

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
CURSO DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Luiza Coutinho Costa

**AVALIAÇÃO DE PUREZA EM SOROS ANTIOFÍDICOS POR DIFERENTES
TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

Rio de Janeiro

2015

Luiza Coutinho Costa

**AVALIAÇÃO DE PUREZA EM SOROS ANTIOFÍDICOS POR DIFERENTES
TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Programa de Pós Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz para obtenção do título de Especialista

Preceptor: Claudia Maria da Conceição

Tutor: Filipe Soares Quirino da Silva

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Costa, Luiza Coutinho

Avaliação de pureza em soros antiofídicos por diferentes técnicas físico-químicas/ Luiza Coutinho Costa. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

49 f., il., tab.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2015.

Preceptor: Claudia Maria da Conceição. Tutor: Filipe Soares Quirino da Silva

1. Soros 2. Antivenenos. 3. Controle de Qualidade. I. Título

Luiza Coutinho Costa

**AVALIAÇÃO DE PUREZA EM SOROS ANTIOFÍDICOS POR DIFERENTES
TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Programa de Pós Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz para obtenção do título de Especialista

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora

Claudia Maria da Conceição (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Adherlene Vieira Gouvêa (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Anna Carolina Machado Marinho (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio.

Ao meu namorado, Luiz, por sempre estar ao meu lado.

À minha prima, Letícia, pela amizade.

À toda equipe do LBAIS: Adherlene, Anna Carolina, Andreza, Camilla, Clarissa, Claudia, Gustavo, Júlio e Ozéias, por me auxiliarem na execução do experimento.

Aos meus orientadores, Claudia e Filipe, pela disponibilidade.

À professora, Lilian Viana Teixeira, pela recomendação para o meu ingresso nesta especialização.

À coordenação do curso de Residência do INCQS e à FIOCRUZ pela oportunidade.

RESUMO

A importância dos soros antiofídicos para o tratamento das mordidas de serpentes e outros animais peçonhentos é inegável. Eles são o único tratamento comprovadamente eficaz e a sua não utilização pode resultar, inclusive, na morte de indivíduos não tratados. A avaliação do teor de pureza também é de suma importância, pois ela está atrelada à possibilidade de redução do número e da frequência de reações adversas nos pacientes tanto durante como após a administração dos soros. Portanto, este trabalho teve por objetivo realizar estudos preliminares adequados à avaliação do teor de pureza em soros antiofídicos produzidos no Brasil. As técnicas selecionadas foram: eletroforese unidimensional e avaliação do teor de proteínas totais pelo método de Lowry. As amostras utilizadas foram de soro antibotrópico de três produtores A, B e C, disponíveis no Laboratório de Produtos Biológicos e Artigos e Insumos para a Saúde localizado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na Fundação Oswaldo Cruz. A eletroforese unidimensional indicou que, de maneira geral, as amostras possuem como fragmentos principais os de massa molecular de 100 kDa sugerindo a utilização de pepsina no processo de produção dos soros antiofídicos avaliados. A avaliação do teor de proteínas totais pelo método de Lowry, assegurou que todas as amostras testadas atendem ao compêndio de referência o qual permite o máximo de 15% de proteínas totais. Ainda assim, é necessário que novos experimentos sejam conduzidos com o objetivo de elucidar a questão da pureza dos soros antiofídicos utilizando metodologias como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas em trabalhos futuros.

Palavras chave: Soro antiofídico. Soro antibotrópico. Pureza.

ABSTRACT

The importance of antivenom for the treatment of snake bites and other venomous animals is undeniable. They are the only effective treatment and its non-use can result in death of untreated individuals. The purity content evaluation is extremely important because it is related to the possibility of reducing the number and frequency of adverse reactions in patients both during and after administration of the antivenom. Therefore, this study aimed to propose appropriate physicochemical methodologies for evaluate the purity content of antivenom produced in Brazil. The selected techniques were: one dimensional electrophoresis and total protein content by the Lowry method. The samples used were antivenom of three producers A, B and C available in the Laboratory of Biological Products and Health Products and Supplies located at the National Institute of Health Quality Control in the Oswaldo Cruz Foundation. The one-dimensional electrophoresis indicated that, in general, the samples have its main fragments with molecular mass of 100 kDa suggesting the use of pepsin in the production process of the antivenom samples evaluated. The evaluation of the total protein content by the Lowry method, assured that all samples tested were according to the reference compendium which allows a maximum of 15% of total protein. Still, it is necessary that new experiments are conducted in the future with the purpose of elucidate the issue of antivenom purity using techniques such as two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry.

Keywords: Antivenom. *Bothrops* antivenom. Purity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Boletim para observação de acidentes ofídicos	18
Figura 2	Serpente de importância médica no Brasil; espécie <i>Bothrops alternatus</i>	21
Figura 3	Serpente de importância médica no Brasil; espécie <i>Crotalus durissus</i>	23
Figura 4	Serpente de importância médica no Brasil; espécie <i>Lachesis muta</i>	25
Figura 5	Serpente de importância médica no Brasil; espécie <i>Micrurus corallinus</i>	26
Figura 6	Diferentes fragmentos de IgG obtidos por hidrólise	28
Figura 7	Fluxograma de processamento do método de Lowry	38
Figura 8	Gráfico da curva analítica	38
Figura 9	Gel 10% não redutor na coloração azul de Comassie	41
Figura 10	Gel 12% redutor na coloração azul de Comassie	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ensaio físico-químico recomendado pela Farmacopeia Brasileira para avaliação de soros antiofídicos.....	30
Quadro 2	Ensaio físico-químico recomendado pela Farmacopeia Europeia para avaliação de soros antiofídicos.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e zona de ocorrência. Região Norte, 2011	14
Tabela 2	Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e zona de ocorrência. Região Sul, 2011	15
Tabela 3	Dados referentes aos pontos da curva analítica elaborada para o Método de Lowry	37
Tabela 4	Concentrações médias das amostras A, B e C.....	39

LISTA DE SIGLAS

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (soro albumina bovina)
CCPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> (fração de ligação ao antígeno)
F(ab') ₂	<i>Fragment antigen binding</i> (fração de ligação ao antígeno)
FB	Farmacopeia Brasileira
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> (fração cristalizável)
FE	Farmacopeia Europeia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
IB	Instituto Butantan
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i> (focalização isoelétrica)
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IVB	Instituto Vital Brasil
LBAIS	Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos para a Saúde
MM	Massa molecular
MS	Ministério da Saúde
NTXs	Neurotoxinas
PMF	Do inglês <i>peptide mass fingerprinting</i>
PNI	Programa Nacional de Imunizações
SAB	Soro Antibotrópico
SABC	Soro Antibotrópico-crotálico
SABL	Soro Antibotrópico-laquétrico
SAC	Soro Anticrotálico
SAE	Soro Antielaquético
SAL	Soro Antilaquétrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SIH-SUS	Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas
SNABS/MS	Secretaria de Ações Básicas da Saúde do Ministério da Saúde
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	EPIDEMIOLOGIA	13
3	HISTÓRICO	17
4	SERPENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA NO BRASIL	20
4.1	<i>BOTHROPS</i>	20
4.2	<i>CROTALUS</i>	22
4.3	<i>LACHESIS</i>	24
4.4	<i>MICRURUS</i>	25
5	PRODUÇÃO DE SOROS ANTIOFÍDICOS	27
5.1	IMUNOGLOBULINAS	27
6	CONTROLE DE QUALIDADE DE SOROS ANTIOFÍDICOS	29
6.1	FARMACOPEIA BRASILEIRA (FB)	29
6.2	FARMACOPEIA EUROPEIA (FE)	30
7	LABORATÓRIO DE BIOLÓGICOS, ARTIGOS E INSUMOS PARA A SAÚDE	32
8	JUSTIFICATIVA PARA A AVALIAÇÃO DE PUREZA EM SOROS ANTIOFÍDICOS	34
9	EXPERIMENTOS PRELIMINARES	36
9.1	MÉTODO DE LOWRY PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	36
9.1.1	Metodologia	36
9.1.2	Resultados obtidos pelo método de Lowry	38
9.2	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	40
9.2.1	Metodologia	40
9.2.2	Resultados da eletroforese	41
10	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	44
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que ocorram cerca de 1.800.000 casos de acidentes com serpentes peçonhentas por ano no mundo. O envenenamento resultante destes acidentes é considerado um grande problema de saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais, com destaque para as regiões do sul e sudeste da Ásia e África subsaariana (KASTURIRATNE, 2008).

No Brasil, as serpentes peçonhentas se encontram distribuídas por quase todo o território nacional. Os principais gêneros de importância médica no país são: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*, sendo que o gênero *Bothrops* é responsável pela maior parte dos acidentes no Brasil (BRASIL, 2001).

Os soros antiofídicos são o único tratamento comprovadamente eficaz no caso de acidentes com serpentes peçonhentas. Eles são capazes de neutralizar o veneno das serpentes ao produzir uma interação entre o antígeno e o anticorpo. O prognóstico do paciente tende a ser melhor quando o soro é administrado logo após o acidente (WHO, 2010).

A produção de soros ocorre a partir do plasma de animais domésticos, usualmente de grande porte (p.ex. equinos), que são hiperimunizados com venenos das espécies de serpentes de interesse. O plasma passará então por diversas etapas de produção que incluem hidrólise enzimática, filtração e purificação, até resultar em concentrados de anticorpos (WHO, 2010).

São relatadas, no entanto, a ocorrência de reações adversas resultantes de processos de purificação rudimentares e/ou incompletos dos soros antiofídicos. Elas podem ser do tipo imediata, compreendendo: reações cutâneas, gastrointestinais, respiratórias e cardiovasculares, podendo inclusive levar o paciente ao óbito, no caso de complicações. Outro tipo de reação passível de ocorrência é a chamada doença do soro que consiste numa hipersensibilidade do tipo III, de manifestação tardia, sendo esta última de menor gravidade (DESHPANDE, 2013).

Sendo assim, é fundamental que se proponha uma avaliação do teor de pureza dos soros antiofídicos no Brasil, na tentativa de reduzir consideravelmente a ocorrência destas reações adversas ao assegurar um produto com qualidade elevada e, principalmente, seguro para o paciente.

2 EPIDEMIOLOGIA

Os acidentes com animais peçonhentos são de grande importância médica, devido a sua gravidade e frequência. No Brasil, ocorrem cerca de 20.000 casos/ano, sendo que, em 2011, as serpentes responderam por aproximadamente 5.000 casos registrados no Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX, 2014). É provável que o número de casos seja ainda maior devido a problemas relacionados à notificação de acidentes deste tipo em várias regiões. As espécies comumente envolvidas nestes acidentes são as do gênero *Bothrops* e *Crotalus* as quais foram responsáveis por 73,1% e 6,2% dos acidentes no período de 1990 a 1993, respectivamente (BRASIL, 2001).

Segundo BOCHNER (2002), os sistemas nacionais de informação sobre acidentes por animais peçonhentos disponíveis no país são: SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação), o SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), o SIH-SUS (Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde) e o SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade). Esta divisão gera uma enorme dificuldade para a compilação dos dados epidemiológicos referentes aos acidentes com estes animais. Além disso, há grandes variações no número de notificações, principalmente entre regiões, assim como observado nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1: Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e zona de ocorrência. Região Norte, 2011.

Agente	Zona Rural nº	Zona Urbana nº	Ignorada nº	Total	
				nº	%
Medicamentos	4	351	19	374	13,22
Agrotóxicos/Usos Agrícola	19	141	11	171	6,05
Agrotóxicos/Usos Doméstico	4	57	3	64	2,26
Produtos Veterinários	1	14	-	15	0,53
Raticidas	1	58	2	61	2,16
Domissanitários	5	228	8	241	8,52
Cosméticos	-	47	-	47	1,66
Produtos Químicos Industriais	6	306	11	323	11,42
Metais	1	5	-	6	0,21
Drogas de Abuso	1	57	2	60	2,12
Plantas	3	24	3	30	1,06
Alimentos	1	50	-	51	1,80
Animais Peç./ Serpentes	63	62	21	146	5,16
Animais Peç./ Aranhas	4	17	3	24	0,85
Animais Peç./ Escorpiões	8	39	6	53	1,87
Outros Animais Peç. / Venenosos	7	85	4	96	3,39
Animais não Peçonhentos	10	913	75	998	35,29
Desconhecido	-	32	-	32	1,13
Outro	2	33	1	36	1,27
Total	140	2519	169	2828	100
%	4,95	89,07	5,98	100	

Fonte: MS/FIOCRUZ/SINITOX (2011)

Tabela 2: Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e zona de ocorrência. Região Sul, 2011.

Agente	Zona Rural nº	Zona Urbana nº	Ignorada nº	Total	
				nº	%
Medicamentos	41	6434	51	6526	32,41
Agrotóxicos/Usos Agrícola	324	314	11	649	3,22
Agrotóxicos/Usos Doméstico	20	547	4	571	2,84
Produtos Veterinários	42	219	4	265	1,32
Raticidas	6	486	2	494	2,45
Domissanitários	15	1654	8	1677	8,33
Cosméticos	1	311	-	312	1,55
Produtos Químicos Industriais	25	1160	6	1191	5,91
Metais	-	19	1	20	0,10
Drogas de Abuso	-	113	16	129	0,64
Plantas	21	318	3	342	1,70
Alimentos	1	26	-	27	0,13
Animais Peç./ Serpentes	716	143	4	863	4,29
Animais Peç./ Aranhas	304	1662	29	1995	9,91
Animais Peç./ Escorpiões	58	337	7	402	2,00
Outros Animais Peç. / Venenosos	415	1762	48	2225	11,05
Animais não Peçonhentos	298	222	8	528	2,62
Desconhecido	133	806	129	1068	5,30
Outro	28	815	10	853	4,24
Total	2448	17348	341	20137	100
%	12,16	86,15	1,69	100	

Fonte: MS/FIOCRUZ/SINITOX (2011)

Na região Norte, observa-se que de um total de 319 casos de acidentes por animais peçonhentos, 45,7% correspondem à acidentes causados por serpentes. Enquanto na região Sul, são notificados 5.485 casos de acidentes com animais peçonhentos, e os acidentes com serpentes representam 15,7% deste total. A discrepância entre notificações pode ser resultante não só da subnotificação de casos, mas também da limitação do próprio sistema SINITOX, já que este não possui informações de nove estados: Acre, Amazonas, Roraima, Rondônia, Tocantins, Alagoas, Maranhão, Piauí, Sergipe e Distrito Federal.

Segundo dados do Ministério da Saúde, apresentados no Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (BRASIL, 2001), a maioria das notificações dos acidentes ofídicos no Brasil está relacionada à atividade humana nos trabalhos do campo (preparo da terra, plantio e colheita) nas regiões Sul, Sudeste e

Centro-Oeste. A maioria dos indivíduos acometidos pelas mordidas de serpentes é do sexo masculino (70%), o que é justificado pelo fato do homem desempenhar com mais frequência atividades de trabalho fora da moradia, onde os acidentes ofídicos habitualmente ocorrem. Ainda, segundo o Manual, a faixa etária mais acometida encontra-se entre 15-49 anos, que corresponde ao grupo de idade onde se concentra a força de trabalho. Com relação aos locais do corpo mais acometidos nos acidentes, merecem destaque os segmentos de membros inferiores e superiores, provavelmente decorrentes da não utilização de equipamentos mínimos de proteção individual, tais como sapatos, botas, calças, luvas de couro e outros (BRASIL, 2001).

3 HISTÓRICO

O início das pesquisas sobre a produção de soros antiofídicos no Brasil ocorreu com o médico Vital Brasil (1865-1950) no início do século XX. Não havia, até então, nenhum recurso terapêutico comprovadamente eficaz para o tratamento das picadas de serpentes. A seguir, transcreve-se um trecho escrito pelo próprio Vital Brasil sobre o início dos seus estudos sobre o ofidismo:

“Em contato constante com a gente do povo, procurando tomar conhecimento do seu modo simples de viver, de suas idéias, de suas credences, tive oportunidade de verificar a confiança que depositavam nos curadores de cobra, como chamavam os caboclos que tratavam, por meio de raízes, os acidentados por serpentes. Os vegetais preconizados eram numerosos, quase tantos quanto os curadores. Isto me levou a pensar que talvez houvesse uma substância comum nos vegetais que explicasse a proclamada ação curativa. Resolvi a examinar a questão. Montei pequeno laboratório, acumulando raízes, caules e frutos para o preparo de extratos e tinturas, que me serviriam nas projetadas experiências. Tratei de adquirir uma serpente venenosa, uma Cascavel, que me foi fornecida por um dos caboclos curadores. As primeiras Cascavéis sucumbiram porque eram traumatizadas no momento da captura. Afinal consegui uma em boas condições, que foi colocada em caixa reforçada de madeira no meu improvisado laboratório. Era um belo espécime de Cascavel (*Crotalus terrificus*). Começou minha aprendizagem. Tive de vencer a mim mesmo, ao medo inato das serpentes. Era preciso colher o veneno em estado de pureza, em ordem a poder avaliar-lhe a quantidade. Não dispunha de aparelho de contenção. Comecei, por isso, provocando a mordedura em algodão hidrófilo, tarado; pela diferença de peso avaliava a quantidade de veneno, empregado em solução titulada. Os resultados das primeiras experiências foram negativos para diversos vegetais examinados.”(REVISTA MED, 2005)

Em 1901, o Doutor Vital Brasil, consciente do grande número de acidentes com serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, passou a realizar experimentos com os venenos ofídicos no Instituto Serumterápico, hoje Instituto Butantan (IB). Baseando-se nos primeiros trabalhos com soroterapia realizada pelo francês Albert Charles Calmette (1863-1933) que em 1894 havia obtido um soro contra o veneno da serpente *Naja tripudians*, na Indochina; Vital Brasil desenvolveu estudos sobre soros contra o veneno de serpentes brasileiras, descobrindo 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 (INSTITUTO BUTANTAN, 2006).

Ao iniciar a produção de soros, o pesquisador Vital Brasil introduziu os “Boletins para Observação dos Acidentes Ofídicos”, representado na figura 1, os quais representaram a base dos sistemas atuais de notificação destes tipos de agravos. Até a década de 80, porém, os estudos de notificação eram localizados, sendo realizados principalmente na região Sudeste (INSTITUTO BUTANTAN, 2006).

Figura 1: Boletim para observação de acidentes ofídicos.

INSTITUTO BUTANTAN
CAIXA POSTAL 05 - S. PAULO

BOLETIM PARA OBSERVAÇÃO DE ACCIDENTE OPHIDICO

Tratamento feito pelo Sr......

Residente em..... *no Estado de*.....

Na pessoa de..... *de*..... *anos de idade.*

Ponto do corpo em que foi mordido:.....

.....

.....

1.º — *Qual o nome da cobra que mordeu?*
R. —

2.º — *Qual o numero de horas decorridas entre a hora em que se deu o accidente e a da 1.ª injeção?*
R. —

3.º — *Qual a qualidade do soro empregado? Quantas empolas?*
R. —

4.º — *Qual o resultado do tratamento? Cura?*
R. —

5.º — *Houve cegueira?*
R. —

6.º — *Houve hemorragia?*
R. —

7.º — *Houve paralyisia?*
R. —

8.º — *Houve inchação no logar mordido?*
R. —

9.º — *Em que data ocorreu o accidente?*
R. — *de* *de 19*

Observações:

.....

.....

N. B. — No caso de ter sido applicado em animal, façam-se as alterações necessarias.
O Director do Instituto, desejando colher elementos para a organização da estatística dos accidentes ophidicos tratados pelo soro, pede instantemente ás pessoas que tiverem tido a oportunidade de applicar esse recurso therapeutico, o obsequio de encherem este boletim, devolvendo-o em seguida a este estabelecimento, acompanhado de todos os esclarecimentos que julgarem util acrescentar aos que constam das perguntas acima.

Fonte: AMARAL, A., 1930.

A produção de soros antiofídicos, no entanto, ainda era deficiente para atender todo o país. Em maio de 1986, várias medidas foram instituídas pelo Ministério da Saúde (MS), dentre as quais podemos citar a criação do Programa Nacional de Ofidismo, na antiga Secretaria de Ações Básicas da Saúde (SNABS/MS). Os acidentes ofídicos passaram então a ser de notificação obrigatória no país, permitindo, por sua vez, uma relação de troca de informações epidemiológicas entre as Secretarias Estaduais e o Ministério da Saúde. Com a implantação deste sistema aprimoraram-se os dados sobre ofidismo, mostrando características epidemiológicas e clínicas que permitiram o planejamento de ações de controle (LEMOS, 2009).

Para atender à demanda nacional de soros utilizados no país, a participação dos laboratórios oficiais tornou-se ainda mais relevante. Os soros antipeçonhentos são produzidos no Brasil pelo Instituto Butantan (IB) no estado de São Paulo, pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) no estado de Minas Gerais, pelo Instituto Vital Brazil (IVB) no estado do Rio de Janeiro e pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) no estado do Paraná. Toda a produção é comprada pelo MS que a distribui para todo o país, por meio das Secretarias de Estado de Saúde. Assim, os soros estão disponíveis em serviços de saúde públicos e são oferecidos gratuitamente aos acidentados, não sendo passíveis de compra nem oferecidos por instituições privadas de saúde (LEMOS, 2009).

4 SERPENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA NO BRASIL

Dentre as serpentes de importância médica podemos citar as da família Viperidae composta pelos gêneros: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*; as da família Elapidae representada pelo gênero *Micrurus*.

4.1 BOTHROPS

O gênero *Bothrops* representado na figura 2 compreende cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. São conhecidas popularmente por: jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeiro, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, combóia, caiçara e outras denominações. Estas serpentes habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruídos (BRASIL, 2001).

Figura 2: Serpente de importância médica no Brasil; espécie *Bothrops alternatus*.



Fonte: Brazilian Venomous Snakes Database – BRAVES (2015)

O acidente botrópico é o acidente ofídico de maior importância no país, pois responde por cerca de 90% dos envenenamentos. O veneno apresenta ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. A primeira ação resulta em lesões locais como edema, bolhas e necrose. Já ação coagulante é produto da ativação, de modo isolado ou simultâneo, do fator X e da protrombina, possuindo também ação semelhante à trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Essas ações produzem distúrbios da coagulação, caracterizados por consumo dos seus fatores, podendo ocasionar incoagulabilidade sanguínea. Os venenos botrópicos podem também levar a alterações da função plaquetária bem como plaquetopenia. Já as manifestações hemorrágicas são decorrentes da ação das hemorraginas que provocam lesões na membrana basal dos capilares, associadas à plaquetopenia e alterações da coagulação (BERNARDE, 2014).

O quadro clínico é caracterizado por dor e edema no local da picada, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. Equimoses

e sangramentos no ponto da picada são frequentes. Infartamento ganglionar e bolhas podem aparecer na evolução, acompanhados ou não de necrose (CARDOSO; WEN, 2003).

O tratamento do paciente consiste na administração, o mais precocemente possível, do soro antiofrotópico (SAB) por via intravenosa e, na falta deste, das associações antiofrotópico-crotálica (SABC) ou antiofrotópico-laquélica (SABL). O prognóstico geralmente é bom, sendo que a letalidade nos casos tratados é baixa, em torno de 0,3% (BRASIL, 2001).

4.2 CROTALUS

O gênero *Crotalus* representado na figura 3 agrupa várias subespécies, pertencentes à espécie *Crotalus durissus*. Popularmente são conhecidas por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá e outras denominações populares. São encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e raramente na faixa litorânea. Não ocorrem em florestas e no Pantanal. Não têm por hábito atacar e, quando excitadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho (BERNARDE, 2014).

Figura 3: Serpente de importância médica no Brasil; espécie *Crotalus durissus*.



Fonte: Brazilian Venomous Snakes Database – BRAVES (2015)

O veneno crotálico possui ação neurotóxica, miotóxica e coagulante. A crotoxina é uma neurotoxina de ação pré-sináptica que atua nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina. Esta inibição é o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular do qual decorrem as paralisias motoras apresentadas pelos pacientes. Já a ação miotóxica está relacionada às lesões de fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) com liberação de enzimas e mioglobina para o soro e que são posteriormente excretadas pela urina. A ação coagulante, por sua vez, decorre da atividade do tipo trombina que converte o fibrinogênio diretamente em fibrina, podendo levar à incoagulabilidade sanguínea. Geralmente não há redução do número de plaquetas. As manifestações hemorrágicas, quando presentes, são discretas (CARDOSO; WEN, 2003).

No que diz respeito ao quadro clínico, as manifestações locais são pouco importantes, ao contrário das sistêmicas. Além de mal-estar, prostração, sudorese, náuseas e vômitos, ocorrem também alterações neurológicas, musculares e distúrbios da coagulação. As alterações neurológicas decorrem da ação neurotóxica do veneno e

surgem nas primeiras horas após a picada; sendo caracterizadas pelo fácies miastênica (fácies neurotóxica de Rosenfeld) evidenciadas por ptose palpebral uni ou bilateral, flacidez da musculatura da face, alteração do diâmetro pupilar, incapacidade de movimentação do globo ocular, podendo existir visão turva e/ou visão dupla. A ação miotóxica provoca dores musculares generalizadas (mialgias) que podem aparecer precocemente. A fibra muscular esquelética lesada libera quantidades variáveis de mioglobina que é excretada pela urina (mioglobinúria), conferindo-lhe uma cor avermelhada ou de tonalidade mais escura, até o marrom. A mioglobinúria constitui a manifestação clínica mais evidente da necrose da musculatura esquelética (rabdomiólise) (CARDOSO; WEN, 2003).

O tratamento é realizado por meio da administração por via intravenosa de soro anticrotálico (SAC) ou SABC. A principal complicação do acidente crotálico é a insuficiência renal aguda em virtude da mioglobinúria, podendo inclusive resultar em um prognóstico reservado ao paciente (BRASIL, 2001).

4.3 LACHESIS

Gênero *Lachesis* representado na figura 4 compreende a espécie *Lachesis muta* com duas subespécies. São popularmente conhecidas por: surucucu, surucucu-pico-de-jaca, surucutinga, malha-de-fogo. É a maior das serpentes peçonhentas das Américas, atingindo até 3,5m. Habitam áreas florestais como Amazônia, Mata Atlântica e algumas enclaves de matas úmidas do Nordeste (BERNARDE, 2014).

Por se tratar de serpentes encontradas em áreas florestais, onde a densidade populacional é baixa e o sistema de notificação não é tão eficiente, as informações disponíveis sobre esses acidentes são escassas. Os acidentes botrópico e laquétrico são muito semelhantes do ponto de vista clínico, sendo, na maioria das vezes, difícil o diagnóstico diferencial (BRASIL, 2001). O tratamento é realizado por meio da administração por via intravenosa de soro soro antilaquétrico (SAL) ou antibotrópico-laquétrico (SABL) (BRASIL, 2001).

Figura 4: Serpente de importância médica no Brasil; espécie *Lachesis muta*.



Fonte: Brazilian Venomous Snakes Database – BRAVES (2015)

4.4 MICRURUS

O gênero *Micrurus* representado na figura 5 compreende 18 espécies, distribuídas por todo o território nacional. São animais de pequeno e médio porte com tamanho em torno de 1,0 m, conhecidos popularmente por coral, coral verdadeira ou boicorá. Apresentam anéis vermelhos, pretos e brancos em qualquer tipo de combinação. Na Região Amazônica e áreas limítrofes, são encontradas corais de cor marrom-escura (quase negra), com manchas avermelhadas na região ventral. Em todo o país, existem serpentes não peçonhentas com o mesmo padrão de coloração das corais verdadeiras, porém desprovidas de dentes inoculadores. Diferem ainda na configuração dos anéis que, em alguns casos, não envolvem toda a circunferência do corpo: são denominadas falsas-corais (BERNARDE, 2014).

Figura 5: Serpente de importância médica no Brasil; espécie *Micrurus corallinus*.



Fonte: Brazilian Venomous Snakes Database – BRAVES (2015)

O acidente elapídico, apesar de pouco frequente, pois corresponde a cerca 0,4% dos acidentes com ofídeos, é potencialmente grave quando apresenta manifestações clínicas (BRASIL, 2001). Os constituintes tóxicos do veneno são neurotoxinas (NTXs) de ação pré e pós-sináptica. As NTXs atuam na junção neuromuscular, bloqueando a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos, impedindo a deflagração do potencial de ação. Isso resulta em um quadro de fraqueza muscular progressiva, ocorrendo ptose palpebral, oftalmoplegia e a presença de fácies miastênica ou “neurotóxica”. A paralisia flácida da musculatura respiratória compromete a ventilação, podendo haver evolução para insuficiência respiratória aguda e apnéia (BRASIL, 2001).

O tratamento específico é realizado por meio da administração de soro por via endovenosa do soro antielapídico (SAE). O prognóstico é favorável, mesmo nos casos graves, desde que haja atendimento adequado quanto à soroterapia e assistência ventilatória (BERNARDE, 2014).

5 PRODUÇÃO DE SOROS ANTIOFÍDICOS

Os soros heterólogos antivenenos são concentrados de anticorpos (imunoglobulinas) obtidos a partir da extração dos venenos das serpentes. O soro é chamado de heterólogo por ser produzido em uma espécie diferente da espécie alvo.

Após a extração do veneno, o antígeno é processado, diluído, filtrado e encaminhado às fazendas para inoculação em equinos, pois esse é o animal adotado para produção de soro no Brasil. Outros animais também podem ser utilizados como, por exemplo, ovelhas, cabras, camelos e lhamas, conforme a disponibilidade de cada país produtor (WHO, 2010).

Os cavalos permanecem em quarentena para produção de anticorpos e são supervisionados por médicos veterinários durante todo o período. Em seguida, o sangue é retirado do cavalo e é realizada a separação entre plasma e hemácias, uma vez que o soro será elaborado a partir do plasma. O plasma é, então, diluído e hidrolisado por ação enzimática. Depois disso, o plasma passa por um processo de separação das moléculas. Os anticorpos, presentes em algumas destas moléculas, são a parte de interesse do plasma para a produção do soro (WHO, 2010).

Após passar por dois processos de filtração, os anticorpos já estão devidamente separados do resto do plasma e prontos para prosseguir no fluxo de produção. Os anticorpos são, por sua vez submetidos, a um processo de purificação para que somente as substâncias que não são de interesse sejam eliminadas. Nessa etapa, são adicionados o cloreto de sódio para isotonzar a formulação bem como o fenol que atua como um conservante.

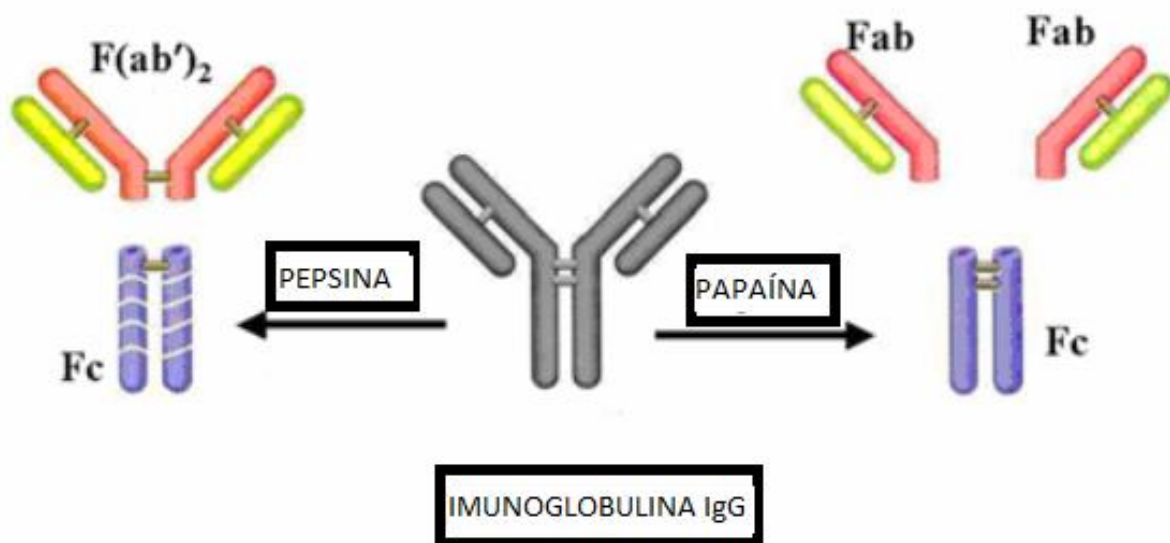
Os anticorpos são submetidos a testes de controle de qualidade que avaliam sua potência e composição. Se aprovado, o anticorpo passa por um último processo de filtração esterilizante, que visa garantir a ausência de microrganismos. O soro é ainda submetido ao Controle de Qualidade da Unidade produtora e, se aprovado, será envasado em ampolas.

5.1 IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas são compostas por, no mínimo, quatro subunidades: duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Essas subunidades se mantêm associadas por meio de pontes dissulfeto e por interações não-covalentes, originando uma molécula simétrica com forma aproximada de um Y. No caso da produção de soros, o principal anticorpo de interesse é a imunoglobulina G (IgG). A molécula de IgG, possui uma massa molecular (MM) de aproximadamente 150 kDa. (ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013).

Sabe-se que podem ser obtidos diferentes fragmentos de IgG dependendo do tipo de enzima utilizada durante o processo de hidrólise, representado na figura 6, na produção de soros. No caso da utilização da enzima papaína, obtêm-se três fragmentos: um fragmento Fc (*fragment crystallizable*) e dois fragmentos Fab (*fragment antigen binding*), de aproximadamente 50 kDa cada. Já com o uso da pepsina, obtêm-se dois fragmentos, um fragmento Fc, de aproximadamente 50 kDa, e um fragmento F(ab')₂ de aproximadamente 100 kDa. A vantagem do processo de hidrólise é a melhor capacidade de distribuição no plasma e neutralização do veneno que os fragmentos apresentam quando comparados à molécula de IgG íntegra (ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013).

Figura 6: Diferentes fragmentos de IgG obtidos por hidrólise



Fonte: Adaptado de ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013.

6 CONTROLE DE QUALIDADE DE SOROS ANTIOFÍDICOS

Com a promulgação da Lei nº8080/90 que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, tornou-se essencial assegurar que os produtos distribuídos à população não ofereçam riscos e nem danos à saúde dos indivíduos (BRASIL, 1990).

No caso dos soros antiofídicos, o controle de qualidade é feito pelo produtor durante as etapas de produção de acordo com as recomendações dos compêndios oficiais, como, por exemplo, as Farmacopeias. Além disso, após o controle do produtor estes produtos são encaminhados ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). É papel do INCQS como laboratório oficial do Ministério da Saúde e parceiro do Programa Nacional de Imunizações (PNI) atuar nas análises documentais e laboratoriais com o objetivo de garantir a qualidade do produto antes que ele seja distribuído à população.

6.1 FARMACOPEIA BRASILEIRA (FB)

A Farmacopeia Brasileira apresenta as seguintes monografias de soros antiofídicos: soro antiofídico pentavalente (*Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi*); soro antiofídico pentavalente e crotálico (*Crotalus durissus*); soro antiofídico pentavalente e laquéico (*Lachesis muta*), soro antiofídico pentavalente anticrotálico e antilaquéico; soro anticrotálico e soro antielapídico bivalente (*Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus*) sendo que todos esses soros devem cumprir as especificações e testes prescritos na monografia de soros hiperimunes para uso humano (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

É preconizado a realização de testes de segurança biológica (pirogênio e esterilidade); doseamento para determinação de potência e realização de ensaios físico-químicos com o objetivo de assegurar a qualidade do soro produzido em todas as fases do processamento (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos ensaios físico-químicos descritos no quadro 1:

Quadro 1: Ensaio físico-químico recomendado pela Farmacopeia Brasileira para avaliação de soros antiofídicos

Ensaio	Limites
Cloreto de sódio	0,70% a 0,90% (p/v)
Fenol	Máximo 0,35% (p/v)
Nitrogênio e proteínas	Máximo 0,30% (p/v) de nitrogênio não protéico e no máximo 15% (p/v) de proteínas
Sólidos totais	Máximo 20%
Sulfato de amônio	Máximo 0,20% (p/v)
Umidade residual	Máximo 3%

Fonte: (Farmacopeia Brasileira, 2010)

6.2 FARMACOPEIA EUROPEIA (FE)

A Farmacopeia Europeia define soros hiperimunes para uso humano como preparações líquidas ou liofilizadas contendo imunoglobulinas purificadas ou fragmentos de imunoglobulinas obtidos a partir do soro ou plasma de animais imunizados de diferentes espécies. Estes soros incluem não só os soros antiofídicos, mas também os aracnídicos, antiescorpiônicos e outras toxinas (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013). Os testes indicados para avaliação físico-química dos soros hiperimunes estão apresentados no quadro 2:

Quadro 2: Ensaio físico-químicos recomendados pela Farmacopeia Europeia para avaliação de soros antiofídicos

Ensaio	Limites
Solubilidade	Deve estar conforme declarado no rótulo.
Volume de extração	Deve estar conforme declarado no rótulo.
pH	De acordo com o limite aprovado para cada produto específico.
Osmolaridade	Mínimo de 240 mosmol kg após a diluição, quando aplicável.
Proteína	90 a 110% do conteúdo declarado na embalagem e não mais do que 100g/L, exceto quando previamente justificado ou autorizado.
Distribuição de peso molecular	Deve estar conforme a especificação de cada produto.
Teor de fenol	Máximo de 2,5 g/L.
Estabilidade	A preparação deve conter entre 80 a 120% da quantidade declarada no rótulo.
Pureza	Realiza-se uma comparação entre a preparação de referência e a amostra na eletroforese em gel de poli-acrilamida não-redutor. Nenhuma banda adicional deve ser encontrada na amostra quando comparada ao padrão.
Proteínas estranhas	Teste de precipitação com antissoro específico. Apenas as proteínas da espécie animal declarada devem estar presentes.
Albumina	Não maior do que 3%
Água	Máximo de 3%

Fonte: Farmacopeia Europeia (2013)

A FE preconiza um número mais expressivo de ensaios físico-químicos quando comparado a FB. Além disso, a FE ainda faz referência ao ensaio para avaliação de pureza dos soros antiofídicos, no qual o método de referência é avaliação por meio da técnica de eletroforese.

7 LABORATÓRIO DE BIOLÓGICOS, ARTIGOS E INSUMOS PARA A SAÚDE

O Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos para a Saúde (LBAIS), setor de Imunobiológicos do Departamento de Química, está localizado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro.

No Brasil, é o INCQS que tem a responsabilidade oficial exclusiva sobre a fiscalização e o controle de qualidade dos imunobiológicos. Praticamente todas as demandas são originadas do Programa Nacional de Imunizações (PNI) ou da Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa). No caso dos soros, o responsável pelos pedidos de análise é o PNI, do Ministério da Saúde (MS). A fiscalização dos imunobiológicos é feita lote a lote, de acordo com normas dos compêndios oficiais.

No INCQS são realizadas seis tipos de modalidades de análise: análise fiscal; análise de contraprova (perícia de contraprova); análise prévia; análise de controle; análise de orientação e a análise especial. No caso dos soros antiofídicos analisados no LBAIS, quase a totalidade das amostras se enquadra na modalidade de análise do tipo orientação, isto é, aquela efetuada em amostras de insumos ou produtos, encaminhados por órgãos públicos, responsáveis pela execução de programas nacionais e/ou regionais de saúde, ou pelo Poder Judiciário. Uma minoria das amostras recebidas configura a modalidade análise de controle, ou seja, aquela efetuada em amostras de produtos sob regime de vigilância sanitária, após sua entrega ao consumo, e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro.

O LBAIS realiza rotineiramente dois ensaios físico-químicos nos soros antiofídicos: determinação quantitativa de fenol e teor de sólidos totais por gravimetria. O primeiro ensaio baseia-se na quantificação espectrofotométrica no comprimento de onda de 546 nm do produto colorido resultante da reação entre o fenol e a 4-aminoantipirina. Já o segundo ensaio, a porcentagem de sólidos totais é calculada a partir da diferença entre o pesa-filtro dessecado e o pesa-filtro vazio, sendo que o procedimento de dessecação é repetido até que se obtenha um peso constante.

Como a legislação brasileira, por meio da FB, não preconiza a avaliação de pureza em soros antiofídicos no Brasil, este ensaio não é realizado nas análises de rotina do LBAIS.

8 JUSTIFICATIVA PARA A AVALIAÇÃO DE PUREZA EM SOROS ANTIOFÍDICOS

A produção de soros, inicialmente, era feita sem grande refinamento causando reações severas aos pacientes, sendo até considerada perigosa aos pacientes. Objetivando-se reduzir estas reações indesejadas, várias melhorias foram feitas ao longo dos anos para isolar, purificar e concentrar o anticorpo de interesse, no caso a IgG. Isto foi baseado no fato de que a presença de albumina seria responsável pela maioria das reações adversas (ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013).

Dentre essas reações adversas, está a reação de anafilaxia. Apesar da probabilidade de ocorrência de uma reação anafilática estar relacionada com a sensibilidade individual do paciente, o refinamento das técnicas de produção dos soros pode vir a diminuir a incidência destas reações. A presença de impurezas no soros antiofídicos aumenta a possibilidade de ocorrência do choque anafilático devido a presença de anticorpos IgE, uma vez que estes se ligam a essas impurezas, que são em sua maioria proteínas heterólogas dos animais utilizados na produção de soros (ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013).

Aguns produtores na tentativa de minimizar o aparecimento destas reações implementaram a digestão enzimática no processo de purificação para retirar a porção Fc da molécula de IgG, pois acredita-se que ela seja também responsável pelo surgimento de algumas reações indesejadas (ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013). Segundo DESHPANDE (2013), mais de 20% dos casos podem desenvolver reações do tipo precoce (nas primeiras horas) bem como tardias (cinco ou mais dias) após a administração do soro antiofídico. Dentre as reações precoces, incluem-se reações anafiláticas (urticária, náusea, vômitos, diarreia, taquicardia) e as pirogênicas (febre, calafrios e hipotensão). Uma minoria de casos pode resultar em hipotensão-anafilática fatal, broncoespasmo e edema. Já as reações tardias, são representadas por febre, náusea, dor nas articulações, urticária, linfadenopatia e até encefalopatias (DESHPANDE, 2013).

Entende-se, então, que soros parcialmente e/ou inadequadamente purificados e/ou com proteína total em excesso podem contribuir para o aparecimento de reações indesejadas nos pacientes. Desta forma, é fundamental que se proponha uma

metodologia, tal como a descrita na FE, para avaliação da pureza de soros antiofídicos no Brasil.

9 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Foram realizados dois experimentos preliminares com amostras provenientes de ampolas de soro antiostrópico (SAB) disponíveis no LBAIS de três produtores denominados A, B e C, objetivando-se realizar uma avaliação preliminar do teor de pureza dos soros produzidos no Brasil.

A primeira técnica selecionada foi avaliação do teor de proteínas totais pelo método de Lowry e a segunda foi a eletroforese em gel de poliacrilamida. Em ambas as técnicas, todas as amostras foram submetidas ao kit *Ready Prep™ 2-D Cleanup Kit* conforme protocolo do fabricante Bio-Rad® para dessalinização e eliminação de possíveis interferentes.

9.1 MÉTODO DE LOWRY PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

O princípio do método (LOWRY, 1951) baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: plasma sanguíneo, saliva humana, tecido animal, plantas, dentre outros (ZAIA, 1998).

9.1.1 Metodologia

Para análise do teor de proteínas totais, utilizou-se o padrão de soro albumina bovina (BSA) do fabricante *Sigma Aldrich®* preparado na concentração de 0,1% p/v. Utilizou-se também os seguintes reagentes para o preparo de soluções: tartarato de

sódio e potássio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio e sulfato de cobre pentahidratado do fabricante Merck® (Alemanha). O reagente de Folin-Ciocalteu utilizado foi do fabricante *Sigma Aldrich*® (Estados Unidos da América).

O padrão de BSA 0,1% foi utilizado para o preparo dos pontos da curva de analítica mediante sucessivas diluições em água deionizada conforme descrito na tabela 3.

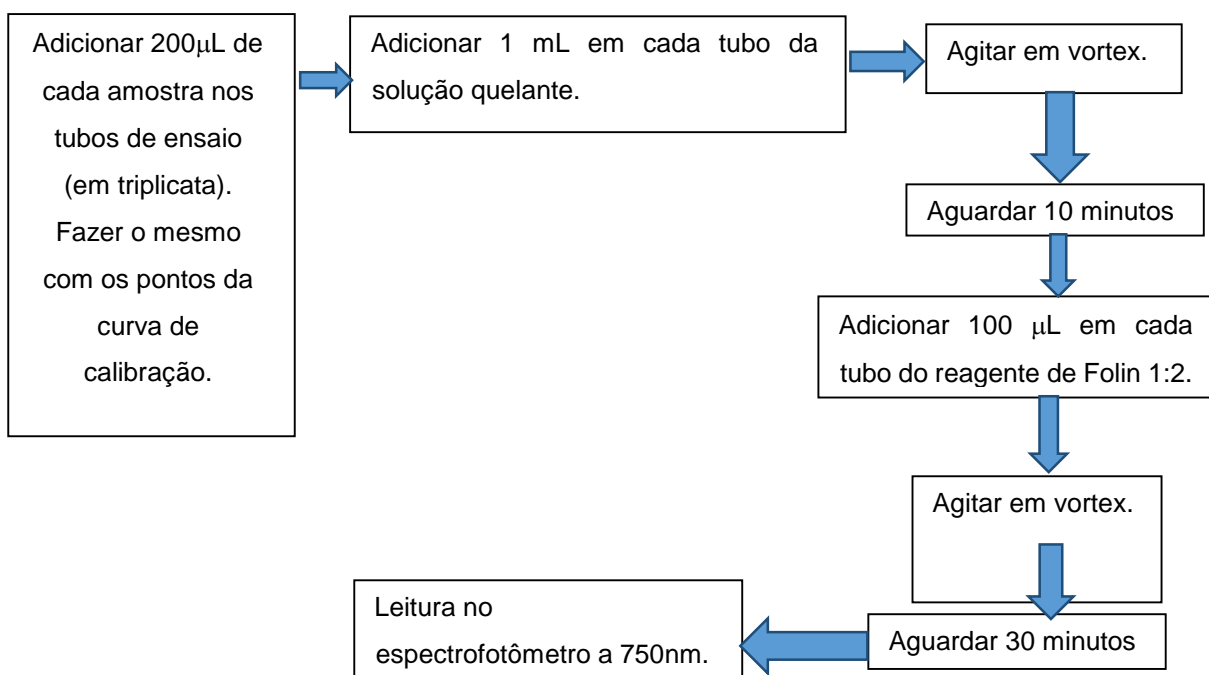
Tabela 3: Dados referentes aos pontos da curva analítica elaborada para o Método de Lowry

Pontos da curva analítica	[BSA] µg/mL estimada	Vol. BSA 0,1% p/v µL	Vol H ₂ O µL	Volume final (µL)
P1	150	30	170	200
P2	200	40	160	200
P3	300	60	140	200
P4	400	80	120	200
P5	500	100	100	200
P6	600	120	80	200

As amostras foram submetidas ao kit *Ready Prep™ 2-D Cleanup Kit* conforme protocolo do fabricante Bio-Rad®. Este procedimento é necessário para realizar a remoção do conservante fenol presente nas amostras, uma vez que o fenol pode interferir na análise do teor de proteínas, por poder ocasionar uma reação de redução com o reagente (LOWRY, 1951). Aplicou-se o fator de diluição de, aproximadamente, 108 vezes em relação à amostra original.

A figura 7 ilustra o fluxograma de processamento do método de Lowry.

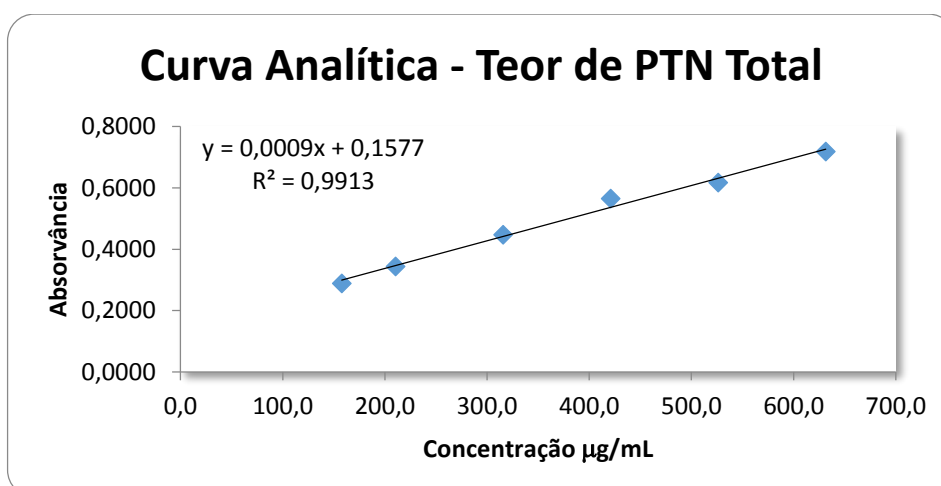
Figura 7: Fluxograma de processamento do método de Lowry



9.1.2 Resultados obtidos pelo método de Lowry

A partir das leituras realizadas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm foi elaborado o seguinte gráfico, representado na figura 8, referente às concentrações dos pontos 1 a 6 da curva analítica:

Figura 8: Gráfico da curva analítica



A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Ela pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais utilizando a regressão linear (INMETRO, 2003).

A curva analítica deste experimento mostrou-se adequada por apresentar um R^2 igual a 0,9913. O coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação R^2 são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (INMETRO, 2003).

A partir do estabelecimento da curva analítica foi possível determinar as concentrações médias das amostras conforme indicado na tabela 4.

Tabela 4: Concentrações médias das amostras A, B e C

Amostra	Concentração média $\mu\text{g/mL}$ Amostra	Concentração média % p/v Amostra
A	57416	5,7
B	18230	1,8
C	59468	5,9

Observa-se que todas as amostras (A, B e C) estão com uma concentração de proteínas totais dentro do limite estipulado pela Farmacopeia Brasileira que é de, no máximo, 15%. As amostras A e C, apresentaram os maiores percentuais de proteínas: 5,7% e 5,9%, respectivamente. Já a amostra B apresentou um percentual de apenas 1,8%.

É interessante salientar que a FB não estabelece um valor mínimo de proteínas totais, ou seja, um valor próximo a 1% de proteínas totais ainda estaria dentro do valor preconizado. Outro ponto interessante, é o não estabelecimento da quantidade máxima de albumina permitida que, no caso da FE, é de 3%. Sabe-se que a albumina, pode

desencadear várias reações adversas ao paciente, por se tratar de uma proteína heteróloga, devendo estar preferencialmente em quantidades reduzidas nos soros.

9.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE consiste em um método de separação eletroforético de acordo com as massas moleculares (MM) das proteínas que estão sendo analisadas. A técnica é realizada em gel de poliacrilamida contendo o detergente SDS (dodecil sulfato de sódio) que é um detergente aniônico que desnatura as proteínas por envolvimento em torno do esqueleto polipeptídico. A ligação com o SDS mascara a carga das próprias proteínas formando complexos aniônicos com constante carga líquida negativa por unidade de massa. Além disso, a conformação nativa da proteína é totalmente alterada na presença do SDS, de tal forma que a maioria das proteínas assume configurações similares, e, portanto um valor similar da razão: carga/massa. Assim, a eletroforese na presença de SDS separa as proteínas, levando-se em consideração exclusivamente as suas MM (JUNIOR, 2013).

9.2.1 Metodologia

As amostras foram submetidas ao kit *Ready Prep™ 2-D Cleanup Kit* conforme protocolo do fabricante Bio-Rad®. O padrão utilizado foi o Padrão Low Range SDS-Page do fabricante Bio-Rad®: fosforilase B (97,4 kDa); soro albumina bovina (66,2 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (31 kDa); inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

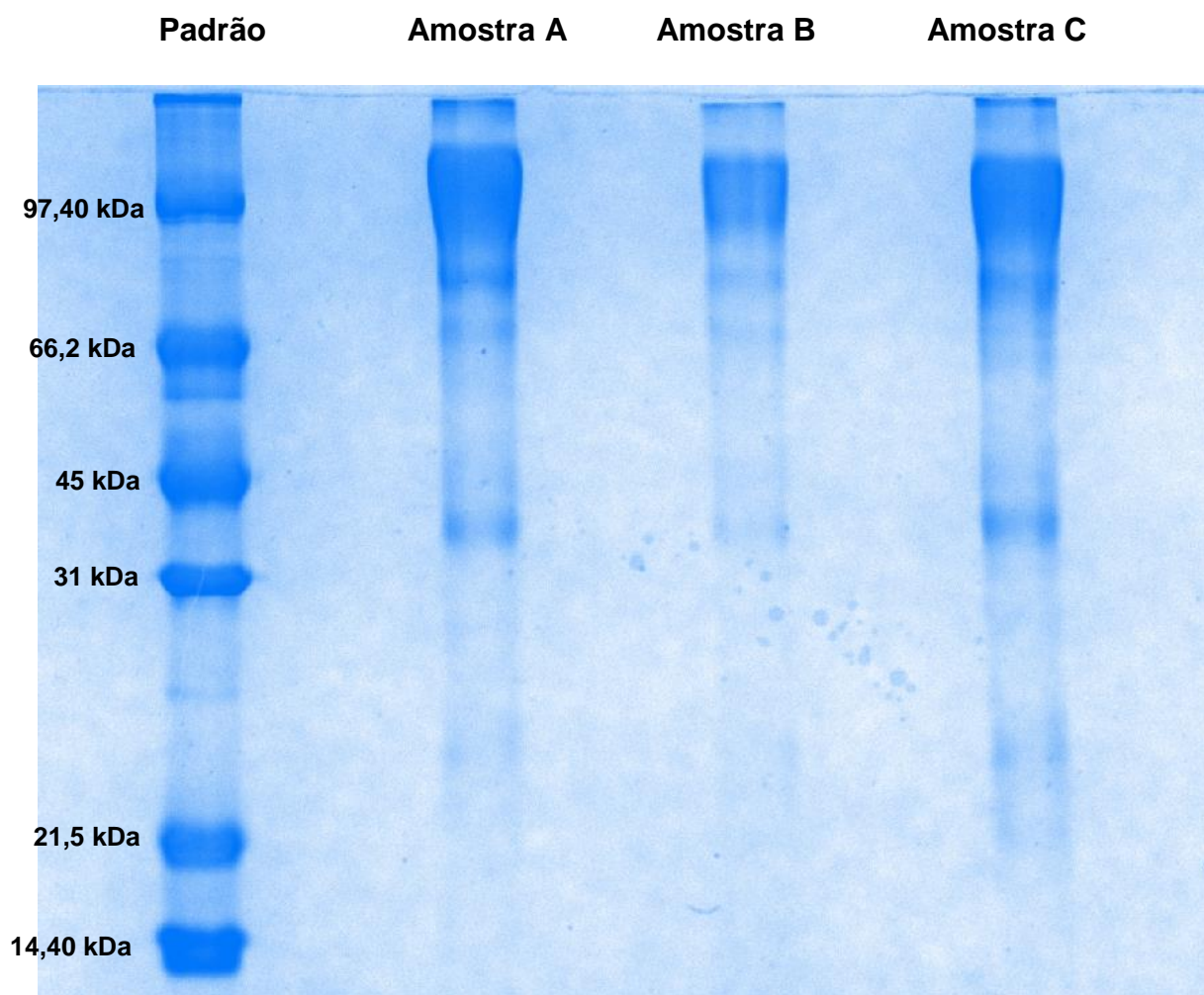
Foram preparados dois géis: um na concentração de 12%, para as amostras tratadas com redutor (β -mercaptoetanol), e outro na concentração de 10% sem redutor. Em cada poço, foi aplicado 10 μ L de cada amostra (produtores A, B e C) e 10 μ L do Padrão Low Range Bio-Rad®. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados pelo corante azul de Coomassie.

Os géis obtidos foram digitalizados nos densitômetros com o auxílio dos softwares Quantity One e Image Lab ambos da Bio-Rad®. Os valores de massa molecular e o percentual relativo de cada banda foram determinados utilizando funções específicas para estes parâmetros.

9.2.2 Resultados da eletroforese

Os géis obtidos ao término do experimento do experimento podem ser visualizados nas figuras 9 e 10.

Figura 9: Gel 10% não redutor na coloração azul de Comassie



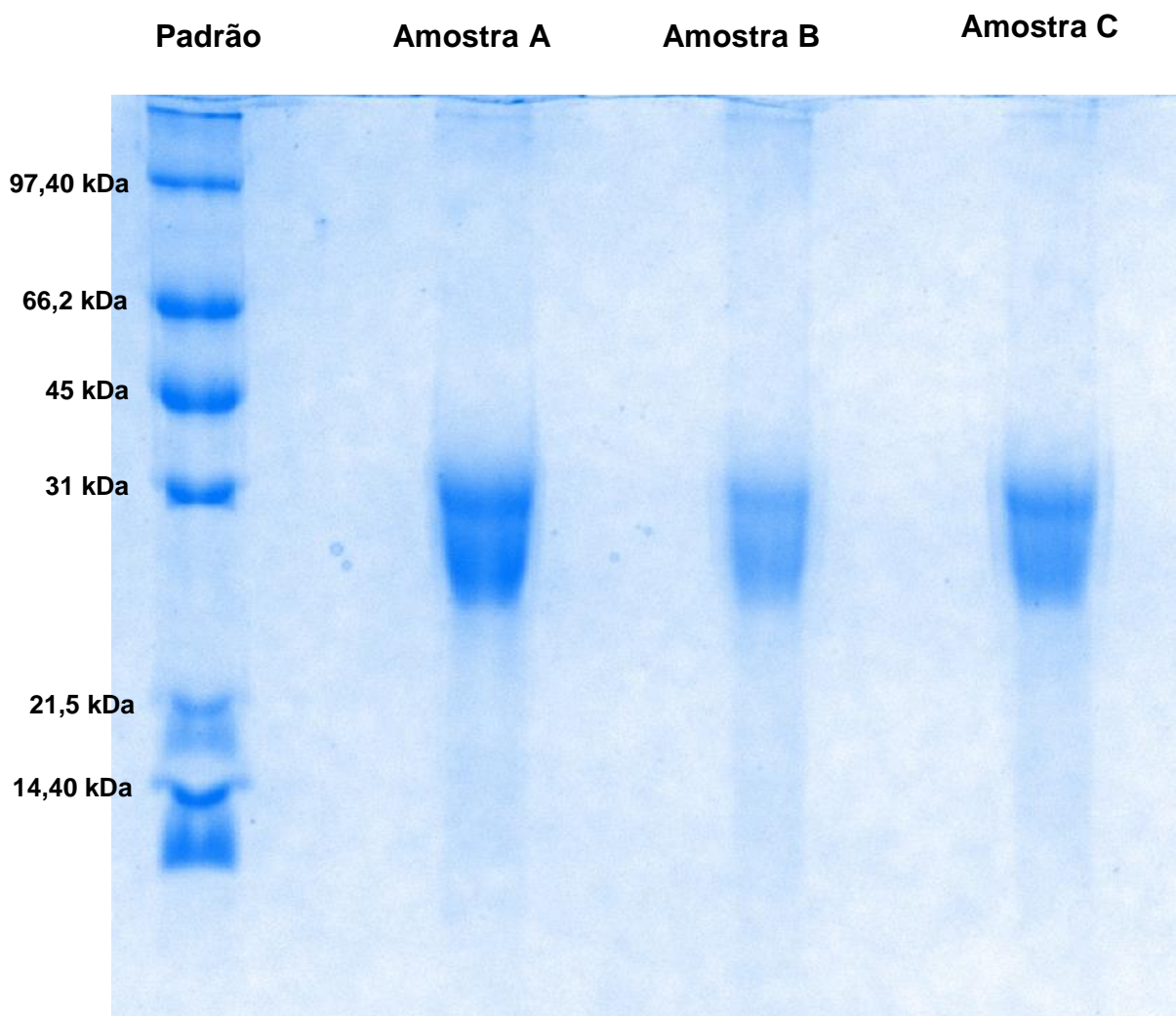
Na figura 9 podemos comparar as massas moleculares das amostras A, B e C em relação ao padrão adotado. A amostra A apresentou quatro bandas com as seguintes MM aproximadas: 97,4 kDa; 81,3 kDa; 70,4 kDa e 36,8 kDa. A amostra B também apresentou quatro bandas com as seguintes MM aproximadas: 97,4 kDa; 79,3 kDa; 69,8 kDa e 37,2 kDa. Já na amostra C foi possível verificar a existência de cinco bandas: 97,4 kDa; 80,2 kDa; 69,4 kDa; 63,9 kDa e 37,8 kDa.

Em termos percentuais, observa-se que as amostras A, B e C apresentam a maior concentração de proteínas, indicada pelo percentual de 64,1%, 69,7% e 55,3%, respectivamente, relativas a banda de número 1 (97,4 kDa) do padrão.

A utilização de enzimas no processo de produção dos soros pode resultar em diferentes fragmentos de imunoglobulinas. A enzima pepsina de MM aproximada de 34,6 kDa (SEPULVEDA, 1975) cliva a molécula de IgG em dois sítios, resultando em dois fragmentos com MM distintas. O fragmento Fc com MM aproximada de 50 kDa e o fragmento Fab₂ com MM aproximada de 100 kDa. Já a enzima papaína com MM aproximada de 23,4 kDa (MITCHEL, 1970) resulta em três fragmentos: um Fc e dois fragmentos Fab, de 50 kDa cada.

Desta maneira, pode-se inferir que as bandas das amostras A, B e C demonstram a presença de proteínas de MM aproximadas às do fragmento Fab₂ cuja MM aproximada é de 100 kDa. A existência de bandas com MM na faixa de 60 a 70 kDa sugere, ainda, a presença de albumina, uma vez que esta possui MM aproximada de 66 kDa e, por se tratar de um soro heterólogo, pode sim, estar presente no produto final, ainda que em pequena quantidade. Outra observação importante, é a banda de MM aproximada 36 kDa a qual é condizente com a MM da pepsina bem como a observação de fragmentos de 100 kDa.

Figura 10: Gel 12% redutor na coloração azul de Comassie



Na figura 10, podemos comparar as massas moleculares das amostras A, B e C em relação ao padrão adotado. A amostra A apresentou duas bandas com as seguintes MM aproximadas: 30,4 kDa e 27,1 kDa. A amostra B, por sua vez, apresentou uma banda com MM aproximada de 30,3 kDa. Já na amostra C foi possível verificar a existência de duas bandas: 30,2 kDa e 27,1 kDa.

É interessante observar que em condições redutoras ocorre um deslocamento das principais bandas que situavam-se na faixa de 100 kDa em condições não redutoras para uma faixa de cerca de 30 kDa.

10 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

É inegável, a importância dos soros antiofídicos para o tratamento das mordidas de serpentes e outros animais peçonhentos. Eles são o único tratamento comprovadamente eficaz e a sua não utilização pode resultar, inclusive, na morte de indivíduos não tratados.

A questão do teor de pureza também é de suma importância, pois ela está atrelada à possibilidade de redução do número e da frequência de reações adversas tanto durante como após a administração dos soros.

A técnica de eletroforese proposta pelo presente trabalho, sugere ser capaz de elucidar a composição dos soros antiofídicos quanto a sua pureza, uma vez que foram observadas bandas adicionais em todas as amostras e não somente o fragmento $F(ab')_2$ como seria esperado com a utilização da enzima pepsina pelo produtor. Foram verificadas bandas sugestivas da presença de albumina e de resíduos enzimáticos.

A avaliação do teor de proteínas totais pelo método de Lowry, assegurou que todas as amostras testadas atendem ao compêndio de referência que é a Farmacopeia Brasileira, que permite o máximo de 15% de proteínas totais. Observa-se, no entanto, uma grande diferença entre os produtores que variou de 5,9% a 1,8% de proteínas totais.

Ainda assim, é necessário que novos experimentos sejam conduzidos com o objetivo de elucidar a questão da pureza dos soros antiofídicos que é de extrema importância para a qualidade dos soros produzidos no Brasil como também para garantir segurança do paciente que receberá este medicamento biológico.

Duas técnicas que podem vir a auxiliar a questão da pureza e que podem ser testadas em experimentos futuros são a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas.

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é largamente utilizada, principalmente pelo fato de ser uma técnica que combina alta resolução com reprodutibilidade. Esta técnica consiste na separação de proteínas baseada em duas importantes propriedades, carga elétrica e massa molecular. Na primeira dimensão (focalização isoeletrica) a separação ocorre com base na carga elétrica da proteína. Assim, as proteínas migram horizontalmente no gel até chegarem ao pH em que sua carga líquida seja zero (ponto isoeletrico). Após esta etapa, as proteínas são submetidas à tradicional

SDS-PAGE para uma segunda separação das proteínas, agora pela diferença da massa molecular das moléculas (GÖRG; WEISS; DUNN; 2008).

Outra técnica que também poderá ser empregada é a identificação por espectrometria de massas que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga de seus íons. O método mais clássico de identificação de proteínas por espectrometria de massas é denominado PMF: *peptide mass fingerprinting*. Esta metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina) produzindo peptídeos. As massas desses peptídeos são então determinadas com grande acuidade (0,1-0,5 Da). As massas obtidas formam uma espécie de impressão digital (*peptide mass fingerprinting*) da proteína. Softwares especiais permitem comparar o PMF da proteína a ser identificada com os gerados teoricamente para todas as seqüências de proteínas presentes nos bancos de dados (CANTU, 2008). Este último método, exibe alta grande sofisticação, sendo interessante para pesquisas a serem desenvolvidas no futuro.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. Campanhas anti-ophidicas. **Memórias do Instituto Butantan**, 5: 195-232. 1930.
- BEHRING VON EA., KITASATO S. Über das zustandeommen der diphterie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, 1890, 16, 1113-4.
- bioactives from venom proteomes. **Toxicon**, Vol. 76, p. 270–281. 2013.
- BERNARDE, P.S. **Serpentes Peçonhentas e Acidentes Ofídicos no Brasil**. Anolis Books. Curitiba, Brasil. 2014.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSSA, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA e DNA in polyacrylamide gels. *Eletrophoresis*, v.8, p.93-99. 1987.
- BOCHNER, R. STRUCHINER, CJ Acidentes por Animais Peçonhentos e Sistemas Nacionais de Informação. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 18(3): 735-746, 2002.
- BOCHNER, R. STRUCHINER, CJ. Epidemiologia dos Acidentes Ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 19(1): 7-16, 2003.
- BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Brasília, DF: [s.n], 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm>. Acesso em: 14 jan. 2015.
- _____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, 2001.
- BRAVES. **Brazilian Venomous Snakes Database**. Disponível em:<http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index.php?lan=pt_br&>. Acesso em: 26 jan. 2015.
- CANTU, M. D. et al . Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 31, n. 3, 2008 .
- CARDOSO, J.L.C.; WEN F.H. Introdução ao ofidismo. In: Cardoso, J.L.C. (Coord.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p.3-5. 2003.
- CHAIMOVICH, H. Ciência, tecnologia e produção no Butantan. **Revista USP**, São Paulo, nº 89, p.78-89, Março/Maio.2011

DESHPANDE, R. P. et al. Adverse drug reaction profile of anti-snake venom in a rural tertiary care teaching hospital. **Journal of Young Pharmacists**, Vol. 5, Issue 2, p.41–45, June 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0975148313000125/1-s2.0-S0975148313000125-main.pdf?_tid=09b6d536-336b-11e4-85f3-00000aab0f26&acdnat=1409749734_41447aa6be9c3a2a0da18f60b1bbdf5a>. Acesso em: 03 set. 2014.

ETAPAS da Produção de Soros. Instituto Vital Brasil. Disponível em: <http://www.vitalbrasil.rj.gov.br/etapas_producao.html>. Acesso em: 15 Jul 2014.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FARMACOPEIA Europeia. 8. ed. Council of Europe. Strasbourg, France. 2013. 2 v.

FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 101, p. 161–173, Dez. 2014.

FISZON, J. T; BOCHNER, R. Subnotificação de acidentes por animais peçonhentos registrados pelo SINAN no Estado do Rio de Janeiro no período de 2001 a 2005. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 11(1), p. 114-127, Mar. 2008.

GERRING, D ; KING, T. R.; BRANTON, R. Validating a faster method for reconstitution of Crotalidae Polyvalent Immune Fab (ovine). **Toxicon**, Vol. 69, p. 42–49. 2013.
GUTIÉRREZ, J. M. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. **Toxicon**, Vol. 60, p. 676–687. 2012.

GÖRG, A.; WEISS, W., M.J. DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, vol. 4, p. 3665–3685. 2004.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008. 2003.

INSTITUTO BUTANTAN. Soros e vacinas. In: Série didática, 3. São Paulo. 44p. 2006.

JUNIOR, R. Q. B. et al. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.100-112. 2013.

KASTURIRATNE, A; WICKREMASINGHE, AR; DE SILVA, N; GUNAWARDENA, NK; PATHMESWARAN, A. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLoS Med** 5(11): e218. 2008.

KRIFI, M. N.; EL AYEB, M.; DELLAGI, K.. The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutical efficiency, and cost. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu , v. 5, n.

2, 1999. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301999000200002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05 nov. 2014.

LEMOS, Josiverton de Carvalho et al . Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo , v. 12, n. 1, Mar. 2009 . Disponível em:<http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2009000100006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 01 jul. 2014.

LEÓN, G. et al. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by Intravenous administration of snake antivenoms. **Toxicon**, Vol. 76, p. 63–76. 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; **J. Biol. Chem.** 193, 265 . 1951.

MITCHEL, R. E. **J. Biol. Chem.**, 245, 3485-3492. 1970.

OTVOS, R. A. et al. Analytical workflow for rapid screening and purification of p. 13-16.

POPE CG. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the proteins. **Br. J. Exp. Pathol.**, 1939, 20, 132-49.

PROCESSO de Fabricação de Soros. Fundação Ezequiel Dias. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/animais_peconhentos/informacoes_uteis/index.php>. Acesso em: 15 jul 2014.

REVISTA MED, São Paulo, p. 35. 2005.

SEGURA, A; HERRERA, M; VILLALTA, M; VARGAS, M; GUTIÉRREZ, JM; LEÓN,G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. **Biologicals**. Vol. 41(2), p. 93-97, mar. 2013.

SEPULVEDA. P. Primary Structure of Porcine Pepsin. III. Amino Acid Sequence of a Cyanogen Bromide Fragment, CB2A, and the Complete Structure of Porcine Pepsin. **J. Biol. Chem.**, 250, 5082. 1975.

SILVA, F. S. Q. Avaliação da pureza de soros antiofídicos brasileiros e desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade. 2008. 187 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

SILVA, Iran Mendonça da; TAVARES, Antônio Magela. Comparative evaluation of adverse effects in the use of powder trivalent antivenom and liquid antivenoms in Bothrops snake bites. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 45, n. 4, Aug. 2012 .Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000400022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 ago. 2014.

SINITOX, Rio de Janeiro, Sistema Nacional de Informações Tóxico – Farmacológicas, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 01 jul 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins.** Genebra, 2010.

ZAIA, D. A. M; ZAIA, C. T. B.V; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Rev. Química Nova** **21(6)**. 1998.

ZOLFAGHARIAN H, MOHAMMADPOUR DOUNIGHI N. Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom. **3; 68 (1) :1-10.** 2013