esparadrapo possa ter influenciado na ingestão de água e ração, pois os dois grupos apresentaram a tendência em retirar o aparato envolto na região do tórax e abdomem. O grupo controle não apresentou dermatite de contato por exposição ao esparadrapo e à compressa de gaze embebida em solução salina. Ao longo de 14 dias de observação não foi evidenciado um ganho expressivo de peso.

No estudo com os animais expostos ao veneno, evidenciamos a presença de dois animais com irritação dérmica intensa, com eritema severo e três animais com eritema bem definido. Nenhum apresentou edema, ulcerações e feridas purulentas. Após 14 dias de observação, evidenciou-se uma evolução substancial na recuperação do tecido. Não foram observados alterações nos sinais clínicos ou comportamentais após a retirada do esparadrapo. O acompanhamento do peso nos

permitiu avaliar o efeito tóxico do veneno, sendo observado a presença de três animais que perderam peso ao longo do tempo. Entretanto, segundo a OECD (2010), é necessário a perda excessiva de peso com incapacidade de chegar à água ou à ração, diminuição da ingestão alimentar, que não foi observado. Não se justificou a necessidade de continuidade do teste com a dose de 5000 mg/kg pelos mesmos motivos do ensaio da via oral. Desta forma, segundo o critério de classificação GHS, pode-se atribuir a categoria 5 (>2000 mg/kg) na classificação da toxicidade aguda do BraBot/005 por via dérmica (OECD, 2004)

A irritação dérmica de contato ocasiona uma resposta inflamatória, antes do aparecimento de erupções cutâneas, geralmente de 1 a 4 dias, em decorrência da exposição cutânea ao agente irritante. Caracteriza-se por edema (inchaço por acúmulo de líquido em resposta à inflamação), eritema (coloração avermelhada devido a vasodilatação), prurido (coceira), pápulas (lesões endurecidas) e descamação da pele, que podem surgir em decorrência da exposição aguda após o contato com algum irritante forte ou substância química caustica (LURATI, 2015). Um quadro mais grave é a corrosão dérmica, sendo definida por danos irreversíveis à pele, ocasionando necrose evidentemente perceptível. São tipificadas por úlceras, hemorragias, crostas sangrentas e após 14 dias de observação, áreas completas sem pelos (alopecia) e cicatrizes (OECD, 2015).

6.3 Considerações sobre a inativação da toxicidade do veneno botrópico

Nossos resultados mostraram que o veneno botrópico presente nos ensaios para determinação da potência do soro antibotrópico, na determinação da DL_{50} do BraBot/005 e em todos os demais rejeitos dos testes (frascos com veneno liofilizado e com a solução salina de BraBot/005 na concentração de 1 mg/mL) foram inativados após o processo de calor úmido (autoclavação) a 121 °C/ 60 min., ou seja, não foram observados óbitos nos ensaios, levando a concluir a inatividade da toxicidade.

Conforme orientações do Conama, os RSS necessitam de tratamento diferenciado no manejo até o descarte (BRASIL, 2005a). Desta forma, o processo de autoclavação, escolhido devido às características proteicas do veneno, quase 95%

do peso seco (MARKLAND, 1998), foi eficaz para garantir o descarte do resíduo, uma vez que houve a desnaturação da estrutura proteica.

7 CONCLUSÃO

- Os estudos aqui apresentados indicam que o BraBot/005 não apresenta riscos toxicológicos em potencial aos trabalhadores pela exposição aguda oral e dérmica, uma vez que os animais não apresentaram sinais de toxicidade por estas vias, principalmente quanto a perda excessiva de peso e alterações comportamentais. Entretanto foi observado a presença de irritação dérmica nos ensaios com 1000 e 2000 mg/kg de BraBot/005 em camundongos fêmeas, com recuperação no período de 14 dias.
- A inativação da toxicidade dos resíduos oriundos dos testes de controle da qualidade dos soros recebidos e analisados na instituição pelo processo de calor úmido (autoclavação) a 121 °C / 60 minutos foi eficaz.
- Estes dados apontam para uma necessidade de estudos acerca da exposição do veneno para outros ensaios tais como; irritação dérmica e ocular, toxicidade aguda inalatória e toxicidades crônicas por via oral, dérmica e inalatória.
- Com relação ao transporte do veneno, por via aérea ou terrestre, deve-se manter cautela, transportando em embalagens apropriadas de acordo com a maior classe de toxicidade por não se ter dados relativos a exposição por via inalatória, uma vez que é exigência as três vias de exposição. Embora, acredite-se que seja possível classificar o veneno como um agente não perigoso.
- Quanto aos resíduos, é possível atribuir ao veneno liofilizado, como uma agente sólido perigoso, classe I – não inerte, por apresentar solubilidade e toxicidade se em contato com a corrente sanguínea como demonstrados nos ensaios de determinação da DL₅₀ do BraBot/005 por via IP. Porém, o líofilo após o tratamento com calor úmido torna-se não perigoso, classe II – inerte.
- Recomendações básicas de biossegurança devem ser mantidas para assegurar a proteção à pessoa humana e ao meio ambiente, pois é necessária uma maior investigação por outras vias e formas de exposição.
- Este estudo permitiu a elaboração de um manual de biossegurança para manipulação e descarte do BraBot/005 no âmbito do INCQS – Fiocruz/RJ (APÊNDICE E), assim como a elaboração de uma ficha de informações sobre produtos químicos (Fispq) e pretende-se subsidiar novas pesquisas na área.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. Segurança em Biotérios. In: TEIXERA, P.; VALLE, S. (Orgs.). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. 2. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010, p.293-304.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: resíduos sólidos - classificação: apresentação. Rio de Janeiro, 2004.

ARAUJO, H. P. et al. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: the national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 502-514, 2008.

ARAUJO, H. P., et al. Interlaboratory study for the establishment of Brazilian *Bothrops* Reference Venom and Antivenom for potency evaluation of *Bothrops* antivenom. **Biologicals**, v. 49, p. 1-5, 2017.

BERNARDE, P.S. Serpentes Peçonhentas e Acidentes Ofídicos no Brasil. São Paulo: **Anolisbook**, 2014. P 9 -13.

BORBA, et al. Biossegurança e boas práticas laboratoriais. In: MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G., AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde**. Rio de Janeiro: Ed. EPSJV, v. 1, p. 21-66, 2009.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado Federal, 1988, 292 p.

_____. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria Nº 3214, de 08 de junho de 1978. Aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho. Alterada pela portaria nº 3751 de 23 de novembro de 1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 de novembro. 1990

_____. Ministério da Saúde. Portaria Nº 174 de 11 de novembro de 1996. Aprova as normas técnica de produção e controle de qualidade de soro antiofídicos, antitóxico e antirrábico, na conformidade do anexo desta página (ementa elaborada pela CDI/MS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Seção I, 56 p. Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de novembro. 1996.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 306, de 15 de julho de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, nº 237, Seção I, 49 p. Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de dezembro. 2004

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente Resolução Nº358, de 29 de Abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, nº 84, Seção I, 63-65 p. Poder Executivo, Brasília, DF, 04 de maio. 2005a

_____. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria Nº 485, de 11 de novembro de 2005. Aprova a Norma Regulamentadora n.º 32 (Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de novembro. 2005b

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 182 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

_____. Ministério da Saúde. **Biossegurança em saúde**: prioridades e estratégias de ação / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília, 2010b. 242 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde) .

_____. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014 e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de setembro. 2014

_____. Agência Nacional de Transportes Terrestres. Resolução Nº 5232, de 14 de dezembro de 2016. Aprova as instruções Complementares ao Regulamento Terrestre do Transporte de Produtos Perigosos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de dezembro. 2016

_____. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.349, de 14 DE setembro de 2017. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos elaborada em 2017, pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 de setembro. 2017a

_____. Ministério da Saúde. Portaria de consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 de outubro. 2017b.

BRAZIL, V. **A defesa contra o ophidismo**. São Paulo: Pocai & Weiss, 1911.

CALVETE, J. J., et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1736-1743, 2009.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E. M. (Org). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010.

CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, 2003.

CARVALHO, P. R.; COSTA, M. A. F. Segurança química: entre a experiência e a vivência sem limites. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Org). **Biossegurança**: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2010. 135-174 p.

CHIPPAUX, J. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515, 1998a.

CHIPPAUX, J, GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998b.

CHIPPAUX, J. Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e221, 2008.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (Brasil). **Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.cfmv.org.br/consulta/arquivos/1000.pdf>> Acesso: 20/01/2018

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia brasileira**, v. 4, n. 3, 2015. Disponível em: <<http://sbherpetologia.org.br/wp->

content/uploads/2017/04/Reptilia-Brazil-Costa-B%C3%A9rnils-2015.pdf>. Acesso em: 30 out. 2017.

DATASUS. **Sistema de informação de agravos de notificação (SINAN)**, 2016. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 01 out. 2016.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010a .v. 2 1289 p.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Comissão Técnica de Biossegurança. **Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2005. 64 p.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med**, v. 3, n. 6, p. e150, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M., et al. Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223-1235, 2010.

HIRATA, M. H. O laboratório de ensino e pesquisa e seus riscos. In: HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; FILHO, J. M. **Manual de Biossegurança**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2012a. p. 1-12.

HIRATA, R. D. C. Biossegurança em Laboratórios. In: HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C., FILHO, J. M. **Manual de Biossegurança**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2012b. p. 13-27.

INSTITUTO DE COMUNICAÇÃO E INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLOGIA EM SAÚDE. **Sistema de informações tóxico-farmacológicas (SINITOX)**. 2016. Disponível em:<http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Tabela10_2013.pdf> . Acesso em: 21 out. 2016.

_____. **Sistema de Informações Tóxico-Farmacológicas**. 2017. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/missao>>. Acesso em: 20 out. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3440.006**: determinação da dose letal 50 dos venenos *Crotalus durissus terrificus*

e *Bothrops jararaca* - in vivo. Rev. 06. Rio de Janeiro, 2017a. 16 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.3440.004**: determinação da potência do soro antiofídico – in vivo. Rev. 08. Rio de Janeiro, 2017b. 17 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3)

_____. **POP 65.1000.003**: manual de biossegurança. Rev. 6. Rio de Janeiro, 2016a. 18p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **Atividades**. Rio de Janeiro. Disponível em:

<https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=68>. Acesso em: 12 out. 2016b.

_____. **POP 65.1020.007**: plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde do Incqs. Rev. 00. Rio de Janeiro, 2015a. 21 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.1020.009**: descarte de resíduo químico- tóxico e/ou perigoso. rev 00. Rio de Janeiro, 2015b 14 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. Relatório do estudo colaborativo para a determinação da potência de um candidato a soro antiofídico de referência nacional bra/antibot/01, para a avaliação da metodologia da potência relativa e para reavaliação da potência do lote nº 05 do veneno botrópico de referência bra/bot/05. In: INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **Documento Interno**. Rio de Janeiro, 2014. 124 p.

INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION. **Dangerous goods regulations**. 58 th ed. Montreal, Canadá: International Air Transport Association, 2017. 918 p.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e218, 2008.

LURATI, A.R. Occupational risk assessment and irritant contact dermatitis. **Workplace Health & Safety**, Florida, v. 63, p. 81-87, 2015.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MISE, Y. F., et al. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 40, n. 5, p. 569-573, 2007.

NEVES, S. M. P., et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: Ed. FCF-IQ/USP, 2013. 216 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Environmental Health and Safety Publications. **Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation**. Paris, França, 2000. (Series on Testing and Assessment, No. 19).

_____. **OECD guideline for testing of chemicals**: acute oral toxicity – acute toxic class method. Paris, França, 2001. (OECD/OCDE, 423).

_____. **OECD guideline for testing of chemicals**: proposal for a new draft guideline 434: acute dermal toxicity – fixed dose procedure. Paris, França, 2004. (Draft Guidelin).

_____. **OECD guideline for testing of chemicals**: acute dermal irritation/corrosion. Paris, França, 2015. (OECD/OCDE, 404).

PALMA, M. S. A.; VITTA, P. B. D. Manuseio de produtos químicos e descarte de seus resíduos. In: HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; FILHO, J. M. **Manual de Biossegurança**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2012. P 67-106.

PORTAL DA SAÚDE. 2016a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/l2-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 01 out. 2016.

_____. 2016b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/2-Incidencia-Ofidismo-2000-2015.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2016.

ROCHA, J, L. C. **Efeitos da mitomicina-C tópica em queimadura de camundongos**. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2010.

SIGMA-ALDRICH. **Safety Data Sheet - Section 1**: identification of the substance/mixture and of the company/undertaking. 2018. Disponível: <<https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=V5625&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fv5625%3Flang%3Dpt>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

SIMONETTI, B. R. **Avaliação dos conhecimentos e procedimentos em biossegurança de trabalhadores de laboratórios nível de biossegurança 3**. 2014. 200f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, RJ, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista de espécie de répteis do Brasil 2005**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2015-03-Repteis.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2016.

SORO Antibotrópico (Pentavalente): imunoglobulina heteróloga contra o veneno de *Bhotrops sp*: 5 mg/mL. In: YAMAGUCHI, I.K. **Bula de remédio**. São Paulo: Instituto Butantan, 2017.

SOUZA, G. F. **Fatores de riscos ocupacionais e implicações à saúde do trabalhador em biotérios da Fiocruz Rio de Janeiro, RJ**. 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

TACONIC BIOSCIENCES. **Swiss webster outbred**. Disponível em: <<https://www.taconic.com/mouse-model/swiss-webster>>. Acesso em: 19 out. 2018.

TEIXEIRA, P.; BORBA, C. M. Riscos Biológicos em laboratórios de pesquisa. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Orgs). **Biossegurança**: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2010. p. 67-83.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “era do teste DL₅₀”. **Revista eletrônica de Farmácia**, v 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory biosafety manual**. 3rd ed. 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2018.

_____. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue**. World Health Organization, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2016.

_____. **Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins**. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/SnakeAntivenomGuideline.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2016.

_____. **WHO model list of essential medicines**. 20th Ed. 2017.

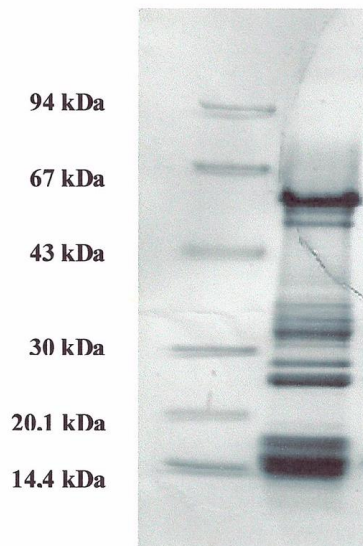
ANEXO A – Perfil eletroforético do BRABOT/005

PROCOLO II**Método:** ELETROFORESE (SDS-PAGE)**Referência:** LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-85.**Espécie:** *Bothrops jararaca* (Veneno Referência)**Amostra:** Lote 05**Data do Teste:** 30/042002**TIPO DE GEL:** Concentração () Única: _____(x) Gradiente: 7,5% a 17,5%

Concentração da amostra: 120 µg

Coloração: Coomassie B. Blue (x)

Prata ()

DOCUMENTAÇÃO DO GEL**Comentários:**

Total de 12 bandas protéicas.
5 bandas mais intensas nos pesos de :
62, 32, 28, 18 e 14.4 kDa.

PM

ANEXO B – CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-26/17

Certificamos que o protocolo (P-42/16-3), intitulado "ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BIOSSEGURANÇA PARA MANIPULAÇÃO E DESCARTE DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NO ÂMBITO DO INC FIOCRUZ/RJ", sob a responsabilidade de MARIA APARECIDA AFFONSO BOLLER, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/07/2019 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 20 Machos de Swiss Webster, Idade: 8 Semana(s).
- 20 Fêmeas de Swiss Webster, Idade: 8 Semana(s).

Mus musculus

- 56 Machos de Swiss Webster, Peso: 20,0000 Grama(s).
- 56 Fêmeas de Swiss Webster, Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 31 de julho

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA


Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096
31/07/2017

ANEXO C – Declaração de realização da necropsia e processamento dos tecidos pela CPEA/ICTB/FIOCRUZ



Coordenação de Pesquisa e Experimentação Animal/CPEA-ICTB

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que os camundongos (*Mus musculus*) pertencentes aos grupos controle e experimental do projeto intitulado “ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BIOSSEGURANÇA PARA MANIPULAÇÃO E DESCARTE DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NO ÂMBITO DO INCQS – FIOCRUZ/RJ” foram submetidos à necropsia e os seus respectivos tecidos processados pelo Laboratório de Histotécnica da Coordenação de Pesquisa e Experimentação Animal/CPEA - FIOCRUZ. Esclarecemos que o referido projeto é de autoria de Fábio Henrique Dias Martins Lima, sob a orientação do Dr. Armi Wanderley de Nóbrega, INCS-FIOCRUZ, licenciado pelo PROTOCOLO CEUA No. 42/16-3.

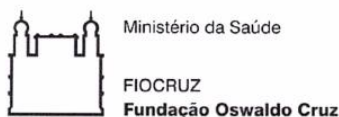
Igo Vieira de Souza
Responsável pela Laboratório de Histotécnica
CPEA/ICTB
Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Igo Vieira de Souza
MÉDICO VETERINÁRIO. CRMV/RJ: 9445
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
MATR. 1556019

Márcia Cristina Ribeiro Andrade
Responsável pela CPEA/ICTB
Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Márcia Cristina Ribeiro Andrade, PhD
MÉDICA VETERINÁRIA. CRMV/RJ: 4440
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
MATR. 1208830

ANEXO D – Laudo anatomopatológico do ensaio de toxicidade oral aguda



**Laboratório de Histotécnicas da Coordenação de Pesquisa e
Experimentação Animal/CPEA-ICTB**

Registro interno: 2017/076-081 **Registro externo:** C1,C2,C3,E1,E2, E3 **Exame:** Histopatológico

Material: Fígado, baço, estômago, intestino delgado e rins **Espécie:** Camundongo(*Mus musculus*)

Data de entrada: 20/06/2017

LAUDO ANATOMOPATOLÓGICO

Macroscopia

Não foram encontradas alterações macroscópicas significativas nos dois grupos de animais: controle (C1, C2 e C3) e no grupo experimental de toxicidade oral (E1, E2 e E3).

Microscopia (grupo controle e experimental)

Fígado – presença de hepatócitos com um ou dois núcleos, podendo conter um ou dois nucléolos, sinusóides hepáticos podendo ou não conter células de Kuppfer e veia centrolobular. Compatível com um fígado normal.

Baço – presença de cápsula de tecido conjuntivo denso, nódulos linfáticos, cordões esplênicos, sinusóides esplênicos, macrófagos, células e fibras reticulares. Compatível com um baço normal.

Intestino Delgado – presença de vilosidades e criptas intestinais, com epitélio colunar absorptivo e células caliciformes. Compatível com intestino delgado normal.

Estômago – presença de fossetas gástricas, células mucosas superficiais, parietais e zimogênicas. Compatível com um estômago normal.

Rins – presença de cápsula e corpúsculos renais, com artéria, veias interlobares e túbulos renais. Compatível com um rim normal.

Responsável técnico: Igo Vieira de Souza, Médico Veterinário/CRMV: 9445 - RJ

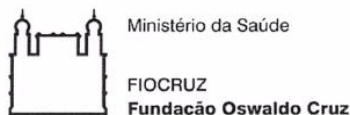
CPEA, ICTB-Fiocruz

Matrícula SIAPE: 1556019

Tel: (21) 3194-8446

Igo Vieira de Souza
Ass. / carimbo
MÉDICO VETERINÁRIO, CRMV/RJ: 9445
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
MATR. 1556019

ANEXO E – Laudo anatomopatológico do ensaio de toxicidade dérmica aguda



**Laboratório de Histotécnicas da Coordenação de Pesquisa e
Experimentação Animal/CPEA-ICTB**

Registro interno: 2017/092-101 **Registro externo:** C0,C2,C3,C4, E0, E1,E2, E3, E4
Exame: Histopatológico **Material:** Fígado, baço, pele e rim
Espécie: Camundongo (*Mus musculus*) **Data de entrada:** 20/09/2017

LAUDO ANATOMOPATOLÓGICO

Macroscopia

Não foram encontradas alterações macroscópicas significativas nos dois grupos de animais: controle (C0, C1, C2,C3 e C4) e no grupo experimental de toxicidade dérmica (E0, E1, E2, E3, E4).

Microscopia (grupo controle e experimental)

Fígado – presença de hepatócitos com um ou dois núcleos, podendo conter um ou dois nucléolos, sinusóides hepáticos podendo ou não conter células de Kuppfer e veia centrolobular. Compatível com um fígado normal.

Baço – presença de cápsula de tecido conjuntivo denso, nódulos linfáticos, cordões esplênicos, sinusóides esplênicos, macrófagos, células e fibras reticulares. Compatível com um baço normal.

Pele – epiderme constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, rico em folículos pilosos íntegros. Derme com tecido conjuntivo frouxo. Hipoderme com tecido conjuntivo frouxo. Compatível com uma pele normal.

Rins – presença de cápsula e corpúsculos renais, com artéria, veias interlobares e túbulos renais. Compatível com um rim normal.

Responsável técnico: Igo Vieira de Souza, Médico Veterinário/CRMV: 9445 - RJ
CPEA, ICTB-Fiocruz
Matrícula SIAPE: 1556019
Tel: (21) 3194-8446

Igo Vieira de Souza
 MÉDICO VETERINÁRIO, CRMV/RJ: 9445
 Ass. / carimbo  FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
 MATR. 1556019

APÊNDICE A - Planilha de acompanhamento diário de camundongos 14 dias - teste de toxicidade oral aguda - grupo controle (C)

<p align="center">PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA - Grupo Controle (C)</p>																					
Material Administrado:										Pesquisador Responsável:				Data:							
Linhagem:		Sexo:	Idade:		Via:	Vol.:		Diluição:													
DIA	< 30'	60'	90'	120'	180'	240'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Cabeça (C1)																					
Dorso (C2)																					
Cauda (C3)									:												
Total																					
Rubrica																					
<p>Legenda: (S) Sintoma (S1 perda de peso; S2- dor; S3 alteração comportamental; S4-outros) (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas</p>																					
Obs.:																					

APÊNDICE B - Planilha de acompanhamento diário de camundongos - 14 dias - teste de toxicidade oral aguda - grupo experimental (E)

PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA – Grupo Experimental (E)																
Material Administrado:												Data:				
Pesquisador Responsável:																
Linhagem:			Sexo:		Idade:		Via:		Vol.:		Diluição:					
DIA	1			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	< 30'	60'	90'	120'	180'	240'										
Cabeça (E1)																
Dorso (E2)																
Cauda (E3)							:									
Total																
Rubrica																
Legenda: (S) Sintoma (S1 perda de peso; S2- dor; S3 alteração comportamental; S4-outros) (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas																
Obs.:																

APÊNDICE C - Planilha de acompanhamento diário de camundongos -14 dias - teste de toxicidade dérmica aguda - grupo controle (C)

PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS - 14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA - Grupo Controle (C)																	
Material Administrado:												Data: / /					
Pesquisador Responsável:												Diluição:					
Linhagem:			Sexo:		Idade:		Via:		Vol.:								
DIA	1				2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	< 30°	60°	90°	120°													
C1																	
C2																	
C3																	
C4																	
C0																	
Total																	
Rubrica																	

Legenda: (S) Sintoma (S1 -perda de peso; S2 - dor; S3 - alteração comportamental) (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas (ER/ED) Sinais de Irritação (ER1 - Pouco sinal de eritema; ER2 - Eritema bem definido; ER3 - Eritema moderado/severo; ER4 - Eritema severo ED1 - Edema pouco perceptível; ED2 - Edema bem definido; ED3 - Edema moderado (prox. 1mm); ED4 severo (> 1mm)).

APÊNDICE D - Planilha de acompanhamento diário de camundongos - 14 dias - teste de toxicidade dérmica aguda - grupo experimental (E)

PLANILHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE CAMUNDONGOS 14 DIAS - TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA - Grupo Experimental (E)																		
Material Administrado:												Data:						
Pesquisador Responsável:																		
Linagem:		Sexo:		Idade:		Via:		Vol.:		Diluição:								
DIA	1					2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	< 30°	60°	90°	120°	180°													
E1																		
E2																		
E3																		
E4																		
E0																		
Total																		
Rubrica																		

Legenda: (S) Sintoma (S1 - perda de peso; S2 - dor; S3 - alteração comportamental) (M) Moribundo (+) Morte (-) Sem sintomas (ER/ED) Sinais de Irritação (ER1 - Pouco sinal de eritema; ER2 - Eritema bem definido; ER3 - Eritema moderado/severo; ER4 - Eritema severo ED1 - Edema pouco perceptível; ED2 - Edema bem definido; ED3 - Edema moderado (prox. 1mm); ED4 severo (> 1mm)).

APÊNDICE E – Manual de biossegurança para manipulação e descarte do veneno botrópico de referência no âmbito do INCQS - FIOCRUZ/RJ

Manual de Biossegurança na Manipulação e Descarte do Veneno Botrópico de Referência Nacional (BraBot/005).

1 INTRODUÇÃO À BIOSSEGURANÇA

A Biossegurança é um conceito amplo que pode ser definido como o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização, controle ou a eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos resultados (FIOCRUZ, 2005; *apud* SIMONETTI, 2014).

O laboratório é um ambiente hostil para os trabalhadores à medida que estão sendo expostos a inúmeros reagentes, soluções, equipamentos, pessoas entre outros. Neste sentido é imperativo contextualizar a biossegurança em sua visão estruturante que é o risco, perigo e o acidente. O perigo é uma possibilidade de causar danos, o risco é a probabilidade de concretização desse perigo e o acidente é a concretização desse risco (BORBA et al., 2009).

A Biossegurança transcende a manipulação de agentes químicos, biológicos, radioativos e demais agentes, pois todos os envolvidos na execução de atividades laboratoriais estão expostos a diversos riscos. Neste sentido, as manipulações de venenos e descarte dos resíduos provenientes destes devem seguir procedimentos que atendam a legislação, adotando medidas de boas práticas em laboratório e procedimentos técnicos de biossegurança. As atividades em laboratórios são desempenhadas segundo as boas práticas, normas e os procedimentos técnicos de biossegurança (TEIXEIRA, BORBA, 2010)

2 TIPOS DE RISCOS

Os acidentes e doenças decorrentes do serviço laboral constituem um problema de saúde considerável em todo o mundo e, historicamente, os trabalhadores da área da saúde não eram percebidos como uma classe

trabalhadora de alto risco. Estudos realizados nas últimas três décadas demonstraram dados alarmantes quanto aos acidentes de trabalho e doenças ocupacionais nesta categoria, uma vez que são expostos a inúmeros tipos de riscos (BRASIL, 2010a).

- *Riscos biológicos*

Os agentes biológicos representam um risco real ou iminente para o meio ambiente e ao homem, sendo necessário que sejam estabelecidas medidas para prevenção dos riscos em laboratórios de pesquisa. São agrupados em quatro classes de riscos (I, II, III e IV) com base na patogenicidade, virulência, endemicidade, modo de transmissão, profilaxia e terapêutica (TEIXEIRA, BORBA, 2010)

- *Riscos químicos*

Existem diversas substâncias químicas que não há certezas sobre seus efeitos ao homem, animais e ao meio ambiente. São manuseados nas mais diversas atividades (saúde, indústria, comércio e domicílio). As informações básicas a respeito dos efeitos sobre os seres vivos, ao ambiente de trabalho e ao meio ambiente devem ser disponibilizadas aos profissionais que utilizam os agentes químicos durante o manuseio, armazenamento e descarte, de modo que possam ser tomadas medidas eficazes com o objetivo de antever, prevenir e conduzir os acidentes (CARVALHO, COSTA, 2010).

Os agentes químicos podem ser considerados explosivos, oxidantes, inflamáveis, tóxicos, corrosivos, irritantes e perigosos ao meio ambiente (CARVALHO, COSTA, 2010).

- *Riscos físicos*

São os riscos provocados por algum tipo de energia, tais como: calor, frio, vibrações, ruídos, variações de pressão, umidade, radiações (ionizantes, não-ionizantes, ultravioleta) e outros (HIRATA, 2012).

- *Riscos de acidentes*

São todos os riscos que possam gerar acidentes ao manipular utensílios e equipamentos. Utensílios frágeis (vidraria), perfurocortantes (agulhas, bisturis,

equipamentos) ou equipamentos pesados, com engrenagens ou com gás comprimidos são suscetíveis aos acidentes (HIRATA, 2012).

- *Riscos ergonômicos*

Considera-se risco ergonômico qualquer fator que possa interferir nas características psicofisiológicas do trabalhador causando desconforto ou afetando sua saúde. São os riscos inerentes às condições de trabalho e que podem incluir aspectos relacionados ao levantamento, transporte e descarga de materiais, ao mobiliário, aos equipamentos e às condições ambientais do posto de trabalho e à própria organização do trabalho (BRASIL, 1990), o seja, esforço físico intenso, postura inadequada resultante de não-adequação de mobiliário, controle rígido de produtividade, longas jornadas de trabalho, monotonia e repetitividade (SOUZA, 2015).

3 PRÁTICAS SEGURAS NO LABORATÓRIO

Conjunto de ações que visam minimizar os trabalhadores a exposição a riscos no ambiente laboral, compreendendo a limpeza dos materiais, a separação e limpeza da área de trabalho, manuseio adequado das substâncias perigosas, uso adequado de equipamento de proteção individual (EPI) e coletivo (EPC) entre outras. A prevenção deve sempre ser pensada para o coletivo, porém está diretamente relacionada aos treinamentos dos profissionais de laboratório (TEIXEIRA, BORBA, 2010). Dentre as práticas seguras, temos:

- ✓ Conhecer os riscos de todo o processo de trabalho;
- ✓ Treinamento contínuo do pessoal de laboratório;
- ✓ Restrição à entrada de pessoas no laboratório, vedada aos profissionais treinados e/ou pessoas acompanhadas e cientes sobre os riscos;
- ✓ Proibido entrada de alimentos e pessoas fumando;
- ✓ Proibido trabalhar com feridas na mão ou no pulso;
- ✓ Cuidado com a formação de aerossóis
- ✓ Utilizar os EPI's durante o processo de trabalho;
- ✓ Utilizar EPC's sempre que forem necessários;

- ✓ Adotar práticas de higiene (lavar as mãos antes e após o processo de trabalho) e de segurança pessoal (não levar as mãos em partes desprotegidas do corpo, especialmente olhos e boca durante a manipulação de agentes de riscos);
- ✓ Conduzir os ensaios minimizando a formação de aerossóis;
- ✓ Vedados o reencape e a desconexão manual de agulhas;
- ✓ Trabalhar sempre acompanhado de pelo menos 1 pessoa.

3.1 Equipamento de Proteção Individual

Denomina-se EPI, todo dispositivo individual, de modo a garantir a integridade da saúde do trabalhador. É regulamentada pela Ministério do Trabalho e Emprego, pela Norma Regulamentadora NR-06, onde estão descritas as obrigações do empregado e empregador (BRASIL, 1990)

3.2 Equipamento de Proteção Coletivo (EPC)

São equipamento de uso no laboratório que tem a função de garantir em condições salubres para o operador do equipamento e demais colaboradores do laboratório (BRASIL, 1990)

3.3 EPI na manipulação do veneno botrópico de referência nacional (BraBot/005)

- ✓ Avental ou jaleco de mangas compridas;
- ✓ Calça comprida;
- ✓ Luvas de látex ou nitrílicas sobrepostas ao avental ou jaleco;
- ✓ Mascaras de proteção facial;
- ✓ Sapatos fechados;
- ✓ Pipetadores automáticos;

3.4 EPC na manipulação do veneno botrópico de referência nacional (BraBot/005)

- ✓ Capela de Exaustão;

- ✓ Chuveiro de emergência e lava-olhos com manutenção semanal.
- ✓ Extintores de pó químico “ABC” (não usar água pois o veneno é solúvel em água);
- ✓ Autoclave.

4 SEGURANÇA QUÍMICA DO VENENO BOTRÓPICO

4.1 Introdução

O veneno botrópico de referência nacional BraBot/005 é um produto tóxico, de origem animal (serpente *Bothrops jararaca*), cujas principais toxinas produzidas pelo animal são as fosfolipases A2 e metaloproteinases dependentes de zinco, que desempenham efeitos e sintomas importantes como (GUTIERREZ et al., 2006):

- Ação local - processos inflamatórios agudos, inchaço, bolhas, hemorragia, necrose do músculo esquelético podendo levar a invalidez permanente.
- Ação Sistêmica - hemorragia espontânea, hemorragia cerebral, coagulação intravascular disseminada, choque cardiovascular secundário, hipovolemia, vasodilatação e efeitos diretos no músculo do coração, rabdmiólise, insuficiência respiratória aguda, síndrome do desconforto e insuficiência renal aguda.

4.2 Armazenamento

O veneno botrópico de referência nacional deve ser armazenado em seus frascos identificados, fechados, liofilizados e a uma temperatura de – 20 °C (BRASIL, 2010b). Após a abertura do mesmo, deve-se armazenar o líófilo hermeticamente fechado nas mesmas condições acima. Caso seja realizada a diluição do veneno, este deve ser mantido a uma temperatura de 2 a 8 °C por até 45 dias, em frascos fechados e identificados.

O controle de acesso ao veneno deve ser rigoroso e somente por profissionais treinados.

4.3 Manuseio do veneno botrópico de referência nacional (BRABOT/005)

4.3.1 Procedimento no laboratório analítico

Todo procedimento deve ser realizado dentro da capela de exaustão.

- ✓ Utilizar os EPI's citados no item 3.3;
- ✓ Utilizar balança analítica com escudo de acrílico
- ✓ Utilizar papel para pesagem de uso laboratorial ou tubo erlenmeyer;
- ✓ Solubilizar o veneno em solução de uso, evitando a formação de aerossóis;
- ✓ Utilizar pipetadores automáticos e ponteiras e pipetas sorológicas descartáveis;
- ✓ Caso seja necessário homogeneizar a mistura em agitadores automáticos, devem-se manter os frascos fechados com tampa ou filme de parafina plástica com papel de uso laboratorial;
- ✓ Na movimentação do veneno no laboratório, deve-se manter as boas práticas de laboratório, evitando os riscos de queda (exemplos: utilização em estufas, transportes em maletas apropriadas para o biotério, armazenamento na geladeira etc).

4.3.2 Procedimento no biotério

Os animais representam um risco para os profissionais que os manipulam, mesmo sem que estejam infectados, pois podem carrear agentes patogênicos, como zoonóticos. As práticas exercidas em biotérios são executadas de acordo com as boas práticas, as normas e os procedimentos técnicos de biossegurança (INCQS, 2015c; SOUZA, 2015).

- ✓ Utilizar os EPI's recomendados para o trabalho no biotério, sendo exigido no mínimo:
 - 2 pares de luvas de látex ou nitrílicas;
 - Jaleco
 - Máscara
 - Touca

- Calça comprida
- Sapato fechado
- Sapatilha (protetor de calçado)

✓ Manusear os animais (contenção, inoculação, devolução para gaiola e outros procedimentos pertinentes ao biotério) com boas práticas em biotério, evitando possíveis mordeduras, arranhões e acidentes com perfurocortantes.

4.4 Descarte do veneno botrópico e resíduos

A Resolução nº 358/2005 do Conama e a Anvisa, por meio da Resolução RDC nº 306/2004, define como geradores de RSS todos os serviços relacionados ao atendimento à saúde humana ou animal, incluindo os serviços de laboratórios analíticos de produtos para saúde (BRASIL, 2004; 2005)

O artigo 21 da Resolução 358 do Conama determina a necessidade de tratamento e disposição final específico (BRASIL, 2005). Deste modo, o veneno botrópico, em todas as suas formas (liofilizado ou solubilizado) deverá ser submetido ao processo de autoclavação a 121 °C/ 60 minutos, garantindo assim a descontaminação.

Os perfurocortantes (seringas com agulhas e vidrarias) que contenham o veneno botrópico, devem ser descartados separadamente, imediatamente no local de sua geração (Laboratório analítico ou no biotério), acondicionados em recipientes, rígidos, resistentes à punctura, ruptura e vazamento, com tampa e devidamente identificados. É expressamente proibido o reaproveitamento dos recipientes e as agulhas devem ser descartadas juntamente com as seringas, sendo proibido o reencape ou retirada manual da mesma. Estes devem ser submetidos ao processo de autoclavação e encaminhados para incineração (INCQS,2015a; 2015b; 2016).

5 PRIMEIROS SOCORROS

Os primeiros socorros devem ser ministrados no momento do acidente e, dependendo da gravidade, o acidentado deverá ser encaminhado imediatamente ao

hospital mais próximo. As medidas devem ser conduzidas de acordo com as vias de contato:

- Inalação: Remover para local ventilado
- Contato com a pele: Lavar com água corrente. Retirar as roupas contaminadas.
- Contato com os olhos: Lavar com água corrente por 15 minutos.
- Ingestão: Dados não disponíveis.
- Em caso de contato com a corrente sanguínea procurar um serviço de saúde de grande porte imediatamente.

Informações pertinentes ao serviço de saúde:

- Tratamento com Soro Antibotrópico Pentavalente. Direcionar o tratamento de acordo com os sintomas e condições clínicas do paciente.

6 COMBATE A INCÊNDIO LABORATORIAL

Condições adversas podem acontecer em qualquer local e, para isso, é necessário conhecer as particularidades do ambiente. É recomendado as seguintes práticas (BRASIL, 2011):

- Programa de prevenção e combate a incêndio, incluindo o treinamento de pessoal habilitado a combater um princípio de incêndio e coordenar a evacuação da área, gerenciamento e manutenção dos sistemas de proteção contra incêndio instalado e o acesso para os equipamentos de combate a incêndio, entre outros.
- Utilização de extintor de pó químico seco

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É primordial que informação e a conscientização de todas as pessoas envolvidas na manipulação do BraBot/005 sobre os fatores de risco presentes no seu local de trabalho, tanto no laboratório analítico quanto no biotério, e o efeito destes sobre a sua segurança e saúde, são primordiais para que a sua adesão seja determinante e reverta em mudanças de comportamento que possam evitar a exposição desnecessária ao risco.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14725**: produtos químicos — Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente parte 2: sistema de classificação de perigo. Rio de Janeiro, 2009.

_____. **NBR 14725**: produtos químicos — informações sobre segurança, saúde e meio ambiente parte 3: rotulagem. Rio de Janeiro, 2012.

BORBA, et al. Biossegurança e boas práticas laboratoriais. *In*: MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde**. Rio de Janeiro: Ed. EPSJV, 2009 . v. 1, p. 21-66.

BRASIL. Agência Nacional de Transportes Terrestres. Resolução Nº 5232, de 14 de dezembro de 2016. Aprova as instruções Complementares ao Regulamento Terrestre do Transporte de Produtos Perigosos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 dez. 2016.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 306, de 15 de julho de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, nº 237, Seção I, 49 p. Poder Executivo, Brasília, DF, 10 dez. 2004.

_____. Ministério da Saúde. **Biossegurança em saúde**: prioridades e estratégias de ação / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010a. 242 p. : il. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente Resolução Nº358, de 29 de Abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, nº 84, Seção I, 63-65 p. Poder Executivo, Brasília, DF, 04 maio 2005.

_____. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria Nº 3214, de 08 de junho de 1978. Aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho. Alterada pela portaria nº 3751 de 23 de novembro de 1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 nov. 1990.

_____. Portaria Nº 485, de 11 de novembro de 2005. Aprova a Norma Regulamentadora nº 32 (Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 nov. 2005b.

_____. Portaria SIT nº 221, de 06 de maio de 2011. Aprova a Norma Regulamentadora nº 23 (Proteção contra incêndios). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de maio 2011.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010b. v. 2, p. 1289.

HIRATA. R. D. C. Biossegurança em laboratórios. In: HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; FILHO, J. M. **Manual de Biossegurança**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2012. p. 13-27.

INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (IATA). **Dangerous goods regulations**. 58 th Ed. Montreal, Canadá: International Air Transport Association, 2017. 918 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.1000.003**: manual de biossegurança. Rev. 6. Rio de Janeiro, 2016. 1-18p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.1020.009**: descarte de resíduo químico- tóxico e/ou perigoso. Rev 00. Rio de Janeiro, 2015a 1-14p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.1020.007**: Plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde do incqs. Rev. 00. Rio de Janeiro, 2015b. 1-21 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.3340.002**: Boas práticas em experimentação animal Rev. 12. Rio de Janeiro, 2015c. 1-16 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med**, v. 3, n. 6, p. e150, 2006.

SIMONETTI, B. R. **Avaliação dos Conhecimentos e procedimentos em biossegurança de trabalhadores de laboratórios nível de biossegurança 3.** 2014. 200f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, RJ, 2014.

SOUZA, G. F. **Fatores de riscos ocupacionais e implicações à saúde do trabalhador em biotérios da Fiocruz Rio de Janeiro, RJ. 2015.** 130 f. Dissertação (Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

TEIXEIRA, P.; BORBA, C. M. Riscos biológicos em laboratórios de pesquisa. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Orgs.). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar.** 2. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010. p. 67-83.

APÊNDICE A do Manual de Biossegurança para manipulação e descarte do veneno botrópico de referência no âmbito do INCQS - Fiocruz/RJ - Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (Fispq)

1- Identificação do produto e da empresa

- Nome do produto: Veneno de serpente *Bothrops jararaca*

Código interno de identificação do produto: BraBot/005

- Principais usos recomendados para a substância: Teste de potência para o Soro Antibotrópico Pentavalente e Soro Antibotrópico conjugado com outra espécie

- Nome da empresa produtora: Instituto Butantan – Indústria Brasileira

- Endereço: Av. Vital Brasil, 1500 –Butantã – São Paulo – SP. CEP 05503-900

CNPJ: 61.821.344/0001-56

Nome do depositário: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fiocruz.

Telefone para contato: (21) 3865-5267

Telefone para emergências: 0800-722-6001 (Centro de Informação e Assistência Toxicológica - Ciat)

E-mail: sinitox@cict.fiocruz.br

2- Identificação de perigos

2.1 - Classificação da substância (de acordo com a ABNT NBR 14725-2): Tóxico, Categoria 5 2.2 –

Elementos de rotulagem (de acordo com a ABNT NBR 14725-3): Não exigido

Palavras de advertência: Atenção

Frase de perigo: H303 Pode ser nocivo se ingerido / H313 Pode ser nocivo em contato com a pele / H333 Pode ser nocivo se inalado

Frases de precaução: P304 + P312

3- Composição e informações sobre os ingredientes

3.1 - Substância: - Nome químico ou comum: Veneno de *Bothrops jararaca*

Sinônimo: Não disponível

- Impurezas que contribuam para o perigo: Não disponível

4- Medidas de primeiros socorros

4.1 - Medidas de primeiros socorros:

- Inalação: Remover para local ventilado.
- Contato com a pele: Lavar com água corrente. Retirar as roupas contaminadas.
- Contato com os olhos: Lavar com água corrente em abundância
- Ingestão: Não disponível

Em caso de mal-estar, consultar um médico.

4.2 - Sintomas e efeitos mais importantes: Local: processos inflamatórios agudos, inchaço, bolhas, hemorragia, necrose do músculo esquelético podendo levar a invalidez permanente. / Sistêmica: hemorragia espontânea, hemorragia cerebral, coagulação intravascular disseminada, choque cardiovascular secundário, hipovolemia, vasodilatação e efeitos diretos no músculo do coração, rabdomiólise, insuficiência respiratória aguda, síndrome do desconforto e insuficiência renal aguda.

4.3 - Notas para o médico: Tratamento com Soro Antibotrópico Pentavalente. Direcionar o tratamento de acordo com os sintomas e condições clínicas do paciente.

5- Medidas de combate a incêndio

5.1- Meios de extinção: Pó químico Tipo ABC

5.2- Perigos específicos da substância: Não disponível

5.3- Medidas de proteção da equipe de combate a incêndio: Utilizar equipamento de proteção individual e equipamento de proteção respiratória autônoma

6- Medidas de controle para derramamento ou vazamento

6.1 - Precauções pessoais, equipamento de proteção e procedimentos de emergência

6.1.1 - Para o pessoal que não faz parte dos serviços de emergência: Evitar o contato com o produto. Não inalar o pó do veneno

6.1.2 - Para o pessoal do serviço de emergência: Utilizar equipamento de proteção individual e equipamento de proteção respiratória

6.2 - Precaução ao meio ambiente: Não enviar o produto para redes de águas residuais

6.3 - Métodos e materiais para a contenção e limpeza: Remover com álcool etílico 70%.

Recolher o resíduo para eliminação posterior

7- Manuseio e armazenamento

7.1- Precauções para o manuseio seguro: Manipular o produto respeitando as regras gerais de biossegurança

7.2- Condições de armazenamento seguro, incluindo qualquer incompatibilidade: Manter as ampolas íntegras. Temperatura de – 20 °C

8- Controle de exposição e proteção individual

8.1 - Parâmetros de controle: Não disponível

8.2 - Medidas de controle de engenharia: Manipular o produto em capela de exaustão, de forma a manter a concentração de vapores/poeiras inferior ao limite de tolerância

8.3 - Medidas de proteção pessoal:

- Proteção dos olhos/face: Óculos de segurança
- Proteção da pele: Luvas de proteção de nitrila
- Proteção respiratória: Máscara contra pó
- Perigos térmicos: Não disponível

9- Propriedades físico-químicas

- Aspecto: sólido, pó amarelo claro
- Odor: próprio
- pH: Não disponível
- Ponto de fusão: Não disponível
- Ponto de ebulição: Não disponível
- Ponto de fulgor: Não disponível
- Taxa de evaporação: Não disponível
- Inflamabilidade: Não disponível
- Limite inferior/superior de inflamabilidade ou explosividade: Não disponível
- Pressão de vapor: Não disponível
- Densidade de vapor: Não disponível

- Densidade: Não disponível
- Solubilidade: Não disponível
- Coeficiente de partição – n-octanol/água: Não disponível
- Temperatura de autoignição: Não disponível
- Temperatura de decomposição: Não disponível
- Viscosidade: Não disponível

10- Estabilidade e reatividade

- 10.1 - Estabilidade química: Estável
- 10.2 - Reatividade: Não disponível
- 10.3 - Possibilidade de reações perigosas: Não disponível
- 10.4 - Condições a serem evitadas: Não disponível
- 10.5 - Materiais incompatíveis: Não disponível
- 10.6 - Produtos perigosos da decomposição: Não disponível

11- Informações toxicológicas

- Toxicidade aguda:
 - Oral > 2000 mg/kg (camundongos)
 - Dérmica > 2000 mg/kg (camundongos)
 - Inalatória: Não disponível
- Corrosão / irritação da pele: Não disponível
- Lesões oculares graves / irritação ocular: Não disponível
- Sensibilização respiratória ou à pele: Não disponível
- Mutagenicidade em células germinativas: Não disponível
- Carcinogenicidade: Não disponível
- Toxicidade à reprodução: Não disponível
- Toxicidade para órgãos - alvo específico – exposição única: Não disponível
- Toxicidade para órgãos - alvo específico – exposição repetida: Não disponível
- Perigo por aspiração: Não disponível

12- Informações ecológicas

- 12.1 - Ecotoxicidade: Não estão disponíveis dados quantitativos sobre os efeitos ecológicos.

- 12.2 - Persistência e degradabilidade: Não disponível
- 12.3 - Potencial bioacumulativo: Não se prevê qualquer bioacumulação
- 12.4 - Mobilidade no solo: Não disponível
- 12.5 - Outros efeitos adversos: Não disponível

13- Considerações sobre tratamento e disposição

- 13.1 - Métodos recomendados para destinação final:
- Produto: Autoclavação a 121 °C/ 60 minutos ou incinerar
 - Restos de produtos: Autoclavação a 121 °C/ 60 minutos ou incinerar
 - Embalagem usada: Autoclavação a 121 °C/ 60 minutos ou incinerar.

14- Informações sobre transporte

- 14.1 - Regulamentações nacionais e internacionais:
- Terrestre: Código Agência Nacional de Transporte Terrestre (ANTT): 3462
 - Aéreo: Código IATA: 3462
- 14.2 - Para produto classificado como perigoso para o transporte:
- Número ONU: 3462
 - Nome apropriado para embarque: TOXINAS EXTRAIDAS DE ORGANISMOS VIVOS, SÓLIDAS, N.E.
 - Classe/subclasse de risco principal e subsidiário: 6.1
 - Número de risco: 66
 - Grupo de embalagem: I
 - Perigo ao meio ambiente: Não disponível

15- Informações sobre regulamentações

- 15.1 - Regulamentações específicas de segurança, saúde e meio ambiente para o produto químico:
- Produto Tóxico

16- Outras informações:

Grupo de embalagem I foi atribuído por ausência dos valores para exposição inalatória