

**INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE
QUALIDADE EM SAÚDE - INCQS/FIOCRUZ**

**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA
QUALIDADE DE PRODUTOS, AMBIENTES E SERVIÇOS
VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

**ESTABELECIMENTO DO SORO ANTICROTÁLICO
DE REFERÊNCIA NACIONAL**

DALVIM PEREIRA DOS ANJOS

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA AFFONSO BOLLER

**MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL EM QUALIDADE DE
PRODUTOS EM SAÚDE**

RIO DE JANEIRO / RJ: DEZEMBRO / 2006

DALVIM PEREIRA DOS ANJOS

**ESTABELECIMENTO DO SORO ANTICROTÁLICO
DE REFERÊNCIA NACIONAL**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária como requisito parcial à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Orientadora: MARIA APARECIDA AFFONSO BOLLER.

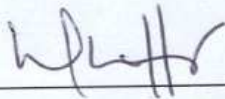
Rio de Janeiro, dezembro de 2006

DALVIM PEREIRA DOS ANJOS

ESTABELECIMENTO DO SORO ANTICROTÁLICO DE REFERÊNCIA NACIONAL


Esta monografia foi julgada adequada à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária e aprovada em sua forma final pelo Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Rio de Janeiro, 06 de dezembro de 2006.



MARIA APARECIDA AFFONSO BOLLER

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



ALEXANDRE ALVES DE SOUZA DE OLIVEIRA DIAS

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



HUMBERTO PINHEIRO DE ARAUJO

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

FICHA CATALOGRÁFICA

Anjos, Dalvim Pereira dos.

Estabelecimento do Soro Anticrotálico de Referência Nacional./Dalvim Pereira dos Anjos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006.

xiv.25p.tab.graf.

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller

Dissertação (especialização) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, INCQS, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, 2006

1. Soro Anticrotálico . 2. Padrão de Referência Nacional – Dissertação

I. Boller, Maria Aparecida Affonso II. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária . III.Título.

À minha esposa Rosileia e aos meus filhos Jorge Henrique e Lucas Vinicius, por sua compreensão e apoio na elaboração deste trabalho, que ocupou sempre preciosas horas de convivência familiar.

AGRADECIMENTOS

À Maria Aparecida Affonso Boller, minha orientadora.

Aos meus colegas do Setor de Soros Antipeçonhentos (Departamento de Imunologia/INCQS): Ivani Cutis dos Santos e Elizabeth Porto Reis Lucas .

Ao Alexandre Alves O. Dias, pelo apoio técnico, científico e profissional e em especial, pela boa vontade, atenção dispensada, disposição e grande ajuda nas sugestões e correções.

Ao Humberto Pinheiro de Araújo, pelas indicações, colaboração, revisão e atenção dispensadas.

Ao Wlamir Corrêa de Moura, pela atenção e sugestões.

Ao João Ferreira Martins pelo espírito de companheirismo e colaboração.

À minha Instituição, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, e a minha Unidade, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, pelas facilidades que me foram proporcionadas e que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

A todos os demais aqui não mencionados, que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para a estruturação e sucesso dessa dissertação.

***“Todas as substâncias são venenos. Não existe nada
que não seja veneno. Somente a dose certa
diferencia o veneno do remédio”***

Paracelsus (médico e sábio suíço – 1493 a 1541)

RESUMO

De acordo com o levantamento realizado em 2003 pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), o número de acidentes por serpentes peçonhentas foi de 6266 casos, o que equivale a 7,58% dos casos de intoxicação humana no Brasil, enquanto que no mesmo ano, somente a produção de soro anticrotático foi de 55375 ampolas, atendendo satisfatoriamente a demanda nacional deste produto (SINITOX, 2003a).

Atualmente o INCQS realiza o ensaio de potência absoluta para a determinação da potência dos soros anticrotáticos utilizados pela Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde.

O objetivo deste estudo foi estabelecer no INCQS, um soro anticrotático de referência nacional, pela determinação da média ponderada dos resultados de dose efetiva 50% (DE50), através da realização de oito ensaios válidos utilizando metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira (2001) e pelo Procedimento Operacional Padrão 65.3440.005 - "Ensaio de Potência para o Soro Anticrotático *in vivo*". O soro anticrotático de referência foi denominado BRA/ANTICROT/001 e o valor de sua potência ficou determinado em 2,2 µg/dose.

É esperado que utilização de um ensaio de potencia relativa, determinando a potencia de amostras de soro anticrotático frente a um soro de referência, permita uma diminuição no número de ensaios inválidos e, conseqüentemente, uma diminuição do número de animais de laboratório utilizados.

Palavras-Chave: soro anticrotático; padrão de referência nacional; dose efetiva 50 %.

ABSTRACT

In 2003, the Brazilian National System for Toxic-Pharmacologic Information (SINITOX) reported 6266 cases of poisonous snake bites accidents, that represented 7,58% of all intoxication cases in Brazil, while in the same year, the national production of anti-crotalic sera was 55375 ampoules, that was a enough supply for the national demand.

Nowadays, for batch release, INCQS, the National Control Laboratory of Brazil, uses an absolute potency assay for the anti-crotalic sera to be utilized by the General Coordination of the National Program of Immunizations from the Ministry of Health.

The purpose of this study was to establish at INCQS, a national reference for anti-crotalic serum, by determining a weighted mean from the Effective Dose 50 (ED50), results, performing 8 independent assays, carried out following the Brazilian Pharmacopoeia (2001) and the INCQS SOP 65.3440.005 – “*In vivo* potency assay for anti-crotalic serum”. The anti-crotalic standard serum batch number was BRA/ANTICROT/001 and it was assigned a potency of 2,2 µg/dose to it.

It is waited that the use of a relative potency test for anti-crotalic serum, testing sample sera against a standard, will allow diminishing the number of invalid assays and a consequent diminishing in the overall number of animals used.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01 – Acidentes de Intoxicação Humana por Regiões Brasileiras	02
Tabela 02 – Zonas de Ocorrência de Acidentes por Intoxicação Humana no Brasil	04
Tabela 03 – Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro	06
Tabela 04 – Serpentes do grupo crotálico (Brasil)	08
Tabela 05 – Número de Ampolas de Soros para Tratamento de Acidentes Ofídicos	09
Tabela 06 – Número de Amostras de Soro Anticrotálico Recebidas no INCQS	10
Tabela 07 – Fases do Processo de Produção de Soro Anticrotálico	12
Tabela 08 – Esquema de Diluição do Ensaio de Soroneutralização	15
Tabela 09 – Resultados da Determinação da DE ₅₀	17
Tabela 10 – Cálculo do Log Decimal dos Resultados da Determinação da DE ₅₀	18
Tabela 11 – Combinação Ponderada de Ensaio	19
Tabela 12 – Cálculo do Antilog da DE ₅₀ do Soro Anticrotálico BRA/ANTICROT/001	20

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 01	– Acidentes de Intoxicação Humana por Regiões Brasileiras	03
Gráfico 02	– Zonas de Ocorrência de Acidentes por Intoxicação Humana no Brasil	05
Gráfico 03	– Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro	07
Gráfico 04	– Número de Amostras de Soro Anticrotálico Recebidas no INCQS - 2000/2006	10
Gráfico 05	– Número de Ampolas Referentes às Amostras de Soro Anticrotálico Recebidas no INCQS – 2000/2006	10
Gráfico 06	– Resultados da Determinação da DE ₅₀	17

LISTA DE SIGLAS

BRA/ANTICROT/001	– Soro Anticrotático de Referência Nacional Lote 001
CECAL	– Centro de Criação de Animais de Laboratório
CENEP	– Centro Nacional de Epidemiologia
CGPNI	– Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações
CQ	– Controle da Qualidade
DE ₅₀	– Dose Efetiva 50 %
DL ₅₀	– Dose Letal 50 %
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FNS	– Fundação Nacional de Saúde
FUNED	– Fundação Ezequiel Dias/MG
GL	– Grau de Liberdade
GT-Vac	– Grupo Técnico de Soros e Vacinas
IB	– Instituto Butantan/SP
INCQS	– Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IVB	– Instituto Vital Brazil/RJ
LIC	– Limite Inferior de Confiança
LOG	– Logaritmo
LSC	– Limite Superior de Confiança
POP	– Procedimento Operacional Padrão
POT	– Potência
REBLAS	– Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos
SAL	– Serviço de Animais de Laboratório
SGA	– Sistema de Gerenciamento de Amostras
SES-RJ	– Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro
SINITOX	– Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Etapas da Produção de Soro Anticrotálico	11
1.2. O Mecanismo de Ação do Veneno Crotálico	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivo Específico	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÕES E CONCLUSÃO	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

As serpentes pertencem a subordem ofídia, ordem squamata e classe reptilia, onde suas características principais são a ausência de membros locomotores, pálpebras móveis e orifício auditivo e uma característica especial que faz com que tenham uma grande abertura da mandíbula, possibilitando engolir presas maiores que sua boca. Habitam todas as regiões da Terra, como mares, terra e rios, sendo mais encontradas em climas quentes, mas aparecem em climas temperados ou frios (Ferrarezzi, 1994).

Desde a antigüidade o homem sempre sofreu envenenamentos causados por picadas de animais peçonhentos, que são os que produzem substâncias tóxicas e apresentam um aparelho especializado para inoculação desta substância que é o veneno, através de glândulas que se comunicam com dentes ocos, ou ferrões, ou agulhões, por onde o veneno passa ativamente (EMBRAPA, 2006).

Baseado nos primeiros trabalhos realizados pelo francês Albert Calmette, nos quais descreveram-se que os soros são utilizados para tratar intoxicações provocadas pelo veneno de animais peçonhentos, foram desenvolvidos estudos sobre soros contra o veneno de serpentes, descobrindo a sua especificidade, ou seja, cada tipo de veneno ofídico requer um soro específico, preparado com o veneno do mesmo gênero de serpente que causou o acidente (Nogueira, 2004).

O Instituto Butantan foi criado por Vital Brazil em fevereiro de 1901 para a produção do soro antipestoso, no combate a epidemia de peste bubônica que surgia no Porto de Santos. A prioridade inicial do Instituto era produzir soros antivenenos com especificidade para serpentes da América do Sul (Rosenfeld & Vital Brazil, 1969a). Em 1984, foi lançado o Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos, para atender à demanda nacional por estes produtos e a eliminação da importação, sendo relevante a participação do Instituto Butantan (IB/SP), além do Instituto Vital Brazil (IVB / RJ) e da Fundação Ezequiel Dias (FUNED / MG).

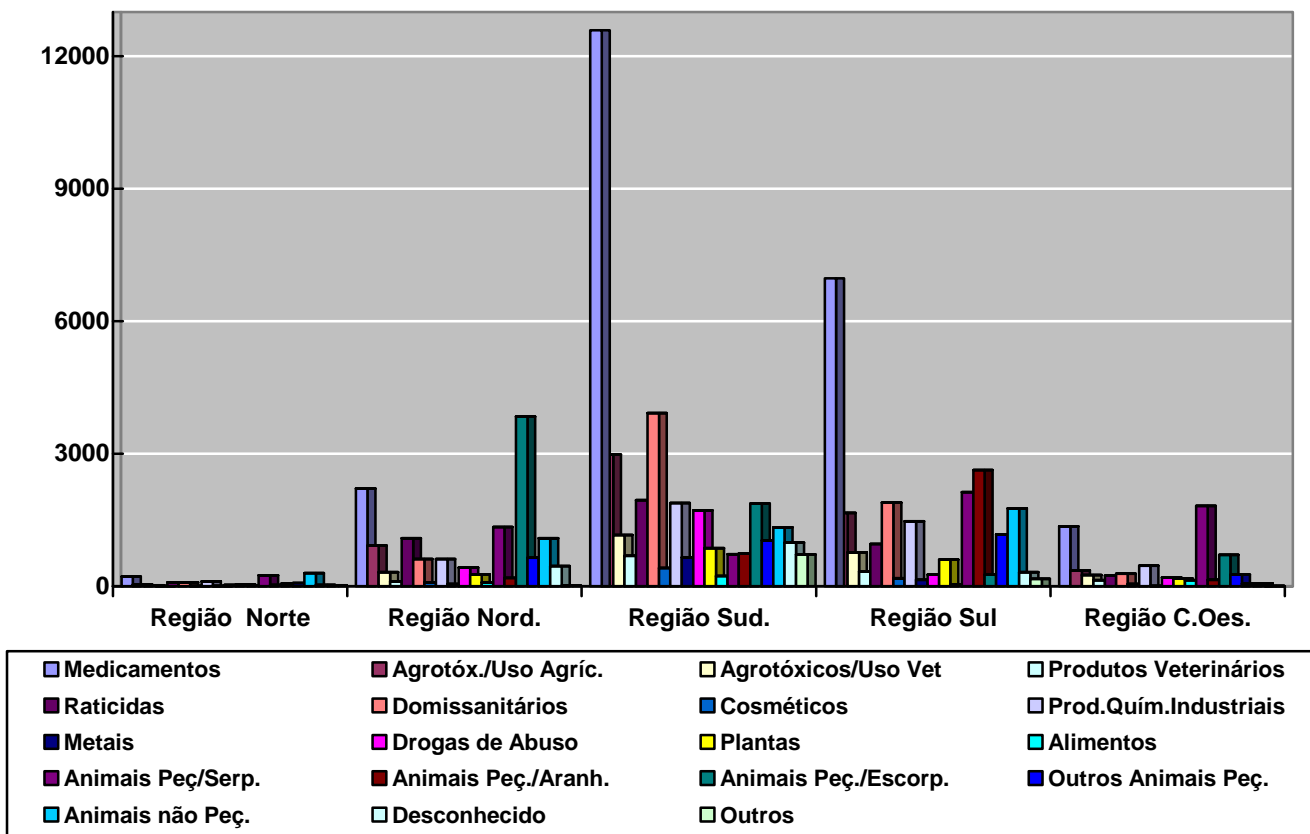
Dentre os acidentes por animais peçonhentos, o ofídico é o principal deles, pela sua freqüência e gravidade. Segundo a Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde, ocorre em todas as regiões e estados brasileiros e é um importante problema de saúde, quando não se institui o tratamento de forma precoce e adequada (**tabela e gráfico 01**).

Tabela 01- Acidentes de Intoxicação Humana por Regiões Brasileiras-2003

Agente	Região Norte	Região Nord.	Região Sud.	Região Sul	Região C.Oes.	Brasil nº	Brasil %
Medicamentos	220	2207	12589	6974	1358	23348	31,23
Agrotóx./Uso Agríc.	35	920	2978	1657	355	5945	7,18
Agrotóxicos/Uso Vet	21	317	1158	769	254	2519	3,04
Prod. Veterinários	7	107	687	336	139	1276	1,54
Raticidas	90	1088	1946	958	242	4324	5,23
Domissanitários	86	615	3922	1889	285	6797	8,22
Cosméticos	7	85	413	184	54	743	0,90
Prod.Quím.Indust.	107	617	1887	1470	467	4548	5,50
Metais	5	54	650	142	11	862	1,05
Drogas de Abuso	26	422	1717	260	195	2660	0,30
Plantas	43	271	866	604	171	1955	2,36
Alimentos	24	86	229	37	135	511	0,62
Animais Peç/Serp.	249	1340	726	2132	1819	6266	7,58
Animais Peç./Aranh.	30	188	742	2632	145	3737	4,52
Animais Peç./Escorp.	63	3844	1869	264	712	6752	8,16
Outros Animais Peç.	76	642	1034	1171	259	3182	3,84
Animais não Peç.	295	1087	1330	1762	56	4530	5,47
Desconhecido	30	454	982	321	67	1854	2,24
Outros	20	17	718	164	8	947	1,02
Total nº	1434	14361	36443	23746	6732	82716	

Fonte: FIOCRUZ/SINITOX (a)

Gráfico 01- Acidentes de Intoxicação Humana por Regiões Brasileiras - 2003



Fonte: MS/FIOCRUZ/SINITOX (a)

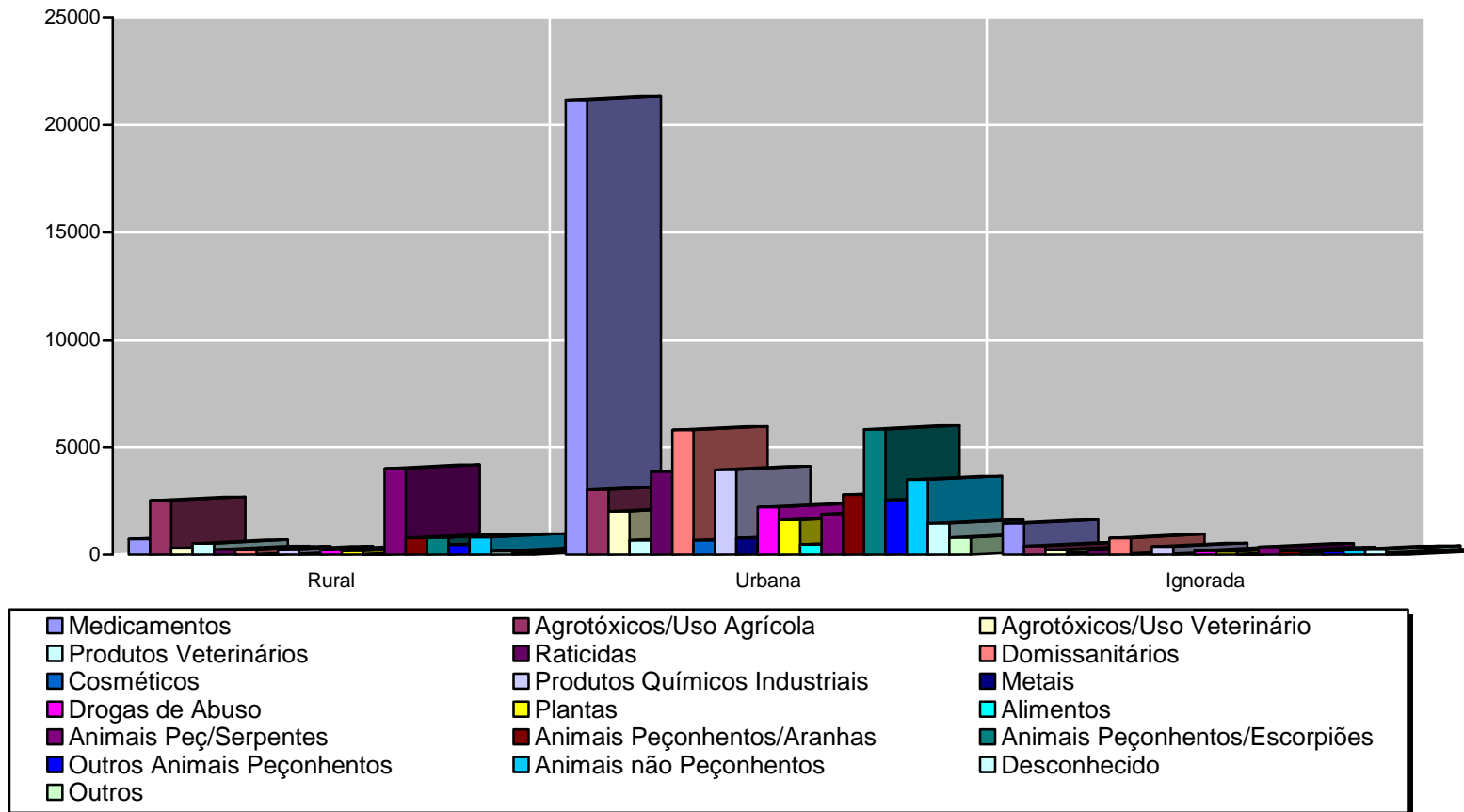
Os acidentes ofídicos possuem uma taxa de letalidade mundial de 2,3% (Castro, 2003), enquanto que no Brasil é de 0,4% (Portal Saúde, 2006a), onde se observa que os acidentes ocorrem mais na zona rural que na zona urbana. **(tabela 02 e gráfico 02).**

Tabela 02 – Zonas de Ocorrência de Acidentes por Intoxicação Humana no Brasil - 2003

Agente	Zona			Total	Total
	Rural	Urbana	Ignorada	nº	%
Medicamentos	725	21171	1452	23348	28,23
Agrotóxicos/Usos Agrícola	2519	3023	403	5945	7,19
Agrotóxicos/Usos Veterinário	290	2025	204	2519	3,05
Produtos Veterinários	525	678	73	1276	1,54
Raticidas	238	3866	220	4324	5,23
Domissanitários	217	5803	777	6797	8,22
Cosméticos	13	670	60	743	0,90
Produtos Químicos Industriais	220	3949	379	4548	5,50
Metais	49	773	40	743	1,04
Drogas de Abuso	218	2216	185	4548	3,17
Plantas	181	1613	161	862	2,36
Alimentos	22	476	13	2620	0,62
Animais Peç/Serpentes	4013	1890	363	6266	7,58
Animais Peçonhentos/Aranhas	780	2784	173	3737	4,52
Animais Peçonhentos/Escorpiões	793	5835	124	6752	8,16
Outros Animais Peçonhentos	465	2550	167	3182	3,85
Animais não Peçonhentos	812	3488	230	4530	5,48
Desconhecido	156	1457	241	1854	2,24
Outros	55	802	90	947	1,14
Total nº	12291	65069	5356	82716	
Total %	14,86	78,67	6,48	100	

Fonte: FIOCRUZ/SINITOX (b)

Gráfico 02 - Zonas de Ocorrência de Acidentes por Intoxicação Humana no Brasil



Fonte: FIOCRUZ/SINITOX (b)

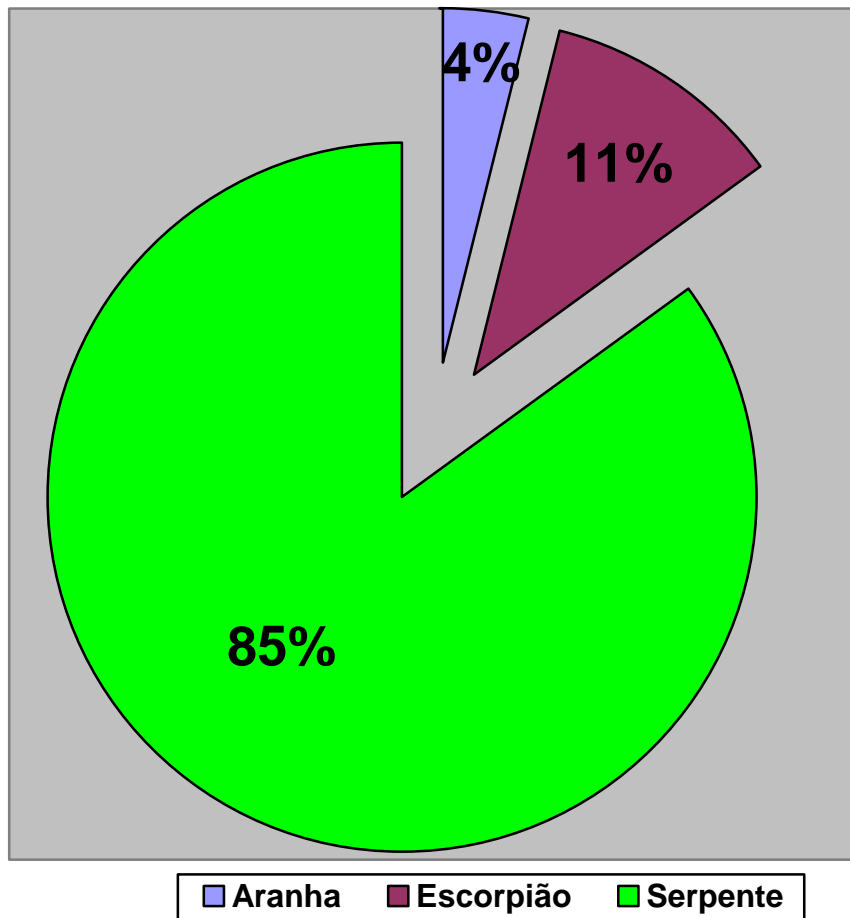
No Estado do Rio de Janeiro, os acidentes ofídicos lideram a lista de acidentes por animais peçonhentos (**tabela 03 e gráfico 03**):

Tabela 03 – Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro- 2003

Ano	Aranha	Escorpião	Serpente	Total %
1990	33	96	733	85
1991	84	248	924	74
1992	60	201	974	79
1993	64	188	971	79
1994	82	132	979	82
1995	55	129	906	83
1996	49	109	724	82
1997	58	112	734	81
1998	60	95	513	77
1999	56	83	664	83
2000	56	87	705	83
2001	57	95	697	82
TOTAL	714	1575	9524	81

Fonte: SES-RJ

Gráfico 03 – Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro - 2003



Fonte: SES-RJ

Apesar da maioria dos acidentes ser classificada como leve e a letalidade geral como baixa, o tempo decorrido entre o acidente e o atendimento, além do tipo de envenenamento são de fundamental importância, podendo elevar a letalidade em até oito vezes, como no envenenamento crotálico, caso o atendimento seja realizado de 6 a 12 horas após o acidente (Portal Saúde, 2005b). De acordo com o Guia de Vigilância Epidemiológica, o único tratamento específico, disponível desde 1895, ainda é a soroterapia, que consiste na aplicação de um soro constituído por um concentrado de anticorpos e que deve ser administrado ao paciente o mais precocemente possível (FNS 2006a).

Há 5 subespécies de cascavéis no país, sendo a *Crotalus durissus terrificus* a serpente que apresenta maior importância médica (Pinho *et al*, 2000).

Tabela 04 - Serpentes do grupo crotálico (Brasil)

NOME CIENTÍFICO	NOMES POPULARES	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
<i>Crotalus durissus terrificus</i>		
<i>Crotalus durissus cascavella</i>		
<i>Crotalus durissus horridus</i>	cascavel maracambóia boicininga	Em todo o país, exceto áreas florestais e zona litorânea
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>		
<i>Crotalus willardi obscurus</i>		

Fonte: FNS (2006b)

Nos primórdios, estudos envolvendo os soros e vacinas produzidos, não obedeciam às normas de qualidade, segurança e eficácia que são requeridas hoje para produtos farmacêuticos (WHO, 1969). Desde então, concentraram-se esforços para a melhoria de todo o processo de fabricação. Um dos principais avanços foi o desenvolvimento da soroterapia, que consiste na aplicação no paciente, de um soro contendo um concentrado de anticorpos. A soroterapia tem a finalidade de combater doenças específicas como as moléstias infecciosas, ou um agente tóxico específico como os venenos ou toxinas. Os soros são produtos de origem biológica usados no tratamento de doenças. Eles contêm anticorpos necessários para combater uma doença ou intoxicação, ou seja, eles possuem efeito curativo (Jorge MT *et al*, 1986). O soro usado no tratamento contra picadas de cobra cascavel, contém anticorpos específicos que neutralizam o efeito tóxico do veneno injetado na vítima. Os acidentes caracterizam-se pela sintomatologia sistêmica exuberante, com poucas manifestações locais.

Um soro antiveneno ideal deve ser seguro e eficaz, sem provocar efeitos adversos quando administrado por via sistêmica. Deve apresentar alta pureza e

potência, com um mínimo de conteúdo de proteínas totais. O soro deve ser dado em doses muito altas e imediatamente, pois seu efeito é neutralizar a peçonha (**tabela 05**).

Verifica-se que após 6 a 12 horas do acidente aumentam os riscos de complicações.

Tabela 05 - Número de ampolas de soros para tratamento de acidentes ofídicos

SERPENTE	Classificação e nº de ampolas			TIPO DE SORO
	Leve	Moderado	Grave	
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	5	10	20	Anticrotático ou Antibotrópico-crotático

Fonte: FUNED (2006a)

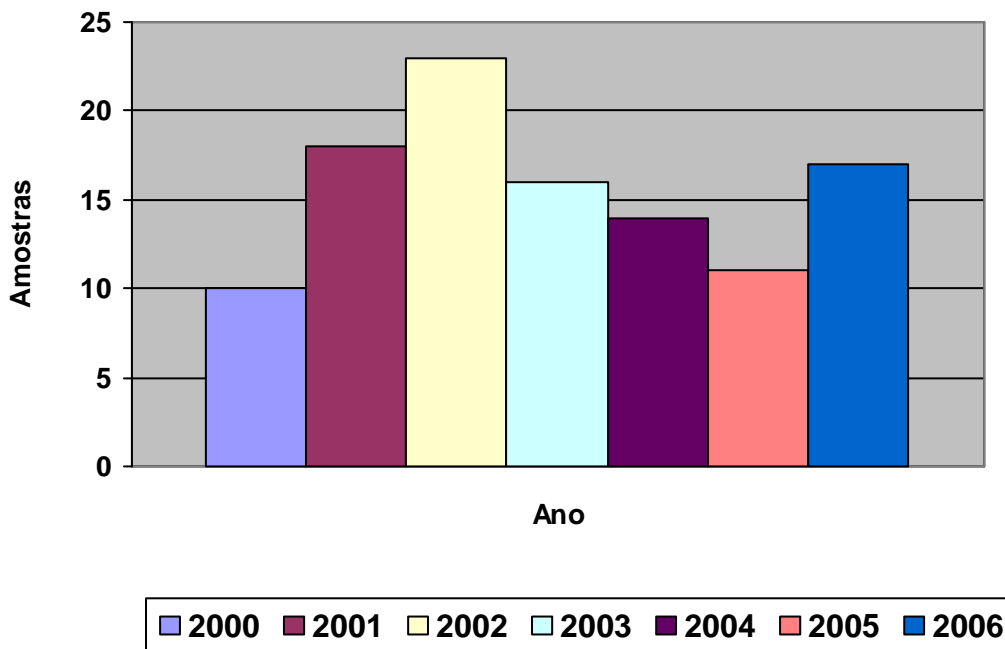
O soro anticrotático é uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas de eqüinos hiperimunizados, com venenos de serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente por “cascavel” (FUNED, 2006b). Apesar da melhora da estabilidade do soro purificado e também do crescimento populacional em centros urbanos em função do êxodo rural, a produção de antivenenos vem se mantendo estável ao longo dos anos (**tabela 06 e gráfico 04**).

Tabela 06 – Número de Amostras de Soro Anticrotático Recebidas no INCQS – 2000/2006

Ano	Amostras	Ampolas
2000	10	39806
2001	18	69978
2002	23	74561
2003	16	55375
2004	14	79806
2005	11	44479
2006	17	71540

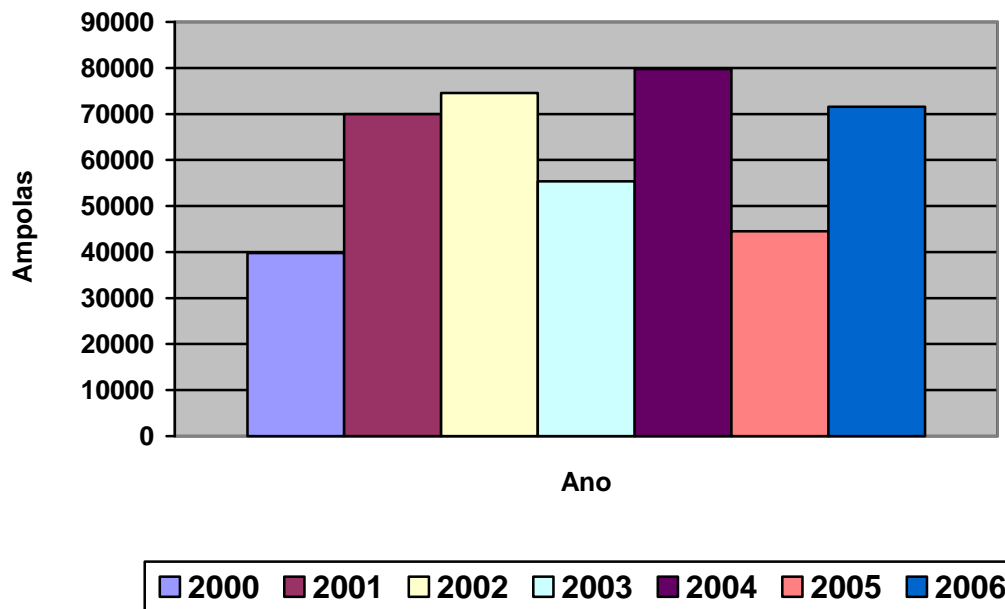
Fonte: SGA /INCQS/FIOCRUZ

Gráfico 04 – Número de Amostras de Soro Anticrotálico Recebidas no INCQS – 2000/2006



Fonte: SGA /INCQS/FIOCRUZ

Gráfico 05 – Número de Ampolas Referentes às Amostras de Soro Anticrotálico Recebidas no INCQS – 2000/2006



Fonte: SGA /INCQS/FIOCRUZ

1.1 Etapas da Produção de Soro Anticrotálico

A primeira etapa da produção de soros antipeçonhentos é a extração da peçonha (Instituto Butantan, 2006a) e a produção de soros obedece às seguintes etapas (**tabela 06**):

1 – Após a extração, o veneno é liofilizado (antígeno), diluído e injetado em cavalos, em doses adequadas. Este processo leva 40 dias e é chamado hiperimunização.

2 - É realizada uma sangria exploratória, retirando uma amostra de sangue para medir o teor de anticorpos produzidos em resposta às injeções do antígeno.

3 - Quando o teor de anticorpos atinge o nível desejado, é realizada a sangria final, retirando-se cerca de quinze litros de sangue de um cavalo de 500 kg em três etapas, com um intervalo de 48 horas.

4 - No plasma são encontrados os anticorpos. O soro é obtido a partir da purificação e concentração desse plasma.

5 - As hemácias são devolvidas ao animal, em um processo chamado plasmaferese. Esta técnica de reposição reduz os efeitos colaterais provocados pela sangria do animal.

6 - No final do processo, o soro obtido é submetido aos seguintes testes de controle da qualidade: Identificação; Atividade Biológica, para a verificação da quantidade de anticorpos produzidos; Esterilidade, para a detecção de eventuais contaminações durante a produção; Inocuidade, que é um teste de segurança para o uso humano; Pirogênio para a detecção da presença de substâncias que provocam alterações de temperatura; e os Testes Físico-Químicos: teor de sulfato de amônio, pH, determinação do volume médio, teor de cloreto de sódio, fenol, nitrogênio protéico e proteínas, para quantificar os componentes do soro.

Tabela 07 – Fases do Processo de Produção de Soro Anticrotálico

	FASE	OBJETIVO	MECANISMO	C. Q
1	Tamponação do plasma	Melhorar a qualidade	Adicionar buffer ácido cítrico pH 4,8	Verificar o pH
2	Purificação do plasma	Conservar e manter estável	Adicionar fenol e centrifugar	Analisar teor de fenol
3	Desnaturação das proteínas	Precipitar e eliminar a albumina e pigmentos	Adicionar sulfato de amônia e centrifugar	Analisar teor de sulfato de amônia
4	Tamponação e sanilização da suspensão de proteínas	Otimizar a digestão	Adicionar ácido clorídrico ou fosfato de cálcio pH 3,2 e cloreto de sódio e centrifugar	Verificar o pH
5	Filtração molecular	Eliminar imunoglobulinas	Purificar por cromatografia	Verificar a turbidez
6	Diálise	Eliminar resíduos de sulfato de amônia	Filtrar em tubos de hemodiálise	Analisar teor de sulfato de amônia
7	Clarificação	Eliminar a turbidez	Adicionar hidróxido de alumínio gel	Analisar teor de hidróxido de alumínio
8	Esterilização	Purificar o produto	Adicionar etanol	Analisar teor de etanol
9	Estabilização e preservação	Estabelecer a validade do produto	Adicionar timerosal	Analisar teor timerosal
10	Padronização do produto final	Verificar parâmetros de qualidade	Coletar amostras do bulk final	Analisar o bulk final

Fonte: FUNED (2006b)

1.2 O Mecanismo de Ação do Veneno Crotálico

O veneno das serpentes do gênero *Crotalus* foi descrito como capaz de produzir efeito hemolítico e neurotóxico no homem (Rosenfeld, 1971b). O encontro de níveis séricos muito elevados de creatinoquinase (CK), desidrogenase láctica (DHL), aldolase e aspartase aminotransferase (AST) em pacientes picados por cascavel, permitiu que, em 1980, fosse relatada pela primeira vez, a existência de efeito miotóxico provocado pelo veneno da cascavel da América do Sul (Azevedo-Marques & Hering, 1980b).

A comprovação da existência de agressão ao tecido muscular nos acidentes crotálicos, veio a ser realizada alguns anos após a publicação de relato referente a distúrbios na regulação da calcemia, em 2 pacientes que apresentaram (IRA) insuficiência renal aguda (Azevedo-Marques, 1976a). Atualmente entende-se que os sintomas e sinais apresentados pelos pacientes picados pela *Crotalus durissus terrificus* são conseqüentes às atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante do veneno (Cupo, 1990).

O mecanismo de ação do veneno crotálico é marcado por uma ação proteolítica, coagulante e hemorrágica, que causa um quadro clínico com manifestações locais e sistêmicas características (Melgarejo, 2006). A ação proteolítica compreende lesões locais e necroses dos tecidos. Tem patogênese complexa devido a ação de proteases, hialuronidases e toxinas pró-coagulantes do veneno. A ação coagulante se processa por dois mecanismos isolados, algumas toxinas ativam o fator X da cascata de coagulação enquanto outras (trombin-like) apresentam ação de trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. As manifestações hemorrágicas são decorrentes da ação das hemorraginas sobre os capilares. Os principais sintomas são dor, edema evidente que ultrapassa o local da picada, alterações hemorrágicas locais e sistêmicas.

O acidentado pode não sentir dor ou ser de pouca intensidade, os sintomas conseqüentes podem ser mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, vômitos, sonolência, secura da boca, fácies miastêmicas, alteração do diâmetro pupilar, oftalmoplegia, visão dupla e aumento do tempo de coagulação. O tratamento deve ser feito através da administração do soro anticrotálico por via intravenosa, variando a dose dependendo da gravidade da picada. A hidratação do paciente é importante, deve ser induzida a diurese osmótica, e manter o pH urinário acima de 6,5 pois a urina ácida aumenta a precipitação intratubular de mioglobina (Instituto Buntantan, 2006b).

O veneno das serpentes do gênero *Crotalus*, apresenta três ações: a Ação Neurotóxica, que ocorre devido a fração crotoxina, uma neurotoxina de ação pré-simpática que atua nas terminações nervosas inibindo a ação da acetilcolina, sendo o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular, o que vai ocasionar as paralisias motoras; a Ação Miotóxica, que produz lesões de fibras esqueléticas com liberação de enzimas e mioglobina para o soro sendo posteriormente excretadas pela urina. Ainda não está identificada a fração do veneno que produz esse efeito miotóxico sistêmico e a Ação Coagulante, onde o consumo de fibrinogênio pode levar a incoagulabilidade sangüínea, geralmente sem redução do número de plaquetas (Azevedo-Marques *et al*, 2003c).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral, produzir e estabelecer a potência, através de testes com resultados consistentes, do soro anticrotálico de referência nacional, BRA/ANTICROT/001.

2.2 Objetivo Específico

Este trabalho tem como objetivo específico, realizar 8 (oito) titulações independentes, com resultados satisfatórios para a determinação da DE₅₀ pelo método *in vivo*, preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição e pelo POP 65.3440.005 - "Ensaio de Potência para o Soro Anticrotálico *in vivo*", em um pool produzido no INCQS, contendo 297 ampolas de 10 mL de soro anticrotálico provenientes de amostras enviadas pelos produtores, para análise de orientação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado um *pool* de 297 ampolas de 10 mL de soro anticrotálico, dos três diferentes produtores nacionais.

A metodologia utilizada consistiu na diluição de uma alíquota do *pool* a 1:10 em solução fisiológica 0,85 %. O veneno crotálico de referência utilizado no ensaio foi diluído a 1:100, adicionando 1 mL de salina ao frasco original do veneno (1:10), homogeneizando-o até o desaparecimento total dos grumos (10 mg/mL) e fazendo uma nova diluição com salina até chegar a 1:100 (100 mg/mL). A soroneutralização do soro anticrotálico candidato a referência diluído e o veneno de referência diluído foi realizada de acordo com o esquema de diluição da **tabela 08** utilizando o fator de diluição de 1,2. O volume do veneno de referência será constante e cada animal inoculado deverá receber cinco Doses Letais 50% (DL₅₀).

A atividade neutralizante do soro frente ao respectivo veneno é determinada com base na soroneutralização *in vitro* e posterior inoculação pela via intraperitoneal (IP) em camundongos suscetíveis (Farmacopéia Brasileira, 2001).

Tabela 08 – Esquema de Diluição do Ensaio de Soroneutralização

SALINA (mL)	SORO (mL)	VENENO (mL)
4,59	0,53	0,88
4,77	0,35	0,88
4,89	0,23	0,88
4,96	0,16	0,88
5,02	0,10	0,88

Fonte: Manual da Qualidade do INCQS - POP 65.3440.005

Após o preparo das diluições, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em estufa a 37 °C por 45 minutos. Em seguida, no Serviço de Animais de Laboratório (SAL), procedeu-se a inoculação, por via IP, de 0,5 mL por camundongo em grupos de 8 camundongos por diluição.

Os animais foram observados após 24 e 48 horas a inoculação, e foi efetuada a anotação de todos os procedimentos e o número de animais sobreviventes sobre o total de inoculados. Estes dados serviram para a realização do cálculo da determinação da DE₅₀ pelo método estatístico PROBITO.

4. RESULTADOS

A amostra candidata atendeu aos critérios de validação do ensaio, preconizados pela Farmacopéia Brasileira e pelo Procedimento Operacional Padrão “Ensaio de Potência para o Soro Anticrotálico *in vivo*”, ou seja:

- a DE₅₀ das oito titulações permaneceu dentro dos limites de confiança ($p = 0,95$) - comprometido entre 50 e 200 % da potência estimada;
- os animais utilizados no ensaio de soroneutralização sobreviveram proporcionalmente à quantidade de soro presente na diluição;
- a faixa-resposta (porcentagem de sobrevivência) está compreendida entre 10 e 90 %, formando a curva de regressão que apresenta relação linear ($p > 0,05$);
- para a realização do cálculo da DE₅₀, foi utilizado o método estatístico PROBITO, com o resultado de pelo menos três diluições consecutivas, constatando-se que a dose que protege 50% está no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição do ensaio e;
- Foi calculada a média geométrica ponderada, utilizando planilha de cálculos desenvolvida de acordo com a Farmacopéia Européia, para verificação da homogeneidade dos dados e verificação de resultados aberrantes (Council of Europe, 2005).

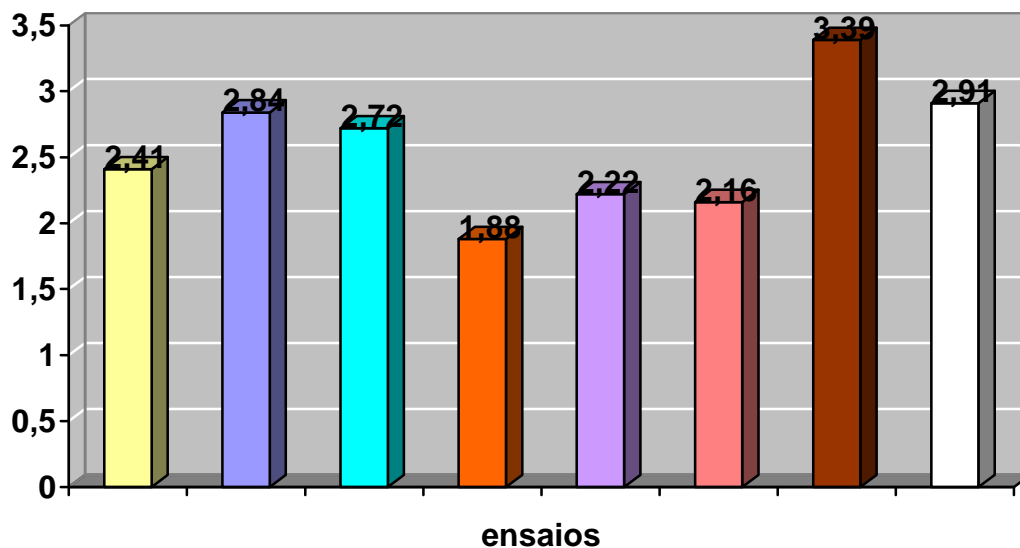
Além do ensaio de potência, e com o objetivo de verificar a presença de contaminantes tóxicos resultantes de impurezas ou degradação da amostra candidata a Soro Anticrotálico de Referência Nacional, foi realizado no Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS, o teste de inocuidade (Toxicidade Inespecífica), obtendo o resultado satisfatório.

Os resultados dos ensaios para a determinação da DE₅₀, com a utilização do método estatístico PROBITO, podem ser verificados abaixo (**tabela 09 e gráfico 05**):

Tabela 09 – Resultados da Determinação da DE₅₀

TESTE	LIMITE INFERIOR ($\mu\text{g}/0,5\text{mL}$)	DE ₅₀ ($\mu\text{g}/0,5\text{mL}$)	LIMITE SUPERIOR ($\mu\text{g}/0,5\text{mL}$)
01	1,91	2,41	3,05
02	1,89	2,84	4,26
03	2,44	2,72	3,03
04	1,41	1,88	2,50
05	1,79	2,22	2,75
06	1,61	2,16	2,89
07	2,46	3,39	4,67
08	2,26	2,91	3,74

Gráfico 06 – Resultados da Determinação da DE₅₀



Os resultados dos ensaios para a determinação da DE₅₀, com a utilização da planilha de cálculos desenvolvida de acordo com a Farmacopéia Européia , podem ser verificados abaixo (**tabelas 10, 11 e 12**):

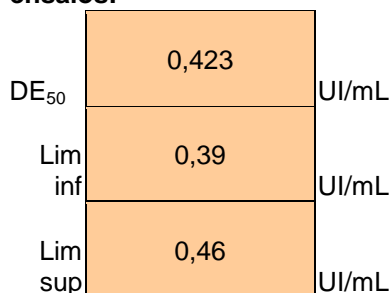
Tabela 10 – Cálculo do Log decimal dos Resultados da Determinação da DE₅₀

POT	LOG	LIC	LOG	LSC	LOG
2,41	0,38	1,91	0,28	3,05	0,48
2,84	0,45	1,89	0,28	4,26	0,63
2,72	0,43	2,44	0,39	3,03	0,48
1,88	0,27	1,41	0,15	2,5	0,40
2,22	0,35	1,79	0,25	2,75	0,44
2,16	0,33	1,61	0,21	2,89	0,46
3,39	0,53	2,46	0,39	4,67	0,67
2,91	0,46	2,26	0,35	3,74	0,57

Tabela 11 – Combinação ponderada de ensaios

pot est	LI	LS	GL	Ln pot (M)	L(amplit)	t	Peso(W)	MW	W(M-Mmed)2
0,38	0,28	0,48	20	-0,9623	0,5442	2,086	58,76	-56,55	0,62171
0,45	0,28	0,63	20	-0,7912	0,8227	2,086	25,71	-20,34	0,11985
0,43	0,39	0,48	20	-0,8334	0,2174	2,086	368,41	-307,03	0,24963
0,27	0,15	0,40	20	-1,2941	0,9809	2,086	18,09	-23,41	3,41709
0,35	0,25	0,44	20	-1,0603	0,5524	2,086	57,03	-60,47	2,30092
0,33	0,21	0,46	20	-1,0953	0,8013	2,086	27,11	-29,69	1,50753
0,53	0,39	0,67	20	-0,6345	0,5377	2,086	60,20	-38,19	3,04551
0,46	0,35	0,57	20	-0,7681	0,4811	2,086	75,21	-57,77	0,62734
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
n	GL total	W Total	MW total	M médio	T	s(Mmed)	LI	LS	
8	160	690,52	-593,45	-0,86	1,975	0,03806	-0,9346	-0,7843	

Potência Estimada da combinação dos ensaios:



Teste de homogeneidade:

X ² calc	P	X ² tab
11,890	0,1042	14,067

Dados homogêneos

Cálculo do antilog

$$\begin{array}{r}
 10^{0,423} \\
 \underline{2,65} \\
 10^{0,39} \\
 \underline{2,45} \\
 10^{0,46} \\
 \underline{2,88}
 \end{array}$$

Teste de Grubbs para resultados aberrantes:

Valor máximo é válido

Valor mínimo é válido

Tabela 12 – Cálculo do Antilog da DE₅₀ do Soro Anticrotático BRA/ANTICROT/001

	LIMITE INFERIOR (µg/0,5mL)	DE₅₀ (µg/0,5mL)	LIMITE SUPERIOR (µg/0,5mL)
Potência Estimada da combinação dos ensaios em log	0,390	0,423	0,460
Antilog	2,45	2,65	2,88

Conforme descrito no POP 65.3440.005, a determinação da potência do Soro Crotático é feita seguindo a fórmula:

$$\text{Potência} = \frac{(TV-1) \text{ DL}_{50} \text{ do veneno crotático de referência}}{\text{DE}_{50}}$$

Onde TV é o número de DL₅₀ inoculada em camundongos no ensaio de determinação da DE₅₀.

$$\text{Potência} = \frac{4 \times 1,46}{2,65} = 2,20 \text{ mg/dose}$$

**RESULTADO DA POTÊNCIA DO SORO DE REFERÊNCIA
BRA/ANTICROT/001**

2,20 mg/dose

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O objetivo primordial deste estudo foi determinar a potência do soro anticrotálico candidato a referência nacional, empregando-se a metodologia *in vivo* em camundongos. Para isto foram realizados dezesseis ensaios, dentre os quais, foram considerados apenas oito ensaios válidos (REBLAS, 2002).

Para cumprir este objetivo, foi utilizado o teste *in vivo*, uma vez que o uso de animais como indicador biológico nos leva a ter maior cuidado e seguir rigorosamente os procedimentos padronizados, no que diz respeito à cepa de camundongos a ser utilizada, o peso dos animais utilizados, a concentração de veneno, conforme o POP 65.3440.005.

Dentre os procedimentos descritos, utilizamos o preconizado pela Farmacopéia Brasileira. A potência foi determinada pelo método estatístico PROBITO e o resultado final foi estipulado, utilizando-se a planilha de cálculos desenvolvida de acordo com a Farmacopéia Européia, para os oito ensaios válidos (European Pharmacopoeia, 2005).

A metodologia empregada mostrou capacidade de determinar a potência do soro utilizado. Portanto, os resultados apresentados no presente estudo indicam que o soro anticrotálico candidato a referência nacional, tem boa confiabilidade no ensaio da potência, mostrando-se estável em todo o processo. Por outro lado, as dificuldades encontradas no decorrer da realização dos ensaios para a determinação da potencia são as encontradas rotineiramente na realização dos ensaios de potência *in vivo*, ou seja, a utilização de modelos experimentais como o camundongo, por vezes nos mostra resultados inconsistente, nos levando a repetições de ensaios, fato este que poderá ser sanado quando da utilização de um soro de referência em um ensaio de potência relativa.

De acordo com os resultados obtidos nas oito titulações com determinação do título e dos desvios médios (Manual da Qualidade), e após a realização dos cálculos estatísticos relacionados aos ensaios verificamos que os resultados demonstraram-se consistentes, e concluímos que a amostra candidata a Soro Anticrotálico de Referência Nacional está aprovada, e poderá ser utilizada em ensaios de determinação da potência biológica de soro anticrotálico, recebendo a nomenclatura BRA/ANTICROT/001.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO-MARQUES MM, Hering SE (a), Clinical and Laboratory Features of South American Rattlesnake (*Crotalus Durissus Terrificus*) Envenenation in Children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1976; 82 (6): 924-9.

AZEVEDO-MARQUES MM, KIMACHIT, COIMBRA TM et al (b). Níveis de CPK, DHL e Aldolase no Sangue de Pacientes após acidente Ofídico. IN: XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Natal, 1980.

AZEVEDO-MARQUES MM; CUPO P & HERING SE (c). Envenomation caused by poisonous animals: Poisonous snakes. Medicina, Ribeirão Preto, 36: 480-489, apr./dec. 2003. IN: Simpósio Urgências e emergências Dermatológicas e Toxicológicas.

BOAS PRÁTICAS EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3340.002).

CASTRO, Isac. Estudo da Toxicidade das Peçonhas Crotálica e Botrópica em Túbulos Proximais Isolados de Rins de Ratos, 2003. Disponível em <http://www.sbn.org.br/teses/tese115.htm>). Acesso em 15 mai 2006.

COUNCIL OF EUROPE. European Pharmacopoeia Assays Depending Upon Quantal Responses. (Chapter – General texts – 4. 5th ed. Strasbourg. France. 2005. p 484-6.

CUPO P, Azevedo-Marques MM, Hering SE. Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. Trans R Soc Trop Med Hyg 1990;84 (3): 447-51.

DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50 DOS VENENOS *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* E *BOTHRUPS JARARACA* - IN VIVO. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3440.006).

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Acidentes com Serpentes Peçonhentas. Comunicado Técnico nº 9. Disponível em http://www.cnpm.embrapa.br/publica/download/cot9_serpa5_vf.pdf Acesso em 08 fev 2006.

ENSAIO DE POTÊNCIA PARA O SORO ANTICROTÁLICO IN VIVO. In MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3440.005).

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Immunoserum for human use, animal. 5th ed. Strasbourg. France. 2005. Cód 01/2003-0084 - pág 2938.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4 ed. São Paulo. ATHENEU 2001 Fasc 2.

FIOCRUZ/CICT/SINITOX (a). Casos registrados de Intoxicação Humana por agente tóxico e Zona de ocorrência, Brasil, 2003. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/2003/brasil2003.htm>. Acesso em 08 nov 2006.

FIOCRUZ/CICT/SINITOX (b). Casos, óbitos e letalidade de intoxicação por agente e por região, Brasil, 2003. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/2003/brasil2003.htm>. Acesso em 08 nov 2006.

FERRAREZZI, H. 1994. Uma Sinopse dos Gêneros e Classificação das Serpentes (Squamata): I. Scolecophidia e Alethinophidia não Colubrídeos. Pp. 69-80, in Herpetologia no Brasil, 1 (L.B. Nascimento; A.T. Bernardes e G.A. Cotta, eds.) PUC/MG, Fund. Biodiversitas, Fund. Ezequiel Dias, Belo Horizonte.

FUNED – Fundação Ezequiel Dias (a). Processo de Fabricação de Soros. Disponível em http://www.funed.mg.gov.br/produtos_servicos/imunobiologicos/bulas/Bula_Soro_Anticrotalico_rev_03.pdf. Acesso em 10 fev 2006.

FUNED – Fundação Ezequiel Dias (b). Processo de Fabricação de Soros. Disponível em: www.funed.mg.br/produtos_servicos/imunobiologicos/processo/index.php. Acesso em 08 fev 2006.

INSTITUTO BUTANTAN (a). Divisão de Desenvolvimento Cultural. REVISTA “Série Didática” Nº 2. Divisão de Desenvolvimento Cultural Norma Regulamentadora no 15 (NR

15) do Ministério do Trabalho. Disponível em: www.butantan.gov.br/soros.htm. Acesso em 10 out 2006.

INSTITUTO BUTANTAN (b). Divisão de Desenvolvimento Cultural. REVISTA “Série Didática” Nº 2. Acidentes por Animais Peçonhentos. Disponível em: <http://www.Butantan.gov.br/perguntas.htm>. Instituto Butantan. Acesso em 18 mar 2006.

JORGE MT, Pereira JR, Benfatti W. Comportamento de enzimas e alterações anátomo-patológicas do músculo esquelético em pacientes picados por serpentes do gênero *Crotalus*. Ver Soc Brás Méd Trop 1986; 19(suppl):27.

MANUAL DE BIOSSEGURANÇA. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.1000.003).

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas: Principais grupos, identificação, veneno, acidentes e primeiros socorros. Disponível em www.ivb.rj.gov.br/palestras/roteiro.doc . Acesso em 09/08/2006.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (a). Ministério da Saúde. GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 4ª ed. Cap 5 Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf. Acesso em 09/08/2006

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (b). Ministério da Saúde. GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 4ª ed. Cap 5. Disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/gve/gve0501a.htm>. Acesso em 08 jul 2006.

NOGUEIRA, R.M.B. Estudo dos aspectos clínico, laboratorial, histopatológico e do tratamento na intoxicação experimental pelo veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* em cães. 2004. 178 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

PINHO, F.O, *et al* (2000). Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. J Bras. Nefrol 2000;22(3): I . Disponível em: <http://www.sbn.org.br/JBN/22-3/5-crotali.pdf>. Acesso em 03 de abr 2006.

PORTAL DA SAÚDE (a). Ministério da Saúde. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>. Acesso em 08 nov 2006.

PORTAL DA SAÚDE (b). Ministério da Saúde. Produção de Soros. Disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/imv/soros.htm>. Acesso em 25 de mai 2006.

REBLAS – Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos. Habilitação de Laboratórios Analíticos em Saúde, Segundo Requisitos da Norma ISO/IEC 17025. Revisão 01. pág41, 2ª edição, 2002.

ROSENFELD, G. Vital Brazil (a). Memórias do Instituto Butantan, São Paulo, v. 34, p. x-xvi, 1969.

ROSENFELD G (b). Symptomatology, Pathology and Treatment of Snake Bites in south América. In: BUCHERLW, BUCKLEY EG, DEULOFEU V, Editors, Venomous Animals and their Venoms. New York: Academic Press: 345-841, 1971.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE/RJ. Casos Registrados de Acidentes por Animais Peçonhentos no Estado do Rio de Janeiro distribuídos por Ano de Ocorrência e Animal Envolvido. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/animaispeconhentos/estatisticas.html>. Acesso em 13 de jun 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Normes relatives aux immunesèrums d'origine animale. – WHO Sér. Repp. Tech. 413: 47-61, 1969.