

SENE Sennae folium

Senna alexandrina P.Miller – FABACEAE

A droga vegetal é constituída dos folíolos dessecados contendo, no mínimo, 2,5% de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B, e 0,6% de senosídeo B ($C_{42}H_{38}O_{20}$; 862,74) e 0,5% de senosídeo A ($C_{42}H_{38}O_{20}$; 862,74). Não deve ser utilizada antes de um ano após a colheita.

CARACTERÍSTICAS

Características organolépticas. A droga possui odor peculiar, sabor amargo e adstringente.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA

Folíolos inteiros, lanceolados, de ápice agudo, obtuso, raro retuso ou retuso-mucronado e base aguda a obtusa, assimétrica, margem levemente revoluta, cartáceos, quebradiços, verde acinzentados a verde acastanhados, com face abaxial mais clara, de 0,6 cm a 5,0 cm de comprimento e 0,2 cm a 1,0 cm de largura; lâmina pilosa em ambas as faces; tricomas tectores cônicos, geniculados, em maior quantidade na face abaxial; veiação camptódromabroquidódroma, as nervuras de maior ordem chegando até a margem e a nervura principal proeminente na face abaxial. Peciólulo curto, normalmente curvo para a face abaxial, com até 0,1 cm de comprimento e até 0,1 cm de largura; face adaxial cilíndrica ou côncava, com duas costelas laterais, face abaxial convexa; tricomas iguais aos da lâmina, antrorsos.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA

Folíolo com lâmina de simetria isobilateral, anfiestomática, com estômatos paracíticos, anisocíticos ou anomocíticos. Em vista frontal, a cutícula é lisa e a epiderme apresenta células poligonais de paredes anticlinais espessas e retilíneas, além de células epidérmicas com distribuição radial em torno da base dos tricomas tectores, que são unicelulares, cônicos, geniculados, com cutícula verrucosa. Em secção transversal, a cutícula é espessa e a epiderme uniestratificada, com células de diferentes formas e de paredes periclinais espessas, e com raros idioblastos cristalíferos contendo monocristais prismáticos e os estômatos são localizados pouco abaixo das demais células epidérmicas; o parênquima paliçádico é uniestratificado; aquele voltado para a face adaxial é contínuo e formado por células bastante alongadas, ricas em cloroplastídios e grãos de amido; algumas destas células apresentam mucilagem, as quais incham e coram com adição de azul de metileno; o parênquima esponjoso possui células de formas variadas, espaços intercelulares pequenos, poucos cloroplastídios, muitos idioblastos contendo grandes drusas e os feixes secundários são similares ao principal e distribuem-se nesse tecido; o parênquima paliçádico voltado para a face abaxial é interrompido na região da

nervura principal e é formado por células mais curtas do que aquelas voltadas para a face adaxial. No bordo da lâmina ocorre colênquima subepidérmico uniestratificado ou parênquima paliçádico, seguidos por vários idioblastos cristalíferos contendo monocristais prismáticos, além de feixes de menor desenvolvimento com grande quantidade de fibras. O feixe principal é colateral e apresenta floema bem desenvolvido e procâmbio geralmente descontínuo, formado por duas camadas celulares; os tecidos condutores são acompanhados externamente por fibras e por idioblastos cristalíferos contendo monocristais prismáticos; junto à face abaxial ocorre uma a quatro camadas de colênquima anelar, seguido por um clorênquima pouco desenvolvido, com células de pequenas dimensões, paredes pouco espessas e poucos cloroplastídios, e por um parênquima de células poligonais, com paredes espessas e pequenos espaços intercelulares. Gotas lipídicas, em pequena quantidade, ocorrem em todos os tecidos. O peciólulo, em vista frontal, apresenta cutícula lisa, epiderme com células de diferentes formas, estômatos em menor densidade e tricomas em maior quantidade que os da lâmina. Em secção transversal, a cutícula é espessa, a epiderme é uniestratificada, com células poligonais pequenas, seguida de uma ou duas camadas de colênquima anelar, parênquima cortical formado por células poligonais de paredes espessas e poucos cloroplastídios e grande quantidade de idioblastos contendo drusas; endoderme com grande quantidade de grãos de amido; sistema vascular formado por dois pequenos feixes colaterais na região das costelas e geralmente um único feixe colateral bem desenvolvido na região central, com procâmbio visível e envolto por bainha fechada de fibras, ou vários feixes distribuídos em forma de anel aberto para a face adaxial e todos envoltos por bainha de fibras, a qual apresenta externamente idioblastos cristalíferos, contendo monocristais prismáticos de grande volume. Gotas lipídicas ocorrem em todos os tecidos, em maior quantidade nos vasculares.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DO PÓ

O pó atende a todas as exigências estabelecidas para a espécie, menos os caracteres macroscópicos. São características: coloração verde-acinzentada a verde-amarelada; porções de tricomas tectores, em vista lateral; fragmentos de epiderme com estômatos, em vista frontal; fragmentos da epiderme com estômatos e com tricomas, em vista frontal; porções de epiderme mostrando a região de inserção do tricoma, em vista frontal; fragmentos da epiderme sobre região da nervura principal, com estômatos, em vista frontal e com cristais do tipo drusas, visíveis por transparência; fragmentos da epiderme do peciólulo, em vista frontal; células epidérmicas, em secção transversal; idioblastos cristalíferos e agrupamentos de fibras, em secção longitudinal; porções de elementos traqueais, em secção longitudinal; porções do mesofilo, conforme descrito, em secção transversal; porção dos parênquimas de assimilação em secção transversal e do feixe vascular, em secção longitudinal; porção de feixe vascular, em secção longitudinal; cristais dos tipos monocristais prismáticos e drusas isolados. As seguintes estruturas, se presentes no pó, caracterizam presença de impureza correspondente à raque: fragmento de porção de feixes vasculares e

de parênquima em secção longitudinal; fragmentos de elementos traqueais, com espessamento reticulado, em secção longitudinal; porção isolada de elemento traqueal, com espessamento helicoidal, em secção transversal; porção de xilema, em secção transversal.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DAS IMPUREZAS

A raque, se presente como impureza, mede de 2,5 cm a 13,0 cm de comprimento e até 0,1 cm de largura, é cilíndrica ou côncava na face adaxial, com duas costelas bem desenvolvidas, e convexa na face abaxial; cicatrizes da inserção dos folíolos bem definidas.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DAS IMPUREZAS

A raque, se presente como impureza, apresenta, em vista frontal, epiderme com células alongadas ou poligonais, de paredes retilíneas, estômatos e tricomas iguais aos da lâmina. Em secção transversal, a cutícula é espessa e rugosa, a epiderme é uniestratificada, o colênquima é semelhante ao do peciólulo, o parênquima cortical é formado por células de forma e volume variável, de paredes espessas, com espaços intercelulares evidentes, cloroplastídios e idioblastos contendo drusas e, em sua porção voltada para a face adaxial, apresenta grande quantidade de grãos de amido; endoderme rica em grãos de amido; sistema vascular central formado por três a oito feixes colaterais e o conjunto envolto por bainha contínua de fibras de pequeno calibre e, externamente a estas, ocorrem idioblastos contendo monocristais prismáticos, iguais aos da lâmina; um feixe vascular menor ocorre em cada uma das costelas, com calota de fibras externa ao floema; o parênquima medular é formado por poucas células de forma poligonal e com paredes espessas, possui poucos grãos de amido e cloroplastídios, além de idioblastos contendo grandes drusas. Em estágio de desenvolvimento secundário, o câmbio tem três a quatro camadas, o floema e a bainha de fibras são bem desenvolvidos e o anel xilemático pode não ser contínuo. Gotas lipídicas ocorrem no floema, no parênquima cortical, na endoderme e no xilema.

IDENTIFICAÇÃO

A. A 25 mg da droga pulverizada (180 µm) adicionar 50 mL de água e 5 mL de ácido nítrico. Aquecer em banho-maria por 15 minutos, deixar esfriar e agitar com 40 mL de éter etílico. Dessecar a fase etérea com sulfato de sódio anidro. Transferir 5 mL para cápsula de porcelana, evaporar em banho-maria até *secura*, esfriar e alcalinizar com hidróxido de amônio. Desenvolve-se coloração avermelhada.

B. Mediante microssublimação, obtem-se, inicialmente, gotículas amarelas, às quais tomam aspecto cristalino. Quando adicionado hidróxido de potássio etanólico a 5% (p/v) a esse sublimado, produz coloração róseo avermelhada.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada* (5.2.17.1), utilizando sílica-gel GF₂₅₄ com espessura de 250 µm, como suporte, e a mistura de acetato de etila, álcool *n*-propílico, água e ácido acético glacial

(40:40:30:1) como fase móvel. Aplicar, separadamente, em forma de banda, 10 µL da *Solução (1)* e 10 µL da *Solução (2)*, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): adicionar a 0,5 g da droga moída 5 mL de mistura de etanol e água (1:1). Aquecer à ebulição. Filtrar.

Solução (2): dissolver separadamente 2,5 mg de senosídeo A e 2,5 mg de senosídeo B em 1 mL de metanol e 1 mL de água, aquecer ligeiramente, se necessário.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Nebulizar com ácido nítrico a 25% e aquecer por 10 minutos a 120 °C. Deixar esfriar e nebulizar a placa com solução de hidróxido de potássio a 5% (p/v) até o aparecimento de manchas. O cromatograma obtido com a *Solução (2)* apresenta, duas manchas de coloração castanho avermelhada referentes ao senosídeo B (Rf aproximadamente 0,2) e senosídeo A (Rf aproximadamente 0,4). O cromatograma obtido com a *Solução (1)* apresenta manchas similares em posição e coloração às manchas obtidas no cromatograma da *Solução (2)*. O cromatograma apresenta ainda duas outras manchas de cor castanho purpúrea pálida, imediatamente acima das primeiras, correspondentes ao senosídeo C (Rf aproximadamente 0,5) e senosídeo D (Rf aproximadamente 0,45).

ENSAIOS DE PUREZA

Material estranho (5.4.2.2). No máximo 2,0%, correspondente às raques foliares.

Água (5.4.2.3). No máximo 10,0%.

Cinzas totais (5.4.2.4). No máximo 12,0%.

DOSEAMENTO

Derivados hidroxiantracênicos

Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível* (5.2.14).

Para a extração, pesar, exatamente, cerca de 0,15 g da droga pulverizada (180 µm) em balão de fundo redondo com boca esmerilhada, adicionar 30 mL de água, misturar e pesar o conjunto. Aquecer em manta de aquecimento, sob refluxo, durante 15 minutos. Deixar esfriar, pesar e restabelecer o peso inicial com água e filtrar desprezando os 10 mL iniciais. Transferir 10 mL do filtrado para um funil de separação de 50 mL, adicionar uma gota de ácido clorídrico 2 M e lavar com três porções de 5 mL de clorofórmio. Rejeitar a fase clorofórmica. Centrifugar a fase aquosa durante 10 minutos a 2000 rpm. Transferir 4 mL do líquido sobrenadante para balão de fundo redondo com boca esmerilhada. Ajustar o pH da solução para 7,0 a 8,0 com cerca de 80 µL de solução de carbonato de sódio a 5% (p/v). Adicionar 8 mL de solução de cloreto férrico a 10,5% (p/v). Misturar e aquecer, sob refluxo, em banho-maria durante 20 minutos. Adicionar 0,4 mL de ácido clorídrico concentrado e manter o aquecimento por 20 minutos, agitar frequentemente, até dissolução do precipitado. Resfriar a solução e transferir para funil de

separação de 50 mL, e extrair com 10 mL e duas vezes de 7 mL de éter etílico, previamente utilizado para lavar o balão de fundo redondo. Reunir os extratos etéreos e lavar com duas vezes de 10 mL de água. Transferir a camada etérea para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com éter etílico.

Solução amostra: evaporar 5 mL da solução etérea, em banho-maria, até resíduo. Ressuspender o resíduo com 5 mL de acetato de magnésio a 0,5% (p/v) em metanol. Filtrar se necessário.

Medir a absorvância da *Solução amostra* em 515 nm imediatamente após o seu preparo, utilizar metanol para ajuste do zero. Calcular o teor de derivados hidroxiantracênicos, calculado como senosídeo B, utilizando 240 nm como valor de absorvância específica, segundo a expressão:

$$SB = \frac{A \times 0,781}{m}$$

em que

SB = derivados hidroxiantracênicos;

A = absorvância da *Solução amostra*;

m = massa da amostra considerando a determinação de água.

Senosídeo B e senosídeo A

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 270 nm; pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada, coluna de 150 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica octadecilsilanizada (4 µm), fluxo da *Fase móvel* de 0,9 mL/minuto.

Eluente A: mistura de água e ácido trifluoroacético (100:0,08).

Eluente B: acetonitrila.

Gradiente da Fase móvel: adotar o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir:

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0 – 12	86	14	isocrática
12 – 19	86 → 77	14 → 23	gradiente linear
19 – 28	77 → 70	23 → 30	gradiente linear
28 – 31	70 → 0	30 → 100	gradiente linear
31 – 33	0	100	isocrática

Solução amostra: pesar exatamente, cerca de 0,2 g da droga seca e moída (180 µm) e colocar em tubo de centrífuga. Adicionar 5 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,05% (p/v) e levar ao banho de ultrassom durante 10 minutos. Centrifugar por 20 minutos a 2000 rpm. Separar o sobrenadante transferindo-o para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume. Filtrar o sobrenadante através de membrana. Diluir 50 µL da solução resultante em 150 µL de água.

Solução padrão estoque: dissolver 10 mg da mistura de senosídeo A SQR e senosídeo B SQR em 10 mL de metanol.

Soluções para curva analítica: diluir uma alíquota de 2,5 mL da *Solução padrão estoque*, em balão volumétrico de 25 mL de modo a obter solução a 50 µg/mL. Diluir alíquotas de 2 mL, 2,5 mL, 3 mL, 3,5 mL, 4 mL e 4,5 mL em balão volumétrico de 5 mL, com metanol, de modo a obter concentrações de 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL e 45 µg/mL.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL das *Soluções para curva analítica* e da *Solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. O tempo de retenção é de aproximadamente 18,0 minutos para o senosídeo B e 20,7 minutos para o senosídeo A. Calcular o teor de senosídeo B e senosídeo A na amostra a partir da equação da reta obtida com a curva analítica. O resultado é expresso pela média das determinações em gramas de senosídeo B e senosídeo A por 100 gramas da droga (%), considerando o teor de água.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipiente de vidro bem fechado, ao abrigo da luz e calor.

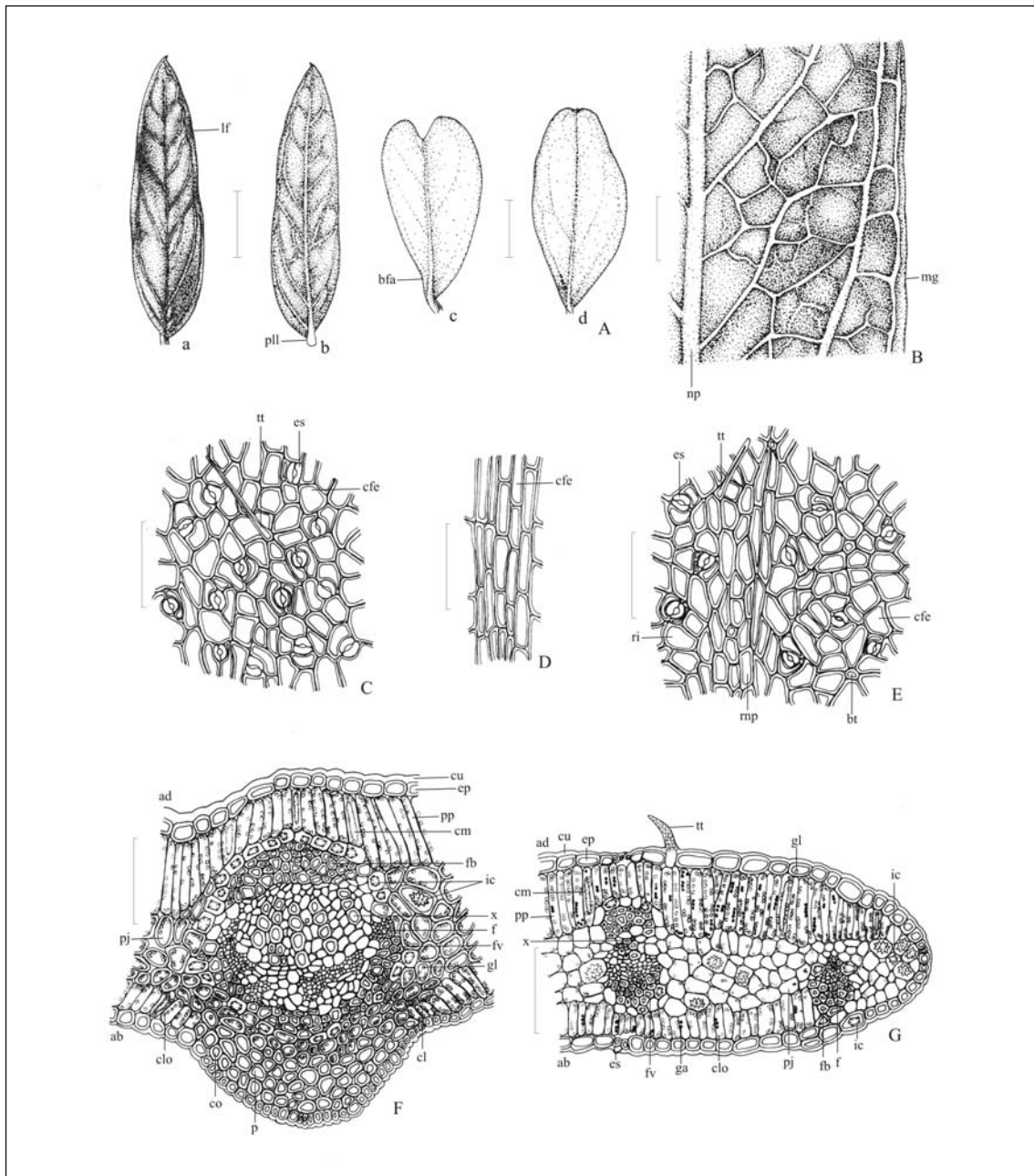


Figura 1 – Aspectos macroscópicos e microscópicos em *Senna alexandrina* P.Miller

Complemento da legenda da **Figura 1**. As escalas correspondem em **A (a, b e d)** a 5 mm; em **A (c)** a 4 mm; em **B** a 1 mm; em **C, D, E, F e G** a 100 μ m.

A – aspecto geral de diferentes formas de folíolos; **a** – face adaxial de folíolo com ápice agudo: lâmina foliar (lf); **b** – face abaxial do mesmo folíolo: pecíolo (pll); **c** – face abaxial de folíolo com ápice retuso: base foliar assimétrica (bfa); **d** – face abaxial de folíolo com ápice retuso-mucronado. **B** – detalhe parcial da venação do folíolo na região da nervura principal até a margem: margem (mg); nervura principal (np). **C** – detalhe da epiderme voltada para a face adaxial, na região intercostal, em vista frontal: tricoma tector (tt); estômato (es); célula fundamental (cfe). **D** – detalhe da epiderme voltada para a face adaxial, na região da nervura principal, em vista frontal: célula fundamental (cfe). **E** – detalhe da epiderme voltada para a face abaxial, na região intercostal e na região da nervura principal, em vista frontal: célula fundamental (cfe); estômato (es); região intercostal (ri); região da nervura principal (mp); tricoma tector (tt). **F** – detalhe da região da nervura principal, em secção transversal: face adaxial (ad); cutícula (cu); epiderme (ep); parênquima paliçádico (pp); célula contendo mucilagem (cm); fibra (fb); idioblasto cristalífero (ic); xilema (x); floema (f); feixe vascular (fv); gota lipídica (gl); clorênquima (cl); parênquima (p); colênquima (co); cloroplastídeo (clo); face abaxial (ab); parênquima esponjoso (pj). **G** – detalhe da região intercostal e do bordo, em secção transversal: face adaxial (ad); cutícula (cu); epiderme (ep); tricoma tector (tt); gota lipídica (gl); idioblasto cristalífero (ic); floema (f); fibra (fb); parênquima esponjoso (pj); cloroplastídeo (clo); grão de amido (ga); feixe vascular (fv); estômato (es); face abaxial (ab); xilema (x); parênquima paliçádico (pp); célula contendo mucilagem (cm).

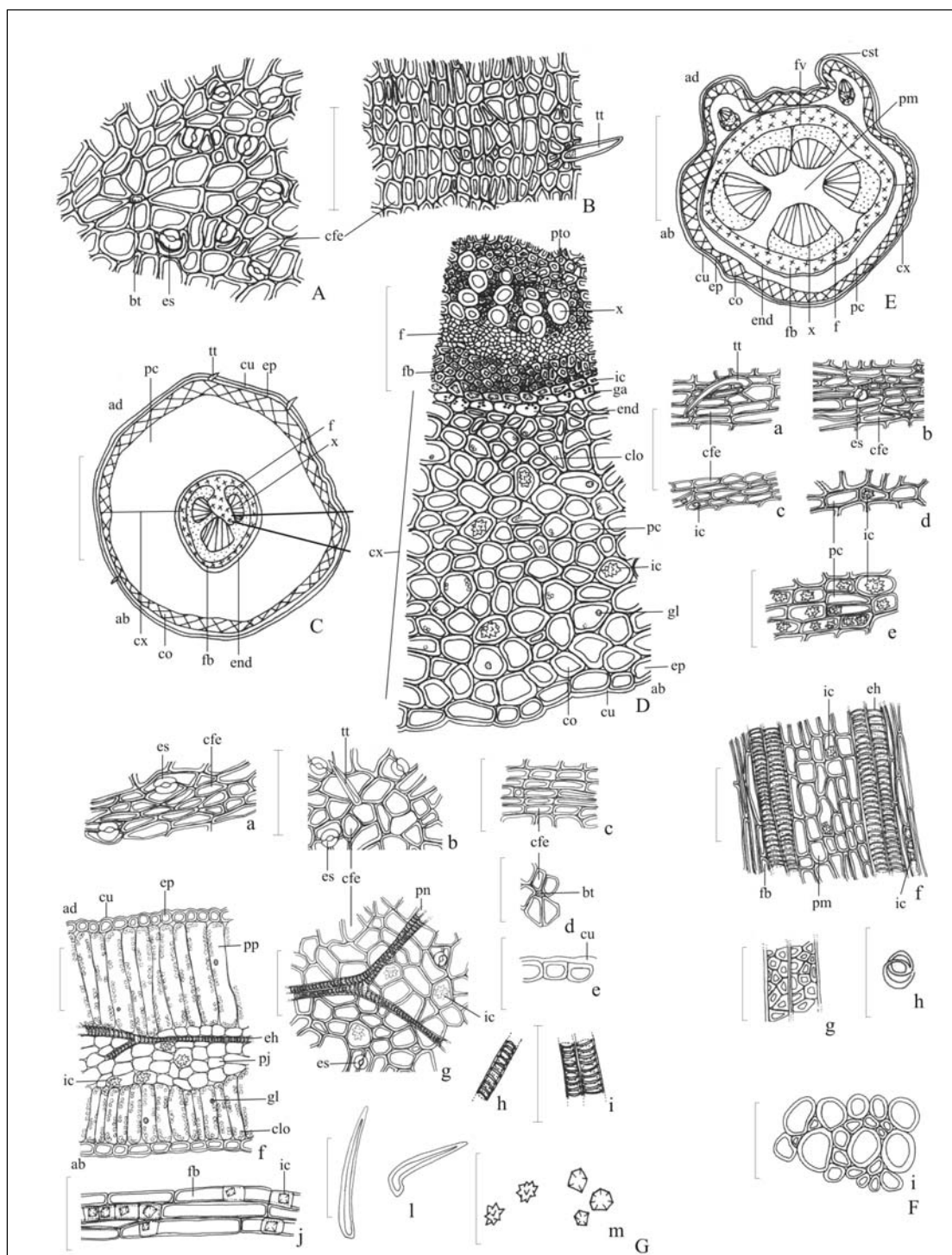


Figura 2 – Aspectos microscópicos e da microscopia do pé em *Senna alexandrina* P.Miller

Complemento da legenda da **Figura 2**. As escalas correspondem em **A, B, D, F (a – i)** e **G (a – m)** a 100 μm ; em **C** e **E** a 400 μm .

A – detalhe da epiderme do peciólulo voltada para a face abaxial, em vista frontal: base do tricoma (bt); estômato (es); célula fundamental da epiderme (cfe). **B** – detalhe da epiderme do peciólulo voltada para a face adaxial, em vista frontal: célula fundamental da epiderme (cfe); tricoma tector (tt). **C** – representação esquemática do peciólulo, em secção transversal: face adaxial (ad); parênquima cortical (pc); tricoma tector (tt); cutícula (cu); epiderme (ep); floema (f); xilema (x); endoderme (end); fibra (fb); colênquima (co); córtex (cx); face abaxial (ab). **D** – detalhe do peciólulo, em secção transversal, conforme destacado em **C**: pontoação (pto); xilema (x); floema (f); fibra (fb); idioblasto cristalífero (ic); grão de amido (ga); endoderme (end); cloroplastídio (clo); parênquima cortical (pc); gota lipídica (gl); epiderme (ep); face abaxial (ab); cutícula (cu); colênquima (co); córtex (cx). **E** – representação esquemática da impureza, correspondente à raque, em secção transversal: face adaxial (ad); feixe vascular (fv); costela (CST); parênquima medular (pm); córtex (cx); parênquima cortical (pc); floema (f); xilema (x); fibra (fb); endoderme (end); colênquima (co); epiderme (ep); cutícula (cu); face abaxial (ab). **F (a – f)** – detalhes do pé das impurezas correspondentes à raque (**a** – detalhe de porção da epiderme com tricoma tector,

em vista frontal): tricoma tector (tt); célula fundamental da epiderme (cfe); estômato (es); idioblasto cristalífero (ic); parênquima cortical (pc); elemento traqueal, com espessamento helicoidal, em secção longitudinal (eh); fibra (fb); parênquima medular (pm). **G** – detalhes do pó do folíolo; **a** – detalhe de porção de epiderme da lâmina, sob a região da nervura principal, em vista frontal: estômato (es), célula fundamental da epiderme (cfe); **b** – detalhe de porção epiderme da lâmina, com estômatos e tricoma tector, em vista frontal: tricoma tector (tt), estômato (es), célula fundamental da epiderme (cfe); **c** – detalhe de porção da epiderme do peciólulo, voltada para a face abaxial, em vista frontal: célula fundamental da epiderme (cfe); **d** – detalhe de porção da epiderme da lâmina, mostrando base do tricoma tector, em vista frontal: célula fundamental da epiderme (cfe), base do tricoma (bt); **e** – detalhe de porção da epiderme da lâmina, em secção transversal: cutícula (cu); **f** – detalhe de porção da região intercostal, em secção transversal: face adaxial (ad), cutícula (cu), epiderme (ep), parênquima paliádico (pp), elemento traqueal, com espessamento helicoidal, em secção longitudinal (eh); parênquima esponjoso (pj), idioblasto cristalífero (ic), gota lipídica (gl), cloroplastídeo (clo), face abaxial (ab); **g** – detalhe de fragmento de epiderme mostrando porção de nervura, estômatos e idioblastos cristalíferos, por transparência, em vista frontal: célula fundamental da epiderme (cfe), porção de nervura (pn), idioblasto cristalífero (ic), estômato (es); **h** – detalhe de porção de elemento traqueal, com espessamento helicoidal, em secção longitudinal, isolado; **i** – detalhe de porção de elementos traqueais agrupados, com espessamento helicoidal, em secção longitudinal; **j** – detalhe de porção agrupamento de fibras associadas a idioblastos cristalíferos, em secção longitudinal: fibra (fb), idioblasto cristalífero (ic); **l** – porções de tricomas tectores isolados, em vista lateral; **m** – detalhe de cristais isolados do tipo drusas e monocristais prismáticos.

SORO ANTIBOTRÓPICO PENTAVALENTE Immunoserum bothropicum

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

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de Identificação da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno veneno de *B. jararaca*.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

O ensaio de potência da amostra tem como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa de *Veneno de referência*.

Veneno de referência: mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica da espécie *B. jararaca*. Deve ser liofilizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).

Determinação da DL₅₀ de veneno: reconstituir a preparação liofilizada de veneno para determinada concentração peso por volume, com solução fisiológica a 0,85% (p/v). Efetuar diluições em progressão geométrica com o mesmo diluente, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, e igualando os volumes finais. Inocular, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongo de cada diluição em grupos de, no mínimo, 10 camundongos albinos suíços de 18 g a 22 g. Observar os animais até 48 horas após a inoculação e registrar o número de mortos em cada diluição. Calcular a DL₅₀ utilizando método estatístico comprovado. A faixa de resposta (porcentagem de mortes) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menores forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL.

Determinação da potência do soro: efetuar diluições progressivas da amostra em solução fisiológica a 0,85% (p/v), utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, de maneira que o volume final após a mistura com a dose desafio de veneno seja idêntico em todos os tubos de ensaio. Reconstituir e diluir o *Veneno de referência* com solução fisiológica a 0,85% (p/v) e adicionar em cada tubo volume constante, de modo que cada dose a ser inoculada por animal contenha 5 DL₅₀. Homogeneizar e incubar a mistura a 37 °C por 60 minutos. Inocular, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongo, de cada mistura, em grupos de pelo menos oito camundongos albinos suíços de 18 g a 22 g. Observar os animais até 48 horas após a inoculação e registrar o número de vivos em cada mistura. Calcular a Dose Efetiva 50% (DE₅₀) em microlitros, utilizando método estatístico comprovado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menores forem os seus limites. Calcular a potência em miligramas por mililitro, segundo a expressão: