

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Estudo da neutralização das atividades fosfolipase A₂ e coagulante das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizando o extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae).

Fabiana Kimie Kashiwabuchi

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG
Dezembro-1999

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Estudo da neutralização das atividades fosfolipase A_2 e coagulante das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizando extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae).

Fabiana Kimie Kashiwabuchi

Profª Drª Maria Inês Homs Brandeburgo

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia-MG
Dezembro-1999**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Estudo da neutralização das atividades fosfolipase A₂ e coagulante das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizando o extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae).

Fabiana Kimie Kashiwabuchi

Aprovada pela banca examinadora em 12 / 12 / 2004 Nota: 100,00

[Faint, illegible text, possibly a stamp or signature]

Prof^a Dr^a Maria Inês Homsi Brandeburgo
Orientadora

[Handwritten signature]
Prof^a Dr^a Amélia Hamaguchi

Ms. Márcia Helena Borges

Uberlândia, 10 de 12 de 2004

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Kazuo e Nanci que se mostraram interessados pelo meu trabalho. Agradeço pela oportunidade que me ofereceram, e que a recompensa venha logo.

Agradecimento

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Inês Homsi Brandeburgo pela amizade, dedicação, interesse e pela paciência em ler e reler o meu trabalho.

Agradeço à minha co-orientadora Prof^a Dr^a Amélia Hamaguchi, que sempre esteve pronta a me ajudar, dando conselhos e opiniões que foram muito válidos.

Agradeço à Marcinha que sempre esteve disposta a me ajudar, dando conselhos e orientações.

Agradeço ao Fábio Oliveira pela orientação do dia-a-dia, uma pessoa essencial no laboratório, se eu pudesse escolher 4 pessoas para a banca, com certeza ele seria uma delas.

Agradeço aos amigos do laboratório, que agora são muitos, pelas ajudas, principalmente na estressante atividade fosfolipase A_2 .

Aos amigos Tianinha, Fran, Taty, Rê, Júnia, Cris, Poliana, Gilvan, Fábio Moroni, Willian, Luiz Fernando, Rodrigo e Ana Flavia pela agradável convivência no laboratório.

Agradecimento à amiga Polyana Oliveira, uma pessoa muito especial, sempre me ajudando nos momentos mais críticos.

Agradecimento especial ao meu namorado Adriano, que nunca soube me dizer não e sempre esteve ao meu lado.

“

“ Não quero ser um gênio...
tenho problemas suficientes tentando ser um homem”
(Albert Camus)

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABREVIATURAS.....	viii
1- INTRODUÇÃO:	1
2- MATERIAL E MÉTODOS:	8
2.1- Obtenção da peçonha:.....	8
2.2- Obtenção do extrato vegetal:.....	8
2.3-Preparação das amostras:.....	9
2.4- Dosagem de proteínas:.....	9
2.5- Avaliação do efeito:.....	10
2.6- Atividades enzimáticas "in vitro:"	10
2.6.1- Atividade Fosfolipase A ₂	10
2.6.2- Atividade Coagulante:.....	11
2.7- Determinação da DMC:.....	11
2.8-Tratamento estatístico.....	12
3-RESULTADOS:	13
3.1- Dosagem de proteínas:.....	13
3.2- Atividade fosfolipase A ₂ :.....	14
3.2.1- Curva dose-resposta:.....	17

3.3- Determinação da DMC.....	21
3.3.1- Atividade Coagulante:.....	21
4- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:.....	23
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	27

ABREVIATURAS

PLA- enzima fosfolipase

DMC- dose mínima coagulante

VB- veneno bruto

EVA- extrato vegetal aquoso

RESUMO

As peçonhas de serpentes são principalmente de natureza proteica, com ou sem atividade enzimática e responsáveis pelos principais efeitos do envenenamento. Atualmente muitos pesquisadores estão utilizando extratos vegetais na busca e síntese de novas drogas com possibilidade de usos terapêuticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis* sobre as atividades PLA₂ e coagulante das peçonhas das serpentes *Bothrops moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis*. A partir de folhas de *C. mariquitensis* coletadas na região de Uberlândia foi feito o extrato vegetal que após liofilização foi armazenado à temperatura de -20°C e dissolvido em água somente na hora do uso. A atividade PLA₂ foi realizada pelo método potenciométrico, usando-se o extrato vegetal aquoso (EVA) incubado por 1h ou não com determinada peçonha (VB) na proporção de 1:5 (m/m), VB e EVA, respectivamente. Observou-se uma inibição de cerca de 70% na atividade PLA₂ de ambas as peçonhas estudadas quando incubadas por 1 hora com o EVA. A peçonha de *B. moojeni* quando não incubada com o EVA, mostrou uma inibição de aproximadamente 35%. Uma curva dose-resposta foi traçada para observar o grau de inibição variando-se a concentração de EVA, as proporções utilizadas foram: 1:2,5; 1:5 e 1:7,5 (m/m) VB e EVA, respectivamente. Para o VB de *B. moojeni* tanto os ensaios incubados como os não incubados

apresentaram a mesma reta, com os resultados quase proporcionais, elevando a inibição à medida que a quantidade de EVA era aumentada. Para o VB de *B. neuwiedi* os resultados mostraram maior eficiência para os ensaios incubados, causando 100% de inibição já na proporção de 1:2,5 (VB:EVA). Quanto à atividade coagulante sobre o plasma bovino, o EVA foi mais eficiente para inibir a peçonha de *B. neuwiedi* do que a de *B. moojeni*, porém considerado eficiente para ambas. Tais resultados sugerem que o EVA de *C. mariquitensis* apresenta princípio(s) ativo(s) capaz(es) de inibir a ação das enzimas PLA₂ e coagulante de peçonhas botrópicas.

I- INTRODUÇÃO:

As peçonhas das serpentes são constituídas principalmente por proteínas e enzimas utilizadas na captura de presas e defesa desses animais. E é esse complexo proteico responsável pelos efeitos do envenenamento, como a miotoxicidade, distúrbios na coagulação sangüínea e edema. As peçonhas têm sido amplamente estudadas a fim de reconhecer os seus componentes e verificar as suas ações.

As principais serpentes peçonhentas estão compreendidas em quatro famílias: Viperidae (sem representantes nas Américas), Hydrophidae (serpentes marinhas), Elapidae (corais) e Crotalidae (gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*) (BARRAVIEIRA, 1994).

Os principais gêneros responsáveis pelos acidentes ofídicos no Brasil são: *Bothrops*, denominadas popularmente jararacas e *Crotalus*, que são as cascavéis; sendo as primeiras responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos (ROSENFELD, 1971; RIBEIRO, 1993). Apesar de serem raros os acidentes fatais por serpentes do gênero *Bothrops*, os casos se agravam devido à intensidade dos efeitos locais. No triângulo mineiro, os acidentes confirmados no período de 1984 a 1991 foram causados principalmente por serpentes

da espécies: *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992).

Entre os efeitos locais do envenenamento botrópico os que se destacam são: dor, edema, necrose e hemorragia local (JIMENEZ-PORRAS, 1973). O edema é caracterizado pela saída do plasma e infiltração celular, envolvendo a participação de mediadores endógenos, tais como os eicosanóides, ativação do fator de agregação plaquetária, liberação de histamina e serotonina (TREBIEN e CALIXTO, 1989). A necrose local frequentemente afeta a pele e as camadas musculares mais profundas e nos casos mais severos pode haver a completa destruição do tecido (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991). A hemorragia geralmente aparece logo após o envenenamento e pode ser acompanhada por necrose ao redor da área atingida. Há dois hipotéticos mecanismos de ação para as hemorragias. O primeiro postula que as hemácias e outros componentes saíam do vaso danificado por diapedese através das junções abertas entre as células, devido à ação proteolítica da peçonha e o outro mecanismo sugere que as hemácias e os componentes sanguíneos saíam através dos espaços formados entre as células endoteliais (OWNBY, 1990). Os efeitos sistêmicos mais frequentes são coagulação sanguínea (KLOBUSTIZKI, 1961) e hemorragia (OSHAKA, 1979).

A trombina é a enzima chave importante para a hemostasia, pois apresenta capacidade de formação e estabilização de coágulos de fibrina, hidrolizando as cadeias α e β do fibrinogênio pela remoção de pequenos fragmentos designados fibrinopeptídeos A e B, respectivamente (CASTRO *et al.*, 1998).

Atualmente mais de 100 diferentes peçonhas de serpentes são conhecidos por afetar o sistema hemostático através de uma variedade de mecanismos. O sistema de coagulação sanguínea é

baseado em um número de complicadas interações que envolvem proteínas do sangue, plaquetas, células endoteliais e estruturas subendoteliais. Proteínas e peptídeos encontrados em peçonhas de serpentes são conhecidos por produzir efeitos de ativação e inativação em várias interações do sistema de coagulação (MARKLAND, 1998).

Neste contexto destaca-se a ação das toxinas coagulantes conhecidas como "thrombin like," que são serinoproteases com ação semelhante à da trombina, causando a formação do coágulo de fibrina por atuarem na fase final do processo de coagulação do sangue. A peçonha pode também agir sobre outros pontos na cascata de coagulação, como mostrado na figura 1.

Por outro lado, existem várias enzimas fosfolipases (A_1 , A_2 , C, D) que atuam em diferentes posições do substrato, liberando diferentes produtos. A enzima estudada neste trabalho foi a fosfolipase A_2 (PLA_2), a principal enzima encontrada nas peçonhas (SUZUKI e IWANAGA, 1970).

As PLA_2 são enzimas digestivas que inicialmente surgiram como secreções salivares e tinham por função lubrificar os alimentos e higienizar os dentes. Ao longo do período evolutivo, esta secreção foi acrescida de proteínas e enzimas tóxicas que passaram a ter a função de paralisar e matar a presa (GANS e GANS, 1978).

Fosfolipases A_2 estão presentes em uma ampla variedade de peçonhas e secreções pancreáticas. Nas peçonhas de serpentes essas enzimas exercem, ao lado de seu papel digestivo, várias atividades biológicas, experimentalmente verificadas, como: neurotoxicidade, miotoxicidade, indução e/ou inibição de agregação plaquetária, efeitos hemolítico, edematogênico, anticoagulante, convulsivo, hipotensor e cardiotoxico (KINI e EVANS, 1989).

A enzima PLA₂ tem como substrato os fosfolipídeos de membrana celular, que a sustentam e contribuem para manutenção de suas características e funções. Os fosfolipídeos ao serem hidrolisados pela ação da enzima, desestruturam a membrana, comprometendo assim a sua permeabilidade seletiva.

O tratamento com soro antiofídico é o método mais eficaz para combater os efeitos do envenenamento, porém este tratamento está restrito a fatores como o tempo decorrido após a picada. Como os efeitos locais ocorrem muito rapidamente, geralmente não são revertidos pela soroterapia (KAMIGUTI *et al.*, 1996).

Por esta razão, tratamentos alternativos têm sido procurados. Por exemplo, SOARES *et al.* (1997) purificaram o complexo antibotrópico (ABC) a partir do soro de um marsupial (*Didelphis albiventres*) comum na região de Ribeirão Preto, São Paulo, e verificaram que esta proteína foi capaz de neutralizar completamente a hemorragia, a miotoxicidade e o edema induzidos por peçonhas botrópicas ou frações isoladas, além de aumentar significativamente o tempo de coagulação sanguínea e inibir parcialmente a atividade PLA₂ destas toxinas.

Por outro lado, nossa comunidade leiga têm utilizado extratos de plantas no tratamento de várias doenças e também em acidentes ofídicos, (conhecidas como antiofídicas) e este conhecimento tem sido transmitido entre gerações ao longo dos anos como credices populares. E a comunidade científica têm se empenhado na tentativa de comprovar estes efeitos, extração e caracterização dos princípios ativos e como esses extratos vegetais atuam .

Por estarem presentes na natureza e em abundância, o uso de extratos vegetais tem se difundido cada vez mais. Atualmente tem se buscado novas alternativas para reduzir as sequelas causadas pelo envenenamento.

A finalidade da pesquisa neste campo é, principalmente, a investigação da segurança dos extratos (toxicidade e dose efetiva, entre outros), sua eficiência e a constância da atividade, identificação e isolamento do princípio ativo, determinação de sua estrutura e a possibilidade de síntese e modificações desse princípio.

Os princípios ativos dos extratos vegetais, na maioria das vezes são produtos metabólicos secundários que em plantas da mesma espécie podem diferir quanto às condições ambientais tais como: temperatura, pH do solo, umidade, tipo de solo, diferentes estações do ano, entre outros. Estes produtos se distribuem em todas as partes da planta (folhas, caule, raízes). É muito importante para o pesquisador definir e padronizar a classificação correta, a época e o local de coleta da planta, bem como o modo de preparo do extrato vegetal. Ao buscar o conhecimento de novas plantas que apresentem a mesma atividade de uma já previamente estudada, é aconselhável que se estude uma que seja taxonomicamente próxima, pois a possibilidade de encontrar esta atividade é bem maior.

Várias plantas têm sido estudadas quanto à atividade antiofídica, tais como: *Eclipta prostata* (erva-botão), que apresentou proteção contra doses letais da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (MARTZ, 1992); *Curcuma longa* (açafrão), que neutraliza uma neurotoxina extraída da peçonha de *Naja naja siamesis* (CHERDCHU *et al.*, 1978); *Hibiscus esculentus* (quiabo), que apresentou eficiência do extrato aquoso obtido das sementes frescas ou secas do quiabo na inibição da peçonha de *Bothrops jararaca* (PEREIRA *et al.*, 1994; PACHECO *et al.*, 1995) e o óleo essencial de *Casearia sylvestris* (guaçatonga), que inibiu significativamente o edema e a permeabilidade vascular induzidos pela peçonha de *Bothrops alternatus* (RODRIGUES *et al.*, 1997).

De acordo com BORGES *et al.* (1998), o extrato vegetal aquoso dessa mesma planta (*Casearia sylvestris*) indicou alta taxa de inibição

da atividade PLA₂ realizada com as peçonhas de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi*, principalmente quando foi utilizado o extrato vegetal aquoso preparado a partir das folhas.

Dando continuidade ao trabalho anteriormente citado, estamos iniciando nossos estudos usando o extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*, popularmente conhecida como limãozinho.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacortiaceae) sobre as atividades fosfolipase A₂ e coagulante sobre o plasma bovino das peçonhas das serpentes: *Bothrops moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis*.

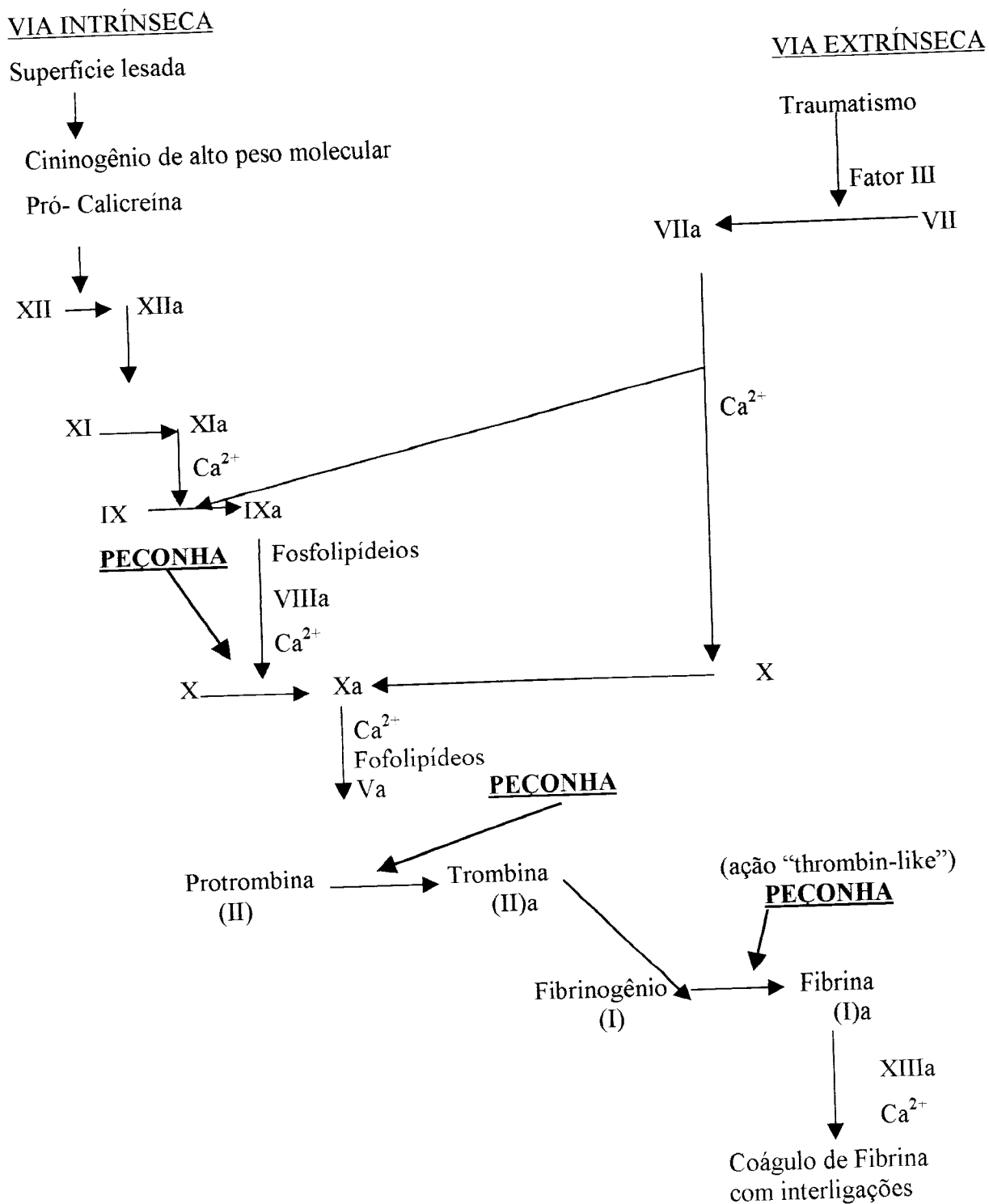


Figura 1: Cascata de coagulação sanguínea. Um coágulo de fibrina é formado pela ação conjugada das vias intrínseca e extrínseca. Esta figura mostra os diferentes pontos onde as peçonhas de serpentes podem agir na cascata da coagulação sanguínea.

II- MATERIAL E MÉTODOS:

1) Obtenção das peçonhas:

As peçonhas utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa e pela professora Vera Lúcia Brites do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia. As espécies cujas peçonhas foram estudadas são: *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

2) Obtenção do extrato vegetal:

A planta utilizada foi a *Casearia mariquitensis*. Esta foi coletada com o auxílio do professor Dr. Glein Monteiro de Araújo do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia, em uma comunidade de mata mesófila semi-decídua parcialmente alterada, próxima ao rio Araguari, em ambiente de forte declividade e com rochas na superfície. A coleta foi realizada entre os meses de novembro e dezembro.

O extrato foi preparado a partir das folhas da planta. Estas foram lavadas, trituradas com pequena quantidade de água desionizada, o suficiente para cobrir as folhas. Posteriormente foi

centrifugada à 3000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C .

No dia do experimento, 2,0 mg de extrato foram pesados e dissolvidos em 1,0ml de água desionizada, obtendo-se assim uma solução de 2mg/ml, designada extrato vegetal aquoso (EVA).

3) Preparação das amostras:

Cerca de 20 mg de cada peçonha foi pesada, dissolvida em 500 μl de solução salina e centrifugada à baixa velocidade por 10 min e o sobrenadante coletado e reservado. Em seguida, acrescentou-se mais 500 μl de solução salina ao precipitado formado, que foi novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante adicionado ao primeiro. A amostra devidamente etiquetada foi submetida à dosagem de proteínas. Em seguida as amostras foram aliquotadas em frações de 100 e 200 μg as quais foram liofilizadas para posterior armazenamento a -20°C até o momento do experimento.

4) Dosagem de proteínas:

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de peçonha, soluções contendo 0,1 a 0,2 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do Microbiureto (ITZHAKI e GILL, 1964). A amostra de proteínas foi completada para o volume de 1,0 ml com água, à qual se acrescentou 500 μl dos reagentes R1 e R2 (previamente preparados em nosso laboratório) e a seguir foi feita a leitura em espectrofotômetro (SPEKOL) a 310 nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 é composto por 21% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em NaOH 30,4% e o R2 é formado por uma solução de NaOH a 30%.

5) Ensaio de inibição:

Para avaliar o efeito do EVA sobre as peçonhas (VB) foram realizados triplicatas de cada ensaio de atividade enzimática, usando-se 2 controles e 2 testes como descrito a seguir:

= **Ensaio 1:** Controle positivo, que consiste em analisar a atividade enzimática específica de cada peçonha

= **Ensaio 2:** Controle negativo, que consiste em analisar se o EVA é capaz de induzir também atividade enzimática.

= **Ensaio 3:** Peçonha incubada à temperatura ambiente com o extrato vegetal (VB+EVA) por 1h.

= **Ensaio 4:** Peçonha não incubada com o extrato vegetal. Neste caso o VB e EVA eram misturados imediatamente antes do ensaio.

6) atividades enzimáticas "in vitro"

6.1)-Atividade Fosfolipase A₂:

A atividade fosfolipase A₂ foi realizada pelo método potenciométrico descrito por DE HAAS e col. (1968), que usa como substrato a gema de ovo, que é riquíssima em fosfolipídeos. Foi feita uma emulsão usando-se uma de gema de ovo em 50 ml de água desionizada, na presença de desoxicolato de sódio 0,03M e CaCl₂ 0,6M na proporção de 15:10:1 (v/v), respectivamente para cada 100 ml de solução final.

Foram utilizados para cada ensaio 10 ml desta solução. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução de NaOH padrão, 0,1208N em pH 8,0 e temperatura ambiente (28° C). A atividade PLA₂ específica foi realizada utilizando-se 10 µg de VB e calculada pela quantidade de microequivalentes de base consumida por minuto por mg de proteína (µeq/ min/ mg).

Para os testes de inibição com VB+EVA, incubados ou não foi utilizada sempre a proporção de 1:5 (m/m) respectivamente, exceto quando indicado.

6.2) Atividade coagulante:

A atividade coagulante foi realizada utilizando-se como substrato o plasma bovino citratado conforme descrito por WARE e SEEGERS (1949), modificado por HOMSI BRANDEBURGO (1987). Foi utilizado para cada ensaio 200 µl de plasma mantido em banho-maria a 37° C.

A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação ao primeiro sinal de formação da rede de fibrina, após adicionar as amostras. Para os ensaios de inibição desta atividade enzimática, foi necessário determinar primeiramente a DMC para cada peçonha. Nestes ensaios, foram utilizadas 3DMC para a peçonha de *B. moojeni* na proporção 1:3 (m/m) VB e EVA respectivamente e 1DMC para a peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, na proporção de 1:1 (m/m) VB e EVA respectivamente.

7) Determinação da DMC:

Para determinar a DMC são feitos vários ensaios de coagulação como descrito acima em diferentes concentrações de peçonha, obtendo-se assim o valor médio capaz de coagular o plasma em 1,0 minuto. A DMC é definida como a menor quantidade de peçonha capaz de coagular o plasma citratado em 1,0 minuto. (ASSAKURA *et al.*, 1992).

8) Tratamento Estatístico:

O tratamento estatístico foi realizado com o auxílio da aluna de graduação em Estatística da Universidade Federal de São Carlos, Andréia Augusto Souza Melo, sendo utilizado o programa *statistic minitab*. A partir das variáveis: unidades de atividade PLA₂ consumidas por minuto por miligrama e tempo de coagulação do plasma, aplicou-se estatística paramétrica. O teste utilizado foi o "Teste de Tukey".

III- RESULTADOS:

3.1- Dosagem de proteínas:

Inicialmente após preparar as soluções de cada peçonha foi feita a dosagem de proteínas como descrito no item 4. Estes resultados estão apresentados na tabela 1, onde se pode verificar a diferença entre o valor pesado e o valor dosado, e também a relação entre a dosagem de proteína e o peso seco da peçonha.

Tabela 1: Dosagem de proteínas das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis*

Peçonha	Peso (mg)	Dosagem de Proteína(mg)	% de Proteínas em Relação ao Peso Seco
<i>B. moojeni</i>	20	15,2	76
<i>B. neuwiedi</i>	20	12,0	60

3.2- Atividade PLA₂:

Os resultados referentes aos ensaios de inibição da atividade PLA₂ de ambas as peçonhas estudadas, como descrito no ítem 6.1, estão apresentados na tabela 2 e figura 2. É interessante ressaltar que os controles negativos mostram que o EVA nas concentrações utilizadas não apresenta atividade PLA₂.

Para os ensaios cujo VB foi incubado por 1h com o EVA, tanto a peçonha de *B. moojeni* quanto a de *B. neuwiedi pauloensis* apresentaram uma porcentagem de inibição de aproximadamente 70%. E para os ensaios onde não houve incubação por 1h, os resultados de inibição da atividade PLA₂ foram melhores para a peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, que apresentou uma porcentagem de inibição de 65% enquanto que a peçonha de *B. moojeni* apresentou inibição de 38%. A atividade PLA₂ da peçonha foi considerada 100%, ou seja, 0% de inibição. Para estes testes de inibição foram utilizados 10 µg de peçonha para 50 µg de extrato vegetal aquoso (1:5 m/m).

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey com $p=0,000001$ indicando que há diferença significativa entre os ensaios 3 e 4 de *B. moojeni*. No entanto, os ensaios 3 de ambas as peçonhas e o ensaios 4 de *B. neuwiedi pauloensis* não apresentaram diferença significativa, isto é, EVA é igualmente eficiente para as duas peçonhas estudadas.

Tabela 2: Determinação da Atividade PLA₂ da peçonha de *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis* e inibição pelo extrato vegetal aquoso de *C. mariquitensis*.

Peçonha	Ensaio	Atividade PLA ₂ * (U/mg/min)	Porcentagem de Inibição
<i>B. moojeni</i>	E1	121	-
	E2	0	-
	E3	37	69
	E4	75	38
<i>B. neuwiedi</i>	E1	81	-
	E2	0	-
	E3	21	74
	E4	28	65

* Estes resultados referem-se à média de 3 testes realizados.

E1: Controle positivo (10 µg de VB)

E2: Controle negativo (50 µg de EVA)

E3: VB incubado à temperatura ambiente com o EVA por 1h, na proporção de 1:5 respectivamente, isto é, 10 µg de VB para 50 µg de EVA

E4: VB não incubado com EVA. Neste caso, VB e EVA foram misturados imediatamente antes do ensaio, mantendo a proporção de 1:5 respectivamente.

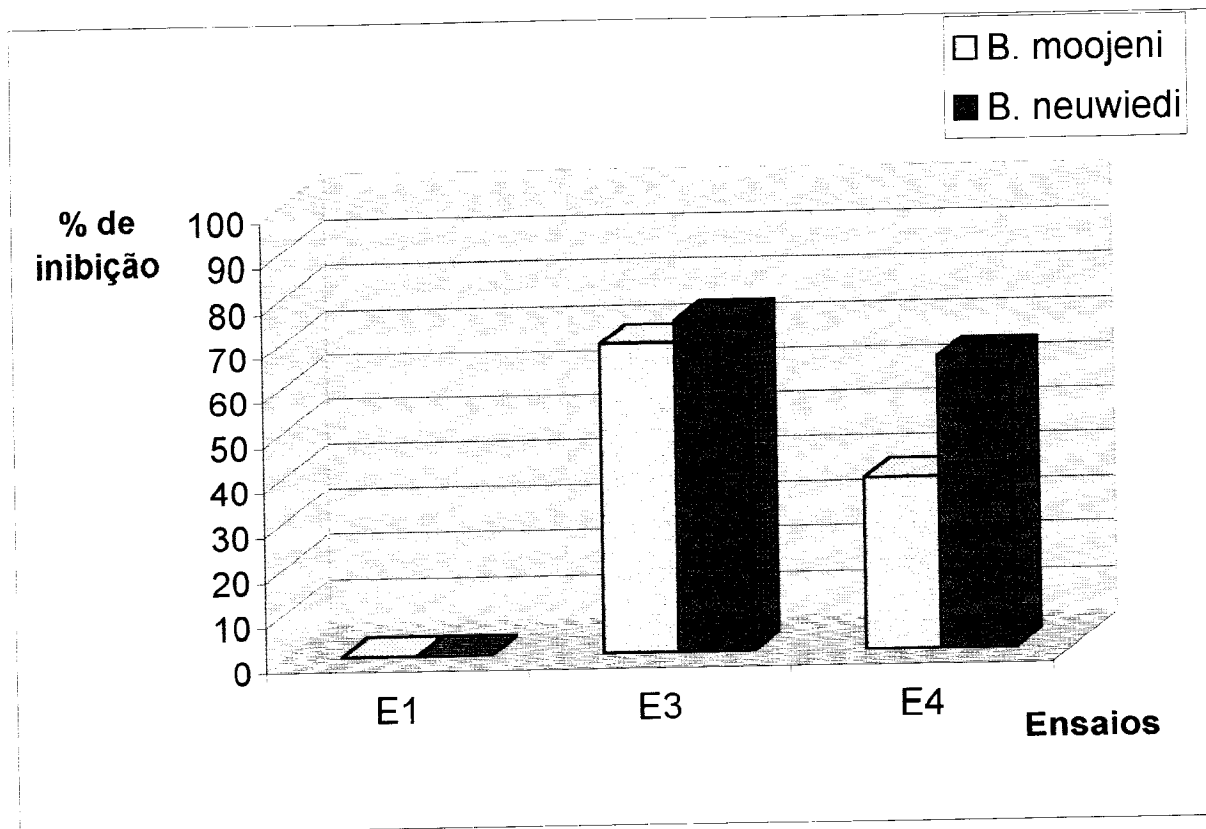


Figura 2: Inibição da Atividade PLA₂ das peçonhas *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis* em presença do extrato vegetal aquoso de *C. mariquitensis*. O substrato usado foi uma emulsão de gema de ovo, desoxicolato de sódio 0,03M e Cloreto de Cálcio 0,6M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH padrão 0,1208N, durante os 3 primeiros minutos de reação à temperatura ambiente (28° C). Os resultados referem-se à média de 3 ensaios.

E1(ensaio 1): Controle positivo (10µg de VB)

E3 (ensaio 3): Peçonha incubada à temperatura ambiente com o extrato vegetal (VB+EVA), por 1h, na proporção de 1:5 (m/m) respectivamente.

E4 (ensaio 4): Peçonha não incubada com o extrato vegetal. Neste caso o VB e EVA eram misturados imediatamente antes do ensaio, mantendo a proporção de 1:5 respectivamente

3.2.1- Curva dose-resposta:

Após a obtenção destes dados, foram realizados novos experimentos de atividade PLA₂ com diferentes concentrações de EVA, para verificar se a quantidade do extrato vegetal adicionado no experimento indicaria uma curva-dose resposta. A tabela 3 e as figuras 3 e 4 apresentam estes resultados.

É interessante observar na figura 4 e tabela 3 a elevada eficiência com que o EVA é capaz de inibir a atividade PLA₂ da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, pois numa proporção de 1:2,5 (ensaio B, fig.4) a inibição já foi da ordem de 100% quando o EVA foi incubado por 1h com o VB antes do ensaio. Foi possível observar que o EVA foi 100% eficiente para inibir ambas as peçonhas na proporção de 1:7,5, sugerindo ser mais eficiente à medida em que a dose de extrato vegetal é aumentada.

Tabela 3: Curva dose-resposta para a inibição da atividade PLA₂ das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal aquoso (EVA) de *C. mariquitensis*.

Peçonha	Ensaio	Atividade PLA ₂ (ueq/min/mg) *	
		Não incubado	Incubado por 1h
<i>B. moojeni</i>	10 µg de VB	79	79
	VB+EVA (1:2,5)	51	51
	VB+EVA (1:5)	32	32
	VB+EVA (1:7,5)	0	0
<i>B. neuwiedi pauloensis</i>	10 µg de VB	53	53
	VB+EVA (1:2,5)	40	0
	VB+EVA (1:5)	35	0
	VB+EVA (1:7,5)	0	0

*: Os resultados apresentados referem-se à média de 3 ensaios. O substrato utilizado foi uma emulsão de gema de ovo, desoxicolato de sódio 0,03M e Cloreto de Cálcio 0,6M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH padrão 0,1208N, durante os 3 primeiros minutos de reação à temperatura ambiente.

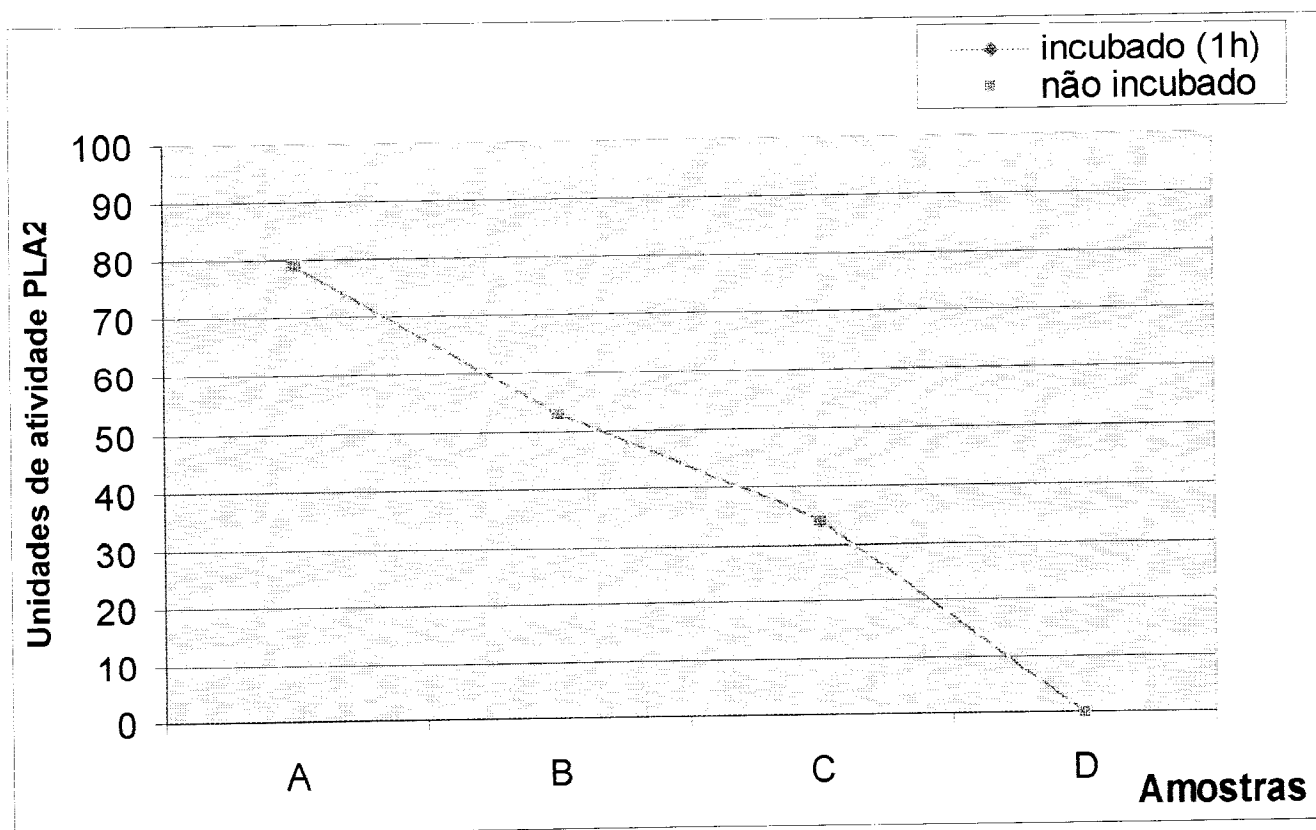


Figura. 3. Curva dose-resposta para os ensaios de inibição da Atividade PLA₂ da peçonha bruta de *B. moojeni* pelo extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis* . O substrato utilizado foi uma emulsão de gema de ovo, Desoxicolato de Sódio 0,03 M e Cloreto de Cálcio 0,6 M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH padrão 0,1208N, durante os três primeiros minutos da reação à temperatura ambiente (28° C). Os resultados referem-se à média de 3 ensaios.

A: 10 µg de VB

B: 10 µg de VB: 25 µg de EVA (1:2,5)

C: 10 µg de VB: 50 µg de EVA (1:5)

D: 10 µg de VB: 75 µg de EVA (1:7,5)

Não incubado: Misturou-se VB+EVA no momento do ensaio.

Incubado: Misturou-se VB+EVA e após 1h realizou-se o ensaio.

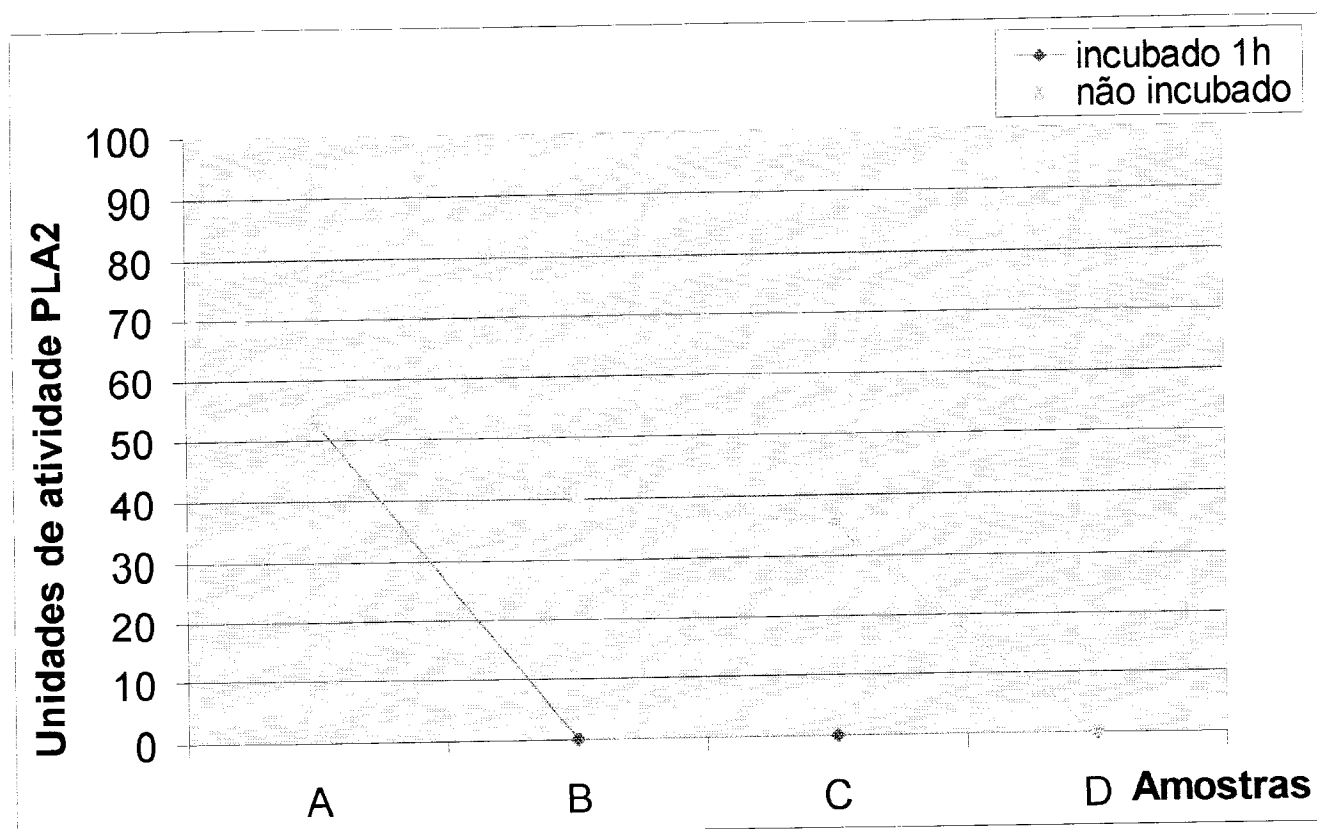


Figura 4. Curva dose-resposta para os ensaios de inibição da Atividade PLA₂ da peçonha bruta de *B. neuwiedi pauloensis* em presença do extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis*. O substrato utilizado foi uma emulsão de gema de ovo, Desoxicolato de Sódio 0,03 M e Cloreto de Cálcio 0,6 M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH padrão 0,1208 N, durante os três primeiros minutos da reação à temperatura ambiente (28° C). Os resultados referem-se à média de 3 ensaios.

A: 10 µg de VB

B: 10 µg de VB: 25 µg de EVA (1:2,5)

C: 10 µg de VB: 50 µg de EVA (1:5)

D: 10 µg de VB: 75 µg de EVA (1:7,5)

VB+EVA: Peçonha bruta mais extrato vegetal aquoso.

Não incubado: Misturou-se VB+EVA no momento do ensaio.

Incubado: Misturou-se VB+EVA e após 1h realizou-se o ensaio.

3.3- Determinação da DMC:

Antes de iniciar os testes de inibição da atividade coagulante das peçonhas estudadas pelo EVA, foi determinada a DMC de cada VB como descrito no item 7. Foi encontrado que 1 DMC corresponde a 10 µg de proteínas para a peçonha de *B. moojeni* e 34 µg de proteínas para a peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, estes valores correspondem à média de 9 ensaios. Com base nestes resultados, os ensaios de inibição com o EVA foram realizados usando-se 1 DMC para a peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* e 3 DMC para a peçonha de *B. moojeni*.

3.3.1- Atividade Coagulante:

A tabela 4 apresenta os resultados da atividade coagulante das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis* comparando os tempos de coagulação das amostras na presença do extrato aquoso de *C. mariquitensis*. Para a primeira peçonha o experimento foi feito na proporção de 1:3 (m/m) (VB:EVA), enquanto que para a segunda, a proporção foi de 1:1 (m/m) respectivamente. Estes resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, que mostrou significância entre os ensaios (incubados ou não) tanto para a peçonha de *B. moojeni* ($p=0.000$) quanto para a de *B. neuwiedi pauloensis* ($p=0.003$).

Portanto, há diferença significativa, sendo o EVA eficiente na inibição da atividade coagulante das duas peçonhas estudadas, tanto nos ensaios incubados como não incubados.

No entanto, é possível observar a eficiência do EVA quando incubado com VB de *B. neuwiedi pauloensis*, cuja coagulação do

plasma ocorreu em um tempo superior a 4 minutos (superior ao controle feito com CaCl_2).

Para a peçonha de *B. moojeni*, a eficiência do EVA foi melhor quando o ensaio foi realizado sem incubação.

Tabela 4. Inibição da Atividade coagulante sobre o plasma bovino das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis* utilizando extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis*.

Ensaio *	Tempo de coagulação (segundos)	
	<i>B. moojeni</i> (1:3)	<i>B. neuwiedi</i> (1:1)
VB (controle)	29,02	61,11
VB+EVA	82,63	89,82
VB+EVA (1h)	46,52	> 240,0
CaCl_2	174,83	174,83

*: Média de 3 ensaios

Proporção VB:EVA para a peçonha de *B. moojeni* foi de 1:3 (m/m), respectivamente. Enquanto que para a peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* a proporção foi de 1:1 (m/m)

— : Não houve coagulação em até 4 minutos (240 segundos).

IV- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

Este estudo teve como base o trabalho de BORGES e HOMSI-BRANDEBURGO (1998), sobre inibição dos principais efeitos tóxicos causados por venenos animais utilizando extrato vegetal de *Casearia sylvestris*.

No presente trabalho foram utilizadas as folhas de *Casearia mariquitensis* para o preparo do extrato vegetal e as peçonhas testadas foram as das serpentes *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis*, pois segundo NISHIOKA e SILVEIRA (1992), são as serpentes que mais causam acidentes em nossa região.

Nossos estudos tiveram início determinando-se a atividade PLA₂, pois estas enzimas são muito abundantes e frequentes em peçonhas de serpentes, estão diretamente relacionadas com diversos efeitos lesivos causados pelo envenenamento e ainda apresentam inúmeras vantagens em relação aos ensaios "in vivo", tais como: baixo custo, rapidez, reprodutibilidade e pequenas quantidades de material.

Os resultados obtidos neste trabalho a inibição da atividade PLA₂ das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi pauloensis* foi bastante expressiva (da ordem de 70%) quando o EVA de C.

mariquitensis foi incubado com ambas as peçonhas e quando não incubado com a peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, na proporção de 1:5 (m/m) peçonha e extrato vegetal aquoso respectivamente.

Quando se compara o efeito inibitório da atividade PLA₂ da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* realizada no trabalho de Borges (1998), e neste, nas mesmas condições, observa-se que o EVA de *C. mariquitensis* é um pouco mais eficiente (cerca de 20%) que o de *C. sylvestris*. Considerando o(s) princípio(s) ativo(s) de *C. mariquitensis* idênticos aos de *C. sylvestris*, estes dados sugerem que no extrato vegetal de *C. mariquitensis*, estão presentes em maior concentração.

MELO *et al.*(1994) purificaram uma fração da planta *Eclipta prostata*, conhecida pela população por combater sintomas de envenenamento como a letalidade e miotoxicidade, a qual foi capaz de inibir a atividade PLA₂ de peçonhas botrópicas e a crotoxina, principal proteína tóxica, composta por PLA₂ e crotopotina encontrada na peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

Quanto às curvas dose-resposta obtidas para cada peçonha (figuras 3 e 4), pudemos constatar que para os ensaios não incubados, o EVA inibiu mais eficientemente a peçonha de *B. moojeni* que a de *B. neuwiedi pauloensis*, embora na proporção de 1:7,5 (VB:EVA) respectivamente a inibição das duas peçonhas tenha sido de 100%. Por outro lado, nos ensaios incubados por 1 hora a eficiência do EVA foi muito maior para a peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, apresentando 100% de inibição já na proporção de 1:2,5.

Apesar dos resultados indicarem inibição das peçonhas pelo EVA, não pôde ser realizado um estudo estatístico dos valores obtidos devido a variação das proporções de EVA para uma mesma peçonha.

Segundo MANCIN *et al.*(1997), as PLA₂ de peçonhas provocam liberação de histamina (envolvidas nos processos de defesa do organismo), por mecanismos indiretos mediados por lisofosfatídeos.

Elas também podem liberar enzimaticamente o ácido araquidônico que constitui os fosfolípidos e está envolvido nos processos inflamatórios. Assim, pode-se relacionar as fosfolipases A₂ ao edema provocado pelo envenenamento, como sugerido por TREBIEN E CALIXTO (1989). Desta maneira, poderíamos sugerir que o EVA de *C. mariquitensis* é capaz de inibir a formação de edema causada pelas PLA₂ das peçonhas.

Essa eficiência do EVA pode ser devida a algum bloqueio de sítio ativo da PLA₂ onde o extrato atua, ou então poderia ocorrer uma interação VB e EVA, alterando a conformação da enzima e impedindo que o VB tenha a atividade enzimática. Como esta enzima está muito relacionada com os principais efeitos tóxicos locais do envenenamento, estes resultados sugerem que o EVA apresenta princípio(s) ativo(s) capaz(es) de inibir algumas ações tóxicas da peçonha.

Quanto à inibição da atividade coagulante das peçonhas estudadas, o EVA foi considerado eficiente para inibir ambas as peçonhas estudadas, mas mostrou maior eficiência quando incubado por 1h com o VB de *B. neuwiedi pauloensis*, apresentando 100% de inibição (tabela 4). Como o extrato vegetal apresentou ação neutralizadora da atividade coagulante, pode-se sugerir que possivelmente ele iniba as enzimas "thrombin-like" presentes nestas peçonhas.

O ensaio que utiliza somente CaCl₂ é um controle feito para verificar a coagulação do plasma citratado, já que o Ca⁺² é um dos fatores responsáveis pela coagulação do sangue. Nossos resultados indicam que o CaCl₂ foi capaz de coagular o plasma bovino citratado em 174,83 segundos (aproximadamente 3 minutos). Assim quando o EVA foi capaz de aumentar o tempo de coagulação induzido pela peçonha por mais de 4 minutos, consideramos uma eficiência na inibição de 100%. Segundo BORGES e HOMSI-BRANDEBURGO (1998)

o EVA de *C. sylvestris* não foi capaz de inibir a atividade coagulante da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*. Nosso trabalho no entanto, mostrou 100% de inibição com EVA de *C. mariquitensis* nas mesmas condições. Isto pode significar que a *C. mariquitensis* apresenta princípios ativos diferentes dos de *Casearia sylvestris*.

Há muitos estudos a serem feitos com esta planta, uma investigação mais detalhada e aprofundada, como por exemplo, outros testes *in vitro* como também *in vivo*, purificação e identificação do princípio ativo, como atuam na inibição, quais são as possíveis variáveis de atuação, entre outros. Não somente para esta planta, mas muitas outras que ainda precisam ser investigadas mais detalhadamente.

V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F. and MANDELBAUM, F. R. (1992) Biochemical and biological differentiation of the venoms of the Lancehead vipers (*Bothrops atrox*; *B. asper*, *B. marajoensis* and *B. moojeni*). **Comp. Biochem. Physiol.** **4**, 102B , 727-732 (1992)
- BARRAVIEIRA, B.(1994) Venenos Animais: Uma visão Integrada. 1ª ed. Rio de Janeiro. **Publicações Científicas**, 411p.
- BORGES, M. H. (1998) Inibição dos principais efeitos tóxicos causados por venenos animais pelo extrato vegetal de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de Uberlândia, 71)
- BORGES, M. H.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. (1998) Inibição da atividade fosfolipásica A₂, hemorrágica e miotóxica do venenos animais pelo extrato vegetal de *Casearia Sylvestri*(Facourtiaceae). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** **4**, 28-30.
- CASTRO, H. C.; DUTRA, D.S.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L. and ZINGALI R.B. (1998) Bothroalteinin, a thrombin inhibitor from the venom of *B. alternatus*. **Toxicon** **36** (12), 1903-1904.

- CHERDCHU, C.; SRIDUKAVAT, K. and RATANABANANGKON, K. (1978) Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae). **J. Med. Ass. Thailand** **61**, 544.
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M. e col (1968) Purification and properties of phospholipase A₂ from porcine pancreas. **Biochemistry and Biophysics Acta** **159**, 103-117.
- DELOT, E. and BON, C. (1993) Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry** **32**, 10708-10713
- GANS, C. and GANS, K. A. (1978) **Biology of reptilia** **8**, 1-180. New York Academic Press.
- GUTIERREZ, J. M.; Dos SANTOS, M. C., FURTADO, M. D. F. and ROJAS, G. (1991) Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. **Toxicon** **29** (10), 1273-1277.
- GUTIERREZ, J. M.; CRAVES, F.; MATA, E. and CERDAS, L. (1986) Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Toxicon** **24**, 223-131.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1987) Fracionamento do veneno de veneno de *B. jararacussu*: caracterização química parcial de componentes ativos e estudo dos efeitos farmacológicos e anatomo patológico da botrosptoxina. Tese de doutorado (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 95)
- ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. (1964) A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry** **9**; 401.
- JIMENEZ-PORRAS, J.M. (1993) Reptile Toxins in Biology Data Book – **Federation of American Societes for Experimental biology (FASEB)** Bethesda M. D. –USA. 2^a Ed. Vol. II, p.697.

- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.M.; THEAKSTON, R. D. G. and ZUZEL, M. (1996) Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom Metalloproteinases. **Toxicon** **34** (6), 627-642.
- KINI, R. M. and IWANAGA, S. (1986) Structure- Function relationships of phospholipases II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipase **Toxicon** **24** (9): 895-905.
- KLOBUSITZKY, D. (1961) Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms **Am. J. Med. Sci.** **242**, 107
- MANCIN, A.C.; SOARES, A. M.; GIGLIO, C. A.; ADRIAO-ESCARSO, S. H.; VIEIRA, C. A. and GIGLIO, J. R. (1997) The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A₂. **Biochemistry and Molecular Biology international** **42**(6), 1171-1177.
- MARKLAND, F. S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon** **36** (12), 1749-1800.
- MARTZ, W. (1992) Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon** **30**, 1131-1141.
- MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C. DO; MORS, W. B. and SUAREZ-KURTZ, G. (1994) inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of Crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** **32**(5): 595-603.
- MOURA-DA-SILVA, A M.; DESMOND, H.; LAING, G. and THEAKSTON, R. D. G. (1991) Isolation from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** **29**(6), 713-723.
- NISHIOKA, S. A. and SILVEIRA, P.V.P.(1992) Clinical and epidemiological study of 292 cases of lance-headed vipers. **Ann. Trop. Med. Parasit.** **86**, 89-91.
- OSHAKA, S. A (1979) Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: **Handbook of experimental**

pharmacology, snake venoms 52: 480-546 (Lee, C. Y.) Ed.
Berlin Springer-Verlag.

OWNBY, C. L. (1990) Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: **Handbook of Toxinology**, 602-654.

PACHECO, S.; SILVA, N. S. and FRANCO, P. S. (1995) Atividade antibotrópica do chá de quiabo, *Hibiscus esculentus*. **Rev. Bras. Far. 76**, 61-62.

PEREIRA, N. A.; PEREIRA, P. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P. and MORS, W. B. (1994) Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; 5 protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta med.60**, 99-100.

RIBEIRO, L. A.; PIRES DE CAMPOS, V.A.F.; ALBUQUERQUE, M. DE J. and TAKAOKA, N. Y. (1993) Acidente ofídico no estado de São Paulo, **Rev. Ass. Med. Farm. 69**, 82-86.

RODRIGUES, M.; CARVALHO, J. C. T.; LUCIA, M.; MESQUITA, J. M. O. and SARTI, S. J. (1997) Avaliação da atividade antiofídica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Swartz sobre modelos animais estimulados com o veneno de *Bothrops alternatus*. **III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**: 110-111.

ROSENFELD, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous Animals and their venoms**. Vol II., 345-362 (Bucherl, W. and Buckley, e. E., eds) New York: Academic Press.

SOARES, A. M. (1997) Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: sequência amino terminal, cristalografia e estudo da transição dos estados nativo e desenovelado. Dissertação de mestrado (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo), 91.

- SUZUKI, T. and Iwanaga, S. (1970) Snake venoms. In: Erdos, E. G. (ed): Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. **Handbook of Experimental Pharmacology**, vol.25, 193-212, Springer, Berlin Heidelberg- New York.
- TREBIEN, H.A. and CALIXTO, J. B. (1989) Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions** **26**, 292-300.