

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Neutralização das atividade proteolíticas induzidas pela
peçonhas da serpente de *Bothrops moojeni* pelo extrato
aquoso de folhas de *Casearia grandiflora* e suas frações**

DANILO DE SIQUEIRA FORTUNATO

**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
Julho-2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Neutralização das atividade proteolíticas induzidas pela
peçonhas da serpente de *Bothrops moojeni* pelo extrato
aquoso de folhas de *Casearia grandiflora* e suas frações**

DANILO DE SIQUEIRA FORTUNATO

AMÉLIA HAMAGUCHI

**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
Julho-2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

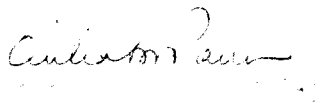
Neutralização das atividade proteolíticas induzidas pela
peçonhas da serpente de *Bothrops moojeni* pelo extrato
aquoso de folhas de *Casearia grandiflora* e suas frações

DANILO DE SIQUEIRA FORTUNATO

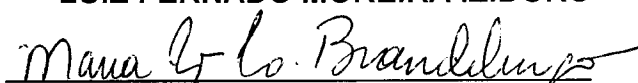
Nota: 100,0


Orientadora: AMÉLIA HAMAGUCHI

Membros da Banca examinadora:




LUIZ FERNADO MOREIRA IZIDORO


MARIA INÉS HOSIM BRANDENBURGO

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
Julho-2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Neutralização das atividade proteolíticas induzidas pela
peçonhas da serpente de *Bothrops moojeni* pelo extrato
aquoso de folhas de *Casearia grandiflora* e suas frações**

DANILO DE SIQUEIRA FORTUNATO



AMÉLIA HAMAGUCHI

Homologado. Pela coordenação do curso
de Ciências Biológicas em 2/02/05



COORDENADORA

**Uberlândia-MG
Julho-2005**

Dedicatória:

Dedico este trabalho a minha avó e aos meus pais que sempre estiveram presentes em momentos difíceis e nunca pouparam esforços para me apoiar nesta longa caminhada.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus por me dar esta grande oportunidade de vida e de ter pessoas tão maravilhosas neste caminho cheio de experiências que me ensinaram muito. Mais do que eu achava possível aprender em tão pouco tempo.

A todas as pessoas que me deram força nesta luta, que acreditaram em meu potencial e sempre me incentivaram.

Agradeço aos meus pais e meus irmãos por sempre me apoiarem em minhas decisões, por acreditarem na minha capacidade e por acompanharem meus passos com muita atenção.

Agradeço a todas as pessoas que tornaram este trabalho possível. Ao meu camarada Luis Henrique por me convidar para ir trabalhar no laboratório, ao caro amigo Alexandre Silva Oliveira por me ajudar a conseguir a planta para trabalhar, a Profa. Maria Inés por me dar a oportunidade de trabalhar nesta pesquisa, a Prof. Vera Lúcia por ceder as peçonhas da serpente e ao instituto Vallee. Sem qualquer um destes eu sei que este trabalho não seria possível.

Aos meus "inimigos" que achavam que eu iria desistir e estes foram os que nos piores momentos me fizeram lutar para provar que eu podia vencer todos os obstáculos desta luta.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que sempre me auxiliaram e me trataram com muito respeito. Destes devo

destacar ao menos três: o meu camarada Fábio Lucas que foi um parceiro de muitas batalhas, que foi uma grande companhia nos finais de semana de trabalho árduo no laboratório, que sempre teve muita paciência e atenção comigo e que sempre pude contar para discutirmos nossos resultados; à Renata uma grande amiga, uma pessoa maravilhosa que sempre me criticou e incentivou para que eu crescesse; e à Miriam que sempre me auxiliou nos meus experimento em animais e me ajudou a interpretar melhor meus dados.

A todos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica que de alguma forma tornaram meu trabalho possível. Em especial a Profa. Amélia Hamaguchi que sempre me tratou com muita atenção e carinho, por acompanhar meus trabalhos com grande interesse e dedicação, por nunca ter sido dura comigo, mesmo quando precisava, e confesso não esperava de minha orientadora tanta dedicação e carinho.

É claro chega um momento preciso falar dos Fracassados, eu sei que muitos vão se perguntar que são este, ou o que são. Mais saibam só os fracassados sabem o que realmente é isso, esse são tão especiais que não posso deixar de falar de nenhum, que é melhor nem começar pois tenho tanto a agradecer a estes amigos de verdade, que em todos os dias construímos um grande time, neste grupo eu pude acreditar na força de uma equipe, pois juntos somos mais que um, e que cada um mesmo que distante sabe que somos amigos e isso está marcado no nosso coração e este sentimento único e verdadeiro nunca vai se apagar.

Agradeço a todos dos grupos que se unirão aos fracassados, primeiramente as galera da 54° turma de Ciências Biológicas, em especial às "meninas do 104", às pessoas da galera da Psico estes são muitos. Também agradeço a galera da 57° Turma de Ciências Biológicas que não aderiram ao Fracasso, em especial a Gisela, Isabel e Priscila.

Aos Fracassados, estes que sei vão deixar muita saudades: o Brunoc um cara de grande coração, a Carol Petri que sempre me tratou com tanto carinho, a Dani uma pessoa super animada e de curtição, o Diego um amigo companheiro de todas as horas que dividimos tantos momentos de problemas e delícias, o Eduardo um cara que me deu muita força, a Fernanda uma pessoa que sempre se preocupou comigo e que sempre esteve por perto, o Hugo um cara super firmeza sempre animado, o Jorginho um menino que gente fina, o Leo um verdadeiro maluco-beleza controlando a sua lucidez, o Luciano um cara mais comédia que eu conheço, o Miguel um brother sempre que presente, o Neydson um cara que gente fina que curte a vida adoidado, a Paulinha uma pessoa muito amiga e engraçada, garota a Rachel um pessoa maravilhosa que sempre me compreendeu, o Rodrigo um amigo de longa data que sempre me deu muita força, a Silvinha uma pessoa muito sabia e sincera e o Tiago o cara mais reclamão que eu conheço mas sempre uma figura.

A todos estes companheiros eu agradeço muito, pois foram a minha maior força durante essa longa batalha, sem eles eu não acreditaria em estar terminando esta batalha e a ele eu agradeço e sempre agradecerei do fundo de meu coração por tudo que fizeram por mim, por um olhar, um abraço, uma palavra, um silêncio . . .

Lista de Abreviações:

EB - Extrato Bruto de Folhas de *Casearia grandiflora*

FE - Fração Etanólica do extrato bruto

Fi - Fibrinogênio

PAGE-SDS - eletroforese em gel de poliacrimida com agentes desnaturantes.

PB - Peçonha Bruta de *Bothrops moojeni*

PBS - Solução Salina Fosfatada

Ppt - Precipitado Etanólico

PSA - Persulfato de Amônio

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

TEMED - (N,N,N-N'- tetrametilenodiamino)

Resumo:

Neutralização das atividade proteolíticas induzidas pela peçonhas da serpente de *Bothrops moojeni* pelo extrato aquoso de folhas de *Casearia grandiflora* e suas frações

DANILO DE SIQUEIRA FORTUNATO¹; AMÉLIA HAMAGUCHI².

(1) Graduando do curso de Ciências Biológicas;

(2) Profa. Dra. do Instituto de Genética e Bioquímica.

As peçonha de serpentes são constituídas de misturas de toxinas de natureza protéica, com ação enzimática ou não. Enzimas com atividades proteolíticas são importantes constituintes das peçonhas de serpententes da família Viperidae. *Bothrops moojeni* uma serpente típica do cerrado e de todo Brasil Central possui em sua peçonha toxinas proteolíticas como metaloproteases e serinoproteases que induzem relevantes alterações hemostáticas, levando a hemorragias locais e sistêmicas. Várias plantas tem sido usadas na medicina popular no tratamento de vítimas de acidentes ofídicos, porém poucas plantas tem sido validadas por estudos científicos criteriosos. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estudar o extrato bruto (EB) de *Casearia grandiflora* e suas frações, obtidas por solubilidade diferencial em etanol, a fração solúvel em etanol (FE) e a fração não solúvel em etanol (Ppt), na neutralização das atividades proteolíticas (coagulante, fibrinogenolítica, fibrinolítica, hemorrágica e incoagulabilidade sanguínea) induzidas pela peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni*. Todas as atividades proteolíticas testadas foram neutralizados por Eb e Ppt em proporções maiores ou iguais a 1:20 (PB:EB ou Ppt) e FE neutralizou somente as atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica e hemorrágica, caracterizadas como atividades típicas de metaloproteinases. Portanto, conclui-se que EB possui compostos capazes de neutralizar as atividades de serinoproteases e de metaloproteases, que os compostos capazes de inibir serinoproteases não são solúveis em etanol enquanto alguns inibidores de metaloproteases são.

Palavra Chave: neutralização; proteases; peçonha bruta; *Bothrops moojeni*; extrato aquoso; *Casearia grandiflora*; frações em etanol.

Sumário:

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	20
3. JUSTIFICATIVAS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO:

Animais peçonhentos são aqueles capazes de produzir e inocular substâncias tóxicas, tais como abelhas, aranhas, escorpiões, serpentes e outros. (As peçonhas animais são constituídas por complexas misturas de toxinas de natureza principalmente protéica, com ação enzimática ou não (RUSSEL et al., 1980, TU et al., 1988)).

O sistema responsável pela produção de peçonha das serpentes é composto por glândulas exócrinas modificadas para produzir um conjunto de enzimas com atividade tóxica e digestiva. A composição destas peçonhas varia de espécie a espécie, dentro de uma mesma espécie de acordo com a nutrição, localidade geográfica e de estação do ano (ASSAKURA et al. 1992).

As serpentes peçonhentas do Brasil são em quase sua totalidade da Família VIPERIDAE, compreendendo os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Dentre estas serpentes o gênero *Bothrops* é o de maior importância, por apresentar o maior número de espécies em nosso território (JORGE & RIBEIRO, 1990)

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 28 espécies, distribuídas por todo território nacional. São conhecidas popularmente como jararaca, urutu-cruzeiro, caiçaca e outras denominações. Estas serpentes habitam principalmente zonas rurais, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paiós, celeiros, depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruídos (DA SILVA et al. 2002).

Bothrops moojeni (caiçaca), esta espécie descrita inicialmente em Brasília-DF, trata-se da principal espécie de *Bothrops* de cerrado do Brasil Central, distribuindo-se do Paraná até Maranhão. Esta também é uma das poucas espécies que tem crescido em importância médica, pois se adapta bem aos ambientes modificados com pouca umidade como periferias de centros urbanos, ao contrário das demais espécies do gênero, além de apresentar

comportamento bastante agressivo e ter um porte avantajado, podendo superar 1,5m de comprimento (CARDOSO, 2003).

Acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* são os mais comuns, correspondendo a 90,5% dos acidentes com ofídios no Brasil e 50% dos casos de morte ocasionados por envenenamento ofídico (BRASIL, 1998). Na região de Uberlândia-MG, representam 75% dos acidentes ocorridos e atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo que 55% dos acidentes ofídicos confirmados foram ocasionados pela espécie *Bothrops moojeni* (DA SILVA et al. 2002).

Peçonhas de serpentes são ricas em compostos farmacologicamente ativos que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas (BALEY et al., 2001). Estas peçonhas, principalmente das serpentes pertencentes à Família VIPERIDAE, contêm uma variedade de proteases que afetam em diferentes etapas da cascata de coagulação sanguínea (ESTEVÃO-COSTA et al., 2000).

Essas proteases causam um aparente paradoxo, pois a peçonha promove coagulação *in vitro* e incoagulabilidade sanguínea *in vivo*, estes efeitos têm sido atribuído à presença de enzimas coagulantes (Thrombin-like) presentes em peçonhas de serpentes (STOCKER, 1982).

A atividade dessas enzimas é caracterizada pela conversão de fibrinogênio em fibrina, pela hidrólise das ligações Arg -16-Gly e Arg-15-Gly na região amino terminal das cadeias A α e B β do fibrinogênio, com liberação do monômero de fibrina e dos fibrinopeptídeos A e B. Baseado na velocidade de liberação destes fibrinopeptídeos, tais enzimas são divididas em três grupos, as que liberam preferencialmente fibrinopeptídeo A são chamadas Venobina A, as que liberam preferencialmente fibrinopeptídeos B são chamadas Venobina B e as que liberam os fibrinopeptídeos A e B proporcionalmente são chamadas de Venobina AB (MARKLAND, 1998).

Outros importante grupo de enzimas proteolíticas encontradas nas peçonhas botrópicas é o das metaloproteases zinco-dependentes. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de lâmina basal, do colégeno do

sub-endotélio, o que leva a lesão da parede do endotélio e conseqüente perda da função hemostática. Estas enzimas degradam também as moléculas como fibrinogênio, plasminogênio e trombina, que participam da cascata de coagulação e atuam também diretamente nas plaquetas podendo impedir a formação do tampão plaquetário no organismo, levando a incoagulabilidade sangüínea (RANG et al., 1997).

Essas enzimas podem ser chamadas hemorraginas ou SVMP (metaloproteases de veneno de serpente), que compreendem uma série de enzimas com variada massa molecular, sendo responsáveis pelo efeito hemorrágico característico do envenenamento botrópico (BJARNASON & FOX, 1994).

As metaloproteases hemorrágicas podem ser divididas em 4 classes de acordo com seus domínios estruturais e suas massas moleculares. Metaloproteases classe-I possuem apenas o domínio catalítico com massa molecular de 20-30 kDa; classe-II que possuem domínio catalítico seguido por um domínio desintegrina e massa molecular de 30 a 50 kDa; classe-III que são formadas pelo domínio catalítico, seguido por um domínio desintegrina e um domínio rico em cisteína e massa molecular entre 50-80 kDa; e classe-IV compreende enzimas que possuem, além dos três domínios das metaloproteases da classe-III e um polipeptídeo tipo lectina ligado à metaloprotease por ponte dissulfeto e massa molecular superior a 100 kDa (HITE et al., 1994).

Os estudos da peçonha de *Bothrops moojeni* revelam a grande importância das proteases na constituição destas peçonhas e várias de suas enzimas foram purificadas e caracterizadas bioquimicamente, dentre estas podemos destacar algumas como Batroxobina, uma Venobina A, que cliva a molécula de fibrinogênio e libera monômero de fibrina que é rapidamente hidrolisado na corrente sangüínea, levando a depleção do estoque de fibrinogênio e conseqüentemente a incoagulabilidade sangüínea. A Batroxobina isolada do veneno de *B. moojeni* tem ação desfibrinogenante superior a Batroxobina isolada do *B. atrox* (STOCKER et al., 1982). Outra protease

importante da peçonha de *B. moojeni* é a Moojeniprotease A, uma metaloprotease da classe I, que causa hidrólise do colágeno tipo I, da gelatina, da rede de fibrina e das cadeias A α e B β do fibrinogênio humano (REICHL & MANDELBAUM, 1992).

O quadro clínico no envenenamento botrópico pode ser didaticamente dividido em local e sistêmico (Brasil, 1998). As manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por distúrbios na hemostasia, caracterizados por deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária, e depleção do estoque de fibrinogênio. A sequência destes eventos culmina em hemorragia em local distante do local da picada (HATI et al., 1999). As manifestações locais são caracterizadas por dor, edema, hemorragia e necrose na região da picada, atribuídas aos componentes inflamatórios e hemorrágicos da peçonha (RIBEIRO et al., 2001).

O tempo decorrido entre a picada e o atendimento é muito importante, quanto menor o tempo, melhores são os resultados da soroterapia. Se o tratamento começa muito tempo após a picada, a soroterapia não se mostra eficaz, isso se evidencia no número dos casos de morte quando o atendimento ocorreu 6 horas após o envenenamento chega a 60,5% dos casos atendidos (Brasil, 1998).

Um dos aspectos enfocados para o incentivo à pesquisa de tratamentos alternativos em casos de envenenamento por ofídios, é que a soroterapia não possui eficiência caso o atendimento da vítima não seja imediato e também não se apresenta eficiente para reverter os efeitos locais, consequentes do edema intenso e prolongado que leva à compressão dos tecidos e vasos, levando a isquemia e necrose tecidual (MARTZ, 1992).

Neste sentido, frequentemente, encontram-se afetados a pele, as camadas musculares mais profundas e nos casos mais severos o tecido por completo, o que determina a perda do órgão ou amputação da extremidade afetada (MOURA-DA-SILVA et al., 1991).

Além do mais, pelo tratamento convencional consistir do soro heterólogo, e este ser obtido a partir de plasma de animais (equinos ou ovinos)

normais hiperimunizados com peçonhas de serpentes, pode desencadear reações imunológicas, como edema de glote, acompanhada de insuficiência respiratória e hipotensão (BARRAVIEIRA & PERAÇOLI, 1994).

Buscar novos métodos para neutralizar as toxinas das peçonhas de serpentes é necessário, e a utilização de plantas medicinais está sendo uma alternativa neste sentido, visando principalmente a neutralização dos efeitos locais provocados pelo envenenamento (MARTZ, 1992).

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à história humana e por um longo período foram a única forma de tratamento. O uso de plantas sempre foi de grande relevância na medicina popular, porém o desenvolvimento da química orgânica resultou na preferência pelo tratamento utilizando drogas sintéticas e uma conseqüente perda de parte dos conhecimentos da medicina popular (DE PASQUELE, 1984).

As plantas são um exemplo rico de compostos farmacologicamente ativos, grandes empresas farmacêuticas têm áreas de pesquisa que dedicam tempo integral a estes estudos. Estima-se que 5.000 espécies de plantas de um universo estimado de mais de 500.000, tenham passado por uma triagem farmacológica básica, sendo que a maioria destas plantas tem sido testadas somente quanto a seu potencial para o tratamento do câncer e da AIDS (RATES, 2001).

Os compostos farmacologicamente ativos de plantas são uma fonte importante de modelos para a síntese de novos fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se interessados pelo fato de que produtos encontrados na natureza revelam uma grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996).

Os princípios ativos extraídos dos vegetais são produtos de origem no metabolismo secundário e terciário do vegetal, decorrentes da adaptação deste a diferentes estações do ano, tipo de solo, pH, umidade, temperatura, ação de herbívoros e fitófagos dentre outros fatores. Diversos destes metabólitos já são conhecidos como os taninos, ligninas, cumarinas, flavonóides, quinonas, metilxantinas, alcalóides, terpenos, saponinas, e uma série de antimetabólitos

que se distribuem diferentemente nas diversas partes do vegetal, com composição variada de espécie para espécie e até mesmo dentro da mesma (HARBERMEHL, 1998).

Os produtos naturais são de grande importância para a medicina, 25% dos medicamentos prescritos no mundo são de origem vegetal ou têm a estrutura derivada de um composto natural, estimando-se que 60% dos medicamentos antitumorais e antibióticos em testes clínicos sejam de origem vegetal (YUE-ZHONG-SHU, 1998; RATES, 2001).

Medicamentos sintéticos de importância para o homem apresentam substâncias derivadas de plantas e dos 252 medicamentos considerados essenciais pela Organização Mundial da Saúde, 11% são obtidos exclusivamente de vegetais e um número ainda maior é o dos medicamentos sintéticos obtidos a partir de precursores naturais (CARVALHES et al., 2003).

Estudos sobre a neutralização das atividades das peçonhas de serpentes por extratos de plantas tem sido feitos e têm validado diversas plantas quanto ao seu potencial antiofídico, testes com peçonha bruta ou de toxinas isoladas das peçonhas e extrato bruto ou compostos isolados destes. *Curcuma sp* neutralizou a neurotoxicidade de Cobra-neurotoxina (CHERDCHU et al., 1978), Ar-tumerone isolado de *Curcuma longa* neutralizou Cobra-neurotoxina (FERREIRA et al., 1992) e extrato de *Eclipta prostrata* e wedelolactona isolada deste extrato neutralizaram a miotoxicidade, a atividade fosfolipásica, a atividade hemorrágica e a diversas atividades proteolíticas das peçonhas das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacusu*, *Lachesis muta muta* (MELO et al., 1992).

Extratos das folhas das espécies do gênero *Casearia* têm mostrado efeitos neutralizadores das atividades induzidas pelas peçonhas de serpentes botrópicas e crotálica. *Casearia silvertrys* neutralizou as atividades proteolítica e fosfolipásica dos venenos de serpentes botrópicas (BORGES et al., 2000 e 2001). *Casearia grandiflora* é eficiente neutralizador das atividades proteolítica, fosfolipásica e miotóxica das peçonhas de serpentes botrópicas e crotálicas (FREITAS, 2002). *Casearia gossypiosperma* neutraliza as atividades

hemorrágica, coagulante e fibrinogelítica induzida pelas peçonhas botrópicas e algumas enzimas isoladas destas (SILVA, 2002). *Casearia mariquitensis* mostra-se eficiente em neutralizar a degradação do fibrinogênio, a coagulação do plasma, a depleção do fibrinogênio plasmático e a hemorragia pulmonar induzida pela neuwiedase uma metaloprotease da peçonha de *B.neuwiedi pauloensis* (IZIDORO et al., 2003).

O gênero *Casearia* é composto por plantas de porte arbóreo quatro a dez metros de altura, folhas cartáceas, heliófita, seletiva higrofila, típica de florestas semidecídua secundária. Ocorrendo em todo território nacional em quase todas as formações vegetais, principalmente em florestas semidecíduas em áreas de transição para o cerrado (LORENZI, 1998).

A população da região do Triângulo Mineiro possui um conhecimento sobre medicina popular que dura gerações e isto se revela também nos casos de envenenamento por picada de serpentes . Visto que 5% dos casos atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia os pacientes relataram ter tomado algum composto preparado a partir de planta para tentar impedir os efeitos do envenenamento (DA SILVA et al., 2002).

Várias plantas de diferentes regiões têm tido sua ação neutralizadora das atividades induzidas pelas peçonhas comprovada, porém são poucos os compostos isolados responsáveis pela neutralização. São necessários estudos futuros de isolamento, caracterização estrutural e mecanismo de ação destes inibidores naturais de toxinas de serpentes, para serem um alternativa a soroterapia e para no futuro servirem como ponto de partida para a síntese de novas drogas terapêuticas de interesse médico (SOARES et al., 2004).

O Laboratório de Química de Proteínas e de Produtos Naturais tem desenvolvido diversos trabalhos no estudo de toxinas da peçonha de serpentes e com plantas utilizadas pela população rural local como antídoto para o envenenamento por picada de serpente, estes trabalhos têm mostrados grandes avanços, como a comprovação dos efeitos e esclarecimentos de alguns mecanismos de ação de toxinas.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de neutralização do extrato aquoso de *Casearia grandiflora* e suas frações frente a peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, quanto a suas atividades proteolíticas.

2. Objetivo:

Os objetivos deste trabalho são :

Preparar o extrato bruto das folhas de *Casearia grandiflora*.

Fracionar o extrato bruto através de solubilidade diferencial em etanol.

Testar o extrato bruto e as frações obtidas a parti deste quanto a neutralização das seguintes atividade proteolíticas induzidas pela peçonha de *Bothrops moojeni*:

Atividade coagulante do plasma;

Atividade fibrinogenolítica;

Atividade Fibrinolítica;

Atividade Hemorrágica;

Atividade de alteração da coagulabilidade sangüínea.

3. Justificativas:

Acidentes ofídicos no Brasil são muito comuns, podendo passar de 20.000 casos por ano, estes causam mais de 100 mortes e o tratamento convencional(soroterapia) normalmente não é eficaz em reverter os problemas locais causados pelas peçonhas.

Como a soroterapia normalmente não reverte os efeitos locais estes podem ocasionar seqüelas permanente nos acidentados, podendo levar a perda parcial do movimento até perda total da funcionalidade da extremidade afetada ou amputação.

Algumas plantas utilizadas na medicina popular estão relacionadas à sua atividade antiofídica, destas algumas já foram levantadas em estudos etnobotânico e outra já foram validadas por métodos científicos.

Desta forma, plantas como as Casearias, usadas pelos moradores da zona rural do Triângulo Mineiro para neutralizar os efeitos dos acidentes ofídicos devem ser estudadas e investigadas tanto no aspecto biológico com químico, visando à obtenção de resultados cientificamente validos na neutralização das diversas atividades causadas pelas peçonhas de serpentes.

Uma vez iniciados esses estudos de primeiro contato, ficam abertas as possibilidade de utilização terapêutica para os produtos isolados ou de produtos desenhados a partir destes, mostrando novos caminhos a percorrer na busca de antídotos contra acidentes ofídicos e na inibição de outras proteases de interesse médico.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. Reagentes:

Plasma bovino citratado foi obtido através de coleta do sangue de touros da Fazenda Experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia, pelo mestrando Luís Henrique Ferreira do Vale, o material coletado era trazido para o laboratório para centrifugações sucessivas para separação dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas do plasma. Este era dividido em alíquotas de 5mL que ficavam estocados em freezer a -20°C.

Fibrinogênio bovino e Trombina bovina foram comprados da empresa Sigma Chem. Co. e mantidos em freezer a -20°C.

Acrilamida, Bis-acrilamida (N,N-metilenobisacrilamida), TEMED (N,N,N,N"-Tetrametilenodiamino), SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), Coomassie Brilliant Blue R-250 e G-250, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), Azul de Bromofenol, β -Mercaptoetanol, PSA (Persulfato de Amônio), BSA (Soro Albumina Bovina), TRIS-HCl, Glicerol, Etanol e Ácidos Acético todos comprados da empresa Sigma Chem. Co. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Obtenção e preparo da Peçonha Bruta:

A Peçonha Bruta (PB) das serpentes de *Bothrops moojeni*, foi coletada no Setor de Répteis da Universidade Federal de Uberlândia, pela Profa. Dra. Vera Lúcia Campos Brites e então processadas para obtenção de uma solução contendo proteínas da peçonha por centrifugação a 10.000g por 10 minutos a 4°C e liofilizado para armazenamento posterior.

4.3. Dosagem protéica:

As amostras de peçonha bruta foram dosadas utilizando o método de BRADFORD (1978), no qual a soro albumina é utilizada para estimar a reta padrão. As amostras protéicas de 100 μ L eram acrescidas de 3000 μ L do reagente de BRADFORD, então feitas leitura a 495nanômetros. O reagente de BRADFORD é uma solução de 0,01% de Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% de etanol e 10% ácido orto-fosfórico.

4.4. Animais para experimentação:

Os experimentos *in vivo* foram feitos em camundongos da raça Swiss doados pela empresa Vallée, então eram trazidos para nosso biotério, onde eram mantidos em caixas forradas com serragem, tendo à disposição água potável e ração, no Laboratório de Experimentação Animal (LEA), mantidos a temperatura ambiente e com ciclo circadiano normal. Os animais trazidos para nosso biotério ficavam ao menos 3 dias se adaptando as novas condições de laboratório e somente depois eram utilizados nos experimentos. Os animais utilizados eram machos com aproximadamente 45 dias de vida e tinham um peso aproximado de 22g.

4.5. Coleta das folhas de *Casearia grandiflora* preparo do Extrato vegetal.

Para a preparação do Extrato Bruto (EB) de *Casearia grandiflora* folhas foram coletadas no Tangará Country Clube no dia 14/02/2004, coletadas e identificadas com o auxílio do Acadêmico Alexandre Silva Oliveira, e exicatas foram arquivadas no Herbarium Uberlandense da Universidade Federal de Uberlândia e outra parte das folhas coletadas foram selecionadas as jovens e sem danos por herbívoros. Estas folhas foram então lavadas com água desionizada corrente por 2 horas, somente depois de selecionadas, lavas e secas. Estas foram trituradas em liquidificador com água desionizada por 10 minutos à temperatura ambiente. O material resultante foi filtrado com papel filtro, centrifugado a 20.000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado, liofilizado e o pó resultante foi armazenado em frascos âmbar mantidos a -20°C para posterior utilização.

4.6. Fracionamento do Extrato Bruto :

Para fracionar o Extrato Bruto de *Casearia grandiflora* utilizou-se de um protocolo de solubilidade de compostos naturais de DEMUNER (2000) com adaptações, fazendo o fracionamento sempre partindo de 3g de EB adicionado 90mL de etanol 97°GL, agitava-se por 10 minutos a temperatura ambiente, eram separados sobrenadante e precipitados por centrifugação a 10.000g por 10 minutos a 4°C, as frações obtidas eram então chamadas de Fração Etanólica (FE) e o Precipitado etanólico (Ppt), ambas passavam por rotoevaporação, para retiradas do solvente orgânico, então eram resolubilizados em água desionizada e por fim liofilizados e armazenados a -20°C para posterior utilização.

4.7. Atividade coagulante:

A atividade coagulante do plasma bovino induzida pela peçonha bruta foi realizada segundo a técnica descrita por ASSAKURA et al.(1992). Sobre 100µL de plasma citratado foram adicionados 10µg de PB dissolvidos em 20µL de PBS, então encubados a 37°C para formação do coagulo e o tempo cronometrado em segundos. Estes ensaios de coagulação foram realizados em aparelho coagulômetro Quick Timer (DRAKE LTDA) que determina o tempo de coagulação da amostra, até um tempo máximo da 120 segundos, utilizando um sistema óptico que determina a variação brusca da densidade óptica da amostra no instante da coagulação.

4.8. Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio:

O ensaio de hidrólise das cadeias do Fibrinogênio (Fi) foram realizadas como descrito por EDGAR e PRENTICE (1973), com algumas modificações. Amostras contendo 50µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL em PBS em pH 7,4) e 5µg de PB num volume final de 10µL, também em PBS, foram incubadas a 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida após o tempo determinado pela adição de 30µL de solução STOP+β(Tris-HCl 187mM pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6mM, Azul de Bromofenol 1%, Glicerol 27%, e β-mercaptoetanol 10%) e aquecimento a 100°C por 2 minutos.

4.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes (PAGE-SDS):

As eletroforeses foram feitas segundo a técnica de LAEMMLI (1970), sendo as amostras dissolvidas em 50% de seu volume com tampão amostra (Tris-HCl 187mM pH 6.8, SDS 6%, EDTA 6mM, azul de bromofenol 1%, glicerol 27% e 10% β -mercaptoetanol) sendo posteriormente aquecidas a 100°C por 2 minutos. As eletroforeses foram realizados em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes (SDS), nas concentrações de 14% e 5% para os geis de separação e empilhamento, respectivamente.

Para revelação do gel com foi utilizado uma solução contendo Coomassie Brilhante Blue R-250, ácido acético e metanol. Os reagentes e seus volumes para preparação dos géis estão descritos no quadro abaixo:

Reagentes para preparação dos géis estão descritos no quadro abaixo:

SOLUÇÕES	VOLUME (μ L)	
	Gel de separação 14%	Gel de empilhamento 5%
Tris-HCl 2M pH=8,8	1.170	125
Tris-HCl 2M pH="6,8	62,5	20
EDTA 200mM	62,5	20
Acrilamida: bis-acrilamida(30:0,8 m/m)	2.920	325
Água deionizada	1.950	1.480
TEMED	7,5	2,5
Persulfato de amônio (10% m/v)	37,5	17,5

4.10. Atividade fibrinolítica:

A atividade fibrinolítica foi feita segundo ESTEVÃO-COSTA (2000) para produção do coagulo de fibrina utilizou-se uma solução final contendo fibrinogênio bovina 0,2%, trombina bovina 1u/ml dissolvidos em tampão fosfato 5mM pH 7.4 e NaCl 150mM. Esta solução foi colocada em placa de Petri e foi pré-incubada por 1 hora para formação do coagulo de fibrina. Nesta placa foram abertos pocinhos com 2mm de diâmetro e volume de 10 μ L. Amostras foram aplicadas nos pocinhos continham e 2,5 μ g; 5 μ g e 10 μ g de PB, para neutralização utilizou -se 10 μ g de PB e adicionou-se 100 μ g e 200 μ g de amostras (EB, FE e Ppt), mantendo o volume final igual a 10 μ L pela adição de PBS, estas amostras eram então incubadas a 37°C por 24 horas, ao fim destas media-se o halo de fibrinólise.

4.11. Atividade Hemorrágica:

A hemorragia induzida pela peçonha de *B. moojeni* foi feita utilizando a técnica de FREITAS(2002) 20 μ g de PB diluída em um volume de 50 μ L de PBS, que era inoculada via intradérmica no dorso do animal, e após 3 horas estes eram sacrificados para retirada da pele e medição da área do halo hemorrágico. A medida do halo hemorrágico foi feita através da transferência do halo para papel celofane e posteriormente para papel minimetrado, o qual

era pesado, o valor da área era estimada a partir de um reta padrão, da relação (peso X área) do papel milimetrado.

4.12. Alteração da coagulabilidade sangüínea:

A indução da alteração da coagulabilidade sangüínea foi testada através da inoculação via intraperitoneal de 100 μ g de PB em uma solução de 50 μ L PBS. Passadas 5 horas do momento da inoculação os animais eram então sacrificados, para proceder a retirada do sangue por punção cardíaca, o sangue obtido era colocado em tubos de ensaio, um cronometro era disparado e o tempo para que ocorresse a coagulação era registrado.

4.13. Ensaio de neutralização:

Para neutralização dos efeitos proteolíticos da peçonha bruta de *B. moojeni*, esta recebia a adição do extrato bruto de *Casearia grandiflora* e suas frações e imediatamente depois eram iniciadas as atividades, utilizando uma dose constante de PB e diferentes concentrações de EB e frações, mantendo sempre o volume final constante, utilizando para isto PBS.

5. RESULTADOS:

5.1. Atividade coagulante:

O efeito dose resposta da atividade coagulante de PB de *B. moojeni* em diferentes concentrações é mostrado na figura 1, na qual as amostras de 2,5 μ g; 5 μ g e 10 μ g de PB coagularam o plasma em 110, 57 e 31 segundos, respectivamente. A dose mínima coagulante (a menor dose capaz de induzir a formação do coágulo em 60 segundos) foi de aproximadamente 5 μ g de PB. A partir deste teste todos os ensaios de neutralização da atividade coagulante foram realizados utilizando de 10 μ g de PB.

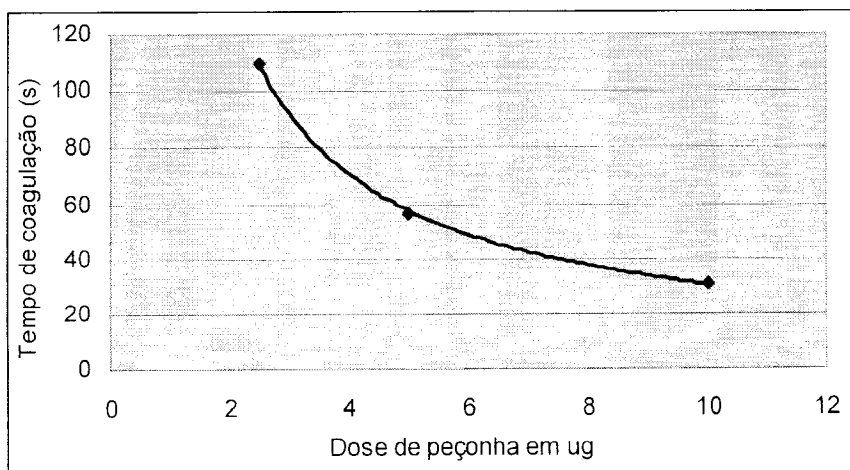


Figura 1: Efeito dose resposta para o tempo de coagulação .

Em 100 μ L de Plasma bovino citratado a 37°C, foram adicionados 20 μ L de PBs contendo (2,5 μ g; 5 μ g e 10 μ g de PB) e o tempo necessário para a formação do coagulo foi registrado.

5.2. Neutralização da atividade coagulante pelo extrato bruto:

O EB de *C. grandiflora* se mostrou eficiente em neutralizar a coagulação induzida pela peçonha, este efeito inibitório foi dose dependente (Figura 2), sendo que na proporção 1:2,5(PB:EB) o extrato causou uma inibição de mais da atividade coagulante de PB.

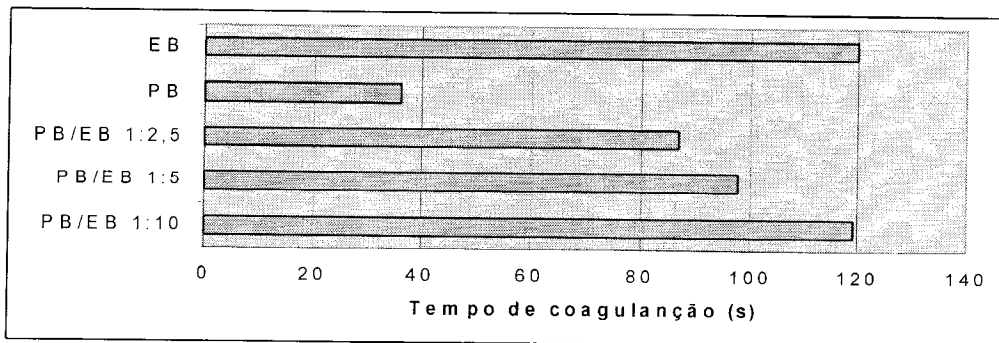


Figura 2: Inibição da atividade coagulante de PB de *B. moojeni* por EB.

Em 100 μ L de plasma bovino foram adicionadas 20 μ L de PBS contendo 10 μ g de PB e 25 μ g, 50 μ g e 100 μ g de EB, previamente misturados e o tempo de coagulação foi registrado.

5.3. Inibição da atividade coagulante de PB de *B. moojeni* por EB, FE e Ppt.

Para comparar o potencial de inibição do EB e de suas frações obtidas por solubilidade diferencial em etanol (FE e Ppt) foi testada a inibição da coagulação do plasma induzida por 10 μ g de PB com adição de 100 μ g de EB,

FE e Ppt. Entre as amostras testadas, a mais eficiente foi Ppt, pois neutralizou mais fortemente que EB, sendo que FE não apresentou efeito neutralizador, sendo igual a atividade coagulante de PB, como mostrado na (Figura3).

Figura 3: Inibição da atividade coagulante de PB de *B. moojeni* por EB FE e Ppt.

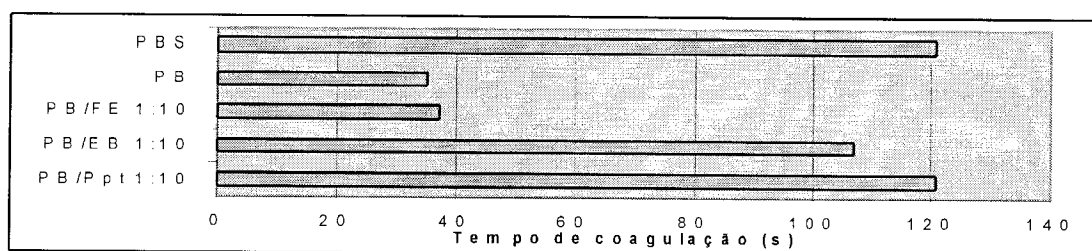


Figura3: Inibição da atividade coagulante do plasma induzida por PB de *B. moojeni* por EB, FE e Ppt de *C. grandiflora*.

A 100µL de plasma a 37°C foram adicionados 20µL de PBS, contendo 10µg de PB, combinado ou não com 100µg de EB, FE e Ppt, e o necessário para a formação do coagulo era registrado.

5.4. Coagulação do plasma bovino induzida por CaCl₂:

A coagulação do plasma induzida pela reposição do íon Ca⁺⁺ ocorreu em aproximadamente 4 minutos. Este tempo de coagulação não foi alterado pela presença do Extrato Bruto, sendo que o este não foi capaz de induzir a coagulação na ausência do íon Ca⁺⁺, como mostrado na figura 4.

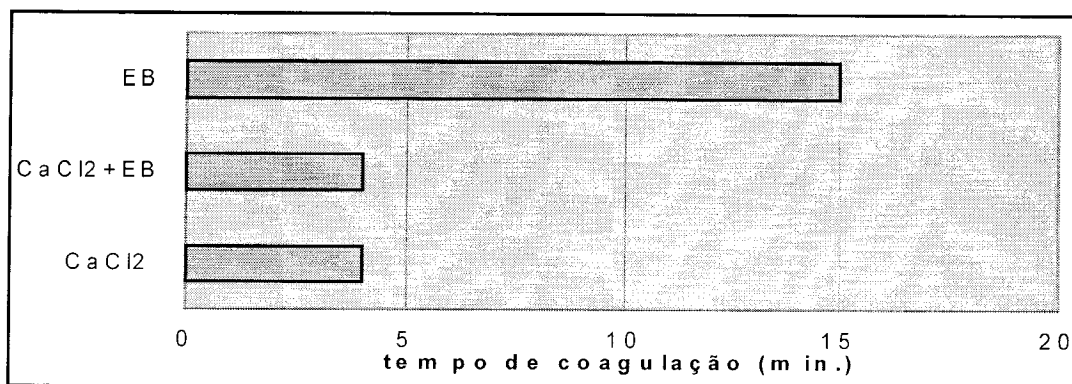


Figura 4: Tempo de coagulação induzida por CaCl₂.

Em 200µL de plasma foram adicionados 50µL de CaCl₂ 0,5M, CaCl₂ 0,5M adicionado de EB na proporção 1:10 (m/m, CaCl₂/EB) ou EB na mesma quantidade utilizada anteriormente. Estas amostras era incubadas a 37°C até que ocorresse a formação do coagulo, então o tempo era registrado.

5.5. Inibição da atividade fibrinogenolítica de PB por EB, FE e Ppt.

Nos ensaios de degradação do fibrinogênio observou-se que PB de *B. moojeni* degrada totalmente as cadeias A α e B β após duas horas de incubação a 37°. Na presença de EB (figura 5) a cadeia B β do fibrinogênio foi totalmente protegida da hidrólise por induzida PB, isto de forma dose dependente e manteve intacta em quantidade superior a 50 μ g de EB (colunas 5 a 8). Nestas condições, a cadeia A α do fibrinogênio não foi visualizada, mesmo com menor concentração de EB utilizada (coluna 3).

Quando se incubou o fibrinogênio com PB e Ppt, tanto a cadeia A α quanto a cadeia B β foram preservadas (figura 6). A Fração Etanólica (FE), quando incuba com fibrinogênio e PB, neutralizou a atividade proteolítica de PB sobre a cadeia B β (figura 7, colunas 3 e 4), porém a cadeia A α não foi possível de ser detectada na eletroforese, também na figura 7 na coluna 5, onde a cadeia A α não foi visualizada, quando o fibrinogênio foi incubado com FE na ausência de PB.

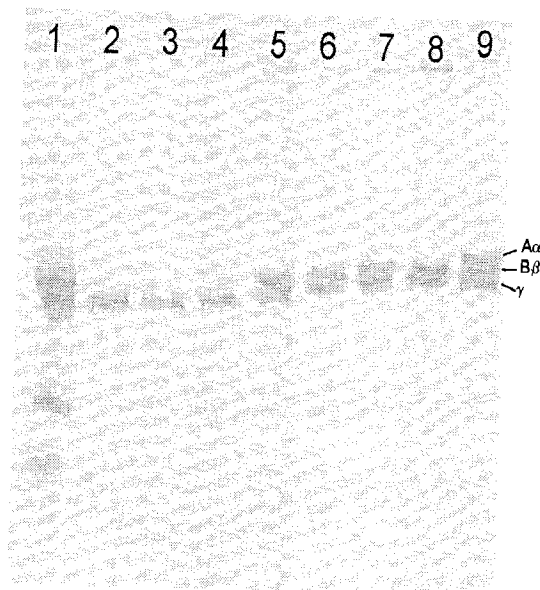


Figura 5: Neutralização da atividade fibrinogenolítica de PB de *B. moojeni* pelo EB de *C. grandiflora* de forma dose dependente.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 14%, na presença de SDS, do fibrinogênio bovino (Fi) incubado a 37°C por 2 horas com PB na ausência ou presença de EB.

Colunas:

- 1- Fi (75 μ g) + PB (20 μ g) inativado com tampão Stop + β -mercaptoetanol;
- 2- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g);
- 3- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g) + EB (5 μ g);
- 4- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g) + EB (25 μ g);
- 5- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g) + EB (50 μ g);
- 6- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g) + EB (100 μ g);
- 7- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g) + EB (250 μ g);
- 8- Fi (75 μ g) + EB (250 μ g);

9- Fi (75 μ g).

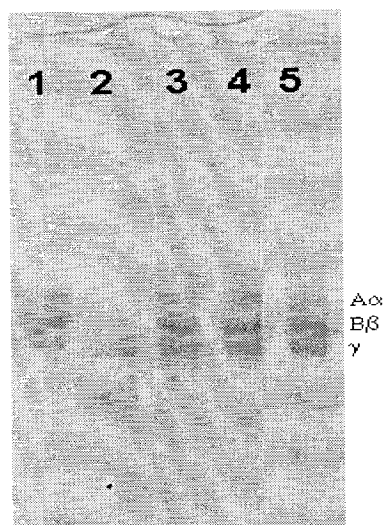


Figura 6: Neutralização da atividade fibrinogenolítica de PB de *B. moojeni* pelo Ppt de *C. grandiflora* de forma dose dependente.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 14%, na presença de SDS, do fibrinogênio bovino (Fi), incubado por 2 horas a 37° com PB na presença ou ausência de Ppt.

Colunas:

- 1- Fi (75 μ g);
- 2- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g);
- 3- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g) + Ppt (50 μ g);
- 4- Fi (75 μ g) + PB (5 μ g) + Ppt (100 μ g);
- 5- Fi (75 μ g) + Ppt (100 μ g).

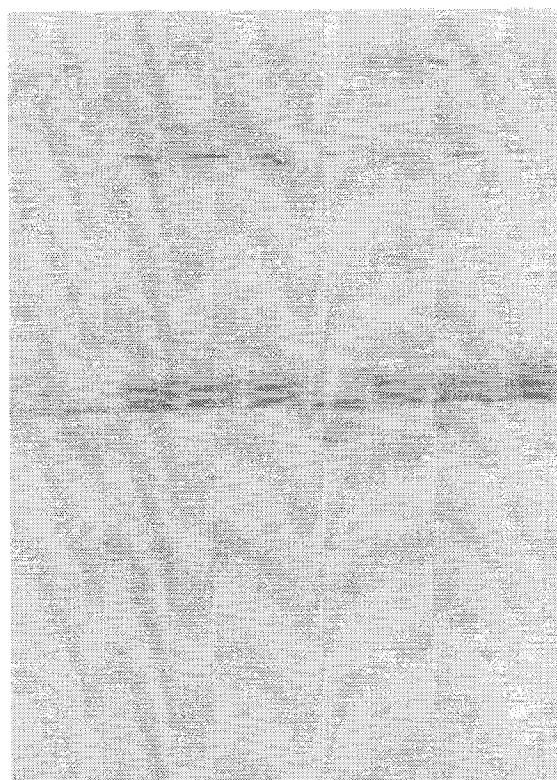


Figura 7: Neutralização da atividade fibrinogenolítica de PB de *B. moojeni* por FE e EB de *C. grandiflora* de forma dose dependente.

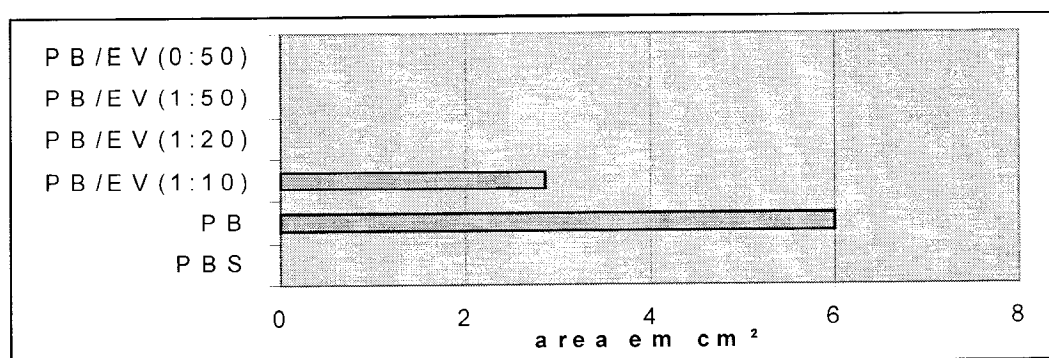
Eletroforese em gel de poliacrilamida 14%, na presença de SDS, do Fibrinogênio bovino (Fi) incubado por 2 horas a 37°C, com PB e ou FE e EB.

Colunas:

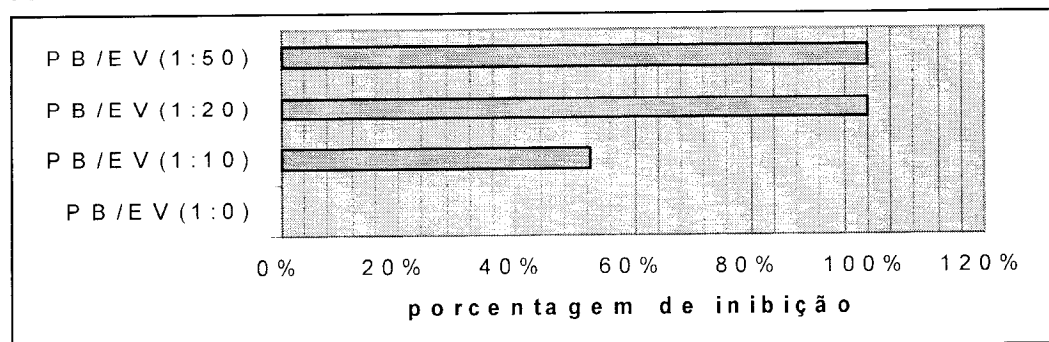
- 1- Fi (75µg);
- 2- Fi (75µg) + PB (5µg);
- 3- Fi (75µg) + PB (5µg) + FE (50µg);
- 4- Fi (75µg) + PB (5µg) + FE (100µg);
- 5- Fi (75µg) + FE (100µg);
- 6- Fi (75µg) + PB (5µg);
- 7- Fi (75µg) + PB (5µg) + EB (50µg);
- 8- Fi (75µg) + PB (5µg) + EB (100µg);
- 9- Fi (75µg) + EB (100µg).

5.6. Neutralização da atividade hemorrágica induzida por PB de *B. moojeni* pelo EB de *C. grandiflora*.

A neutralização da atividade hemorrágica pelo EB foi muito eficiente, chegando a 100% em proporções maiores que 1:20 (PB:EB) e na proporção menor 1:10 causou uma inibição de 50% (figura 8-B), mostrando que um efeito dose resposta para a inibição (figura 8-A). A partir destes resultados os testes com as frações utilizaram a proporção 1:10 (PB:FE ou Ppt).



A

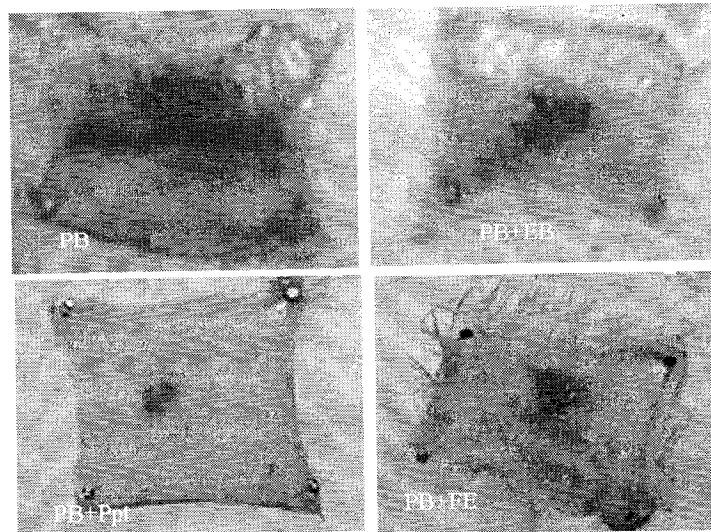


B

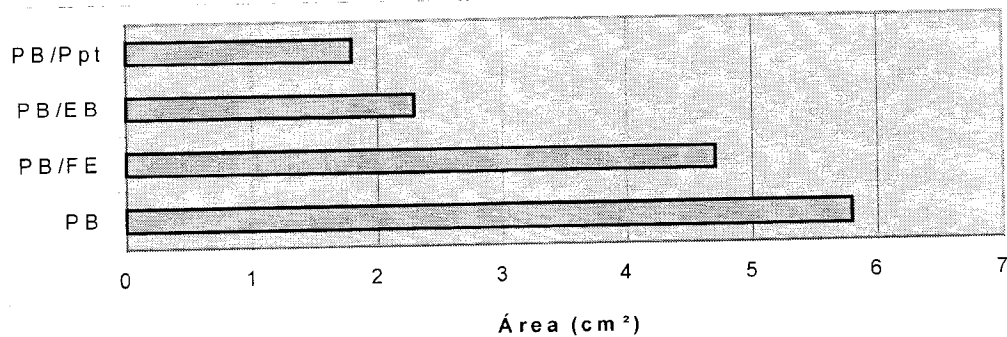
Figura 8: Neutralização da atividade hemorrágica induzida por PB de *B. moojeni* pelo EB de *C. grandiflora*. A atividade hemorrágica foi induzida pela inoculação de 20µg de PB via intradérmica na região dorsal de camundongos, associada ou não com EB, nas proporções PB/EB de 1:10, 1:20 e 1:50. **A:** Neutralização mostrada pela área do halo hemorrágico. **B:** Neutralização apresentada pela porcentagem de inibição.

5.7. Inibição da atividade hemorrágica induzida por PB de *B. moojeni* pelo EB, Ppt e FE de *C. grandiflora*.

Na neutralização da atividade hemorrágica induzida por PB, testou-se as frações somente na proporção 1:10(PB:Fração), a fração Ppt foi a mais eficiente e a fração FE se mostrou menos eficiente, se comparado com EB tanto quanto se comparado com Ppt.



A



B

Figura 9: Inibição da atividade hemorrágica induzida por PB de *B. moojeni* pelo EB de *C. grandiflora* e suas frações (FE e Ppt).

A atividade hemorrágica foi induzida pela inoculação de 20 μ g de PB via intradérmica na região dorsal de camundongos, associado ou não com 200 μ g de EB, FE e Ppt. Após 5 horas, os animais eram sacrificados para retirada da pele, para medição do halo hemorrágico. **A:** Fotografia da parte interna da pele de animais com halo hemorrágico induzido pela PB na ausência e presença de EB, FE e Ppt. **B:** Inibição mostrada pela área do halo hemorrágico.

5.8. Neutralização da alteração da coagulabilidade sangüínea:

Quando injetado em camundongos, PB de *B. moojeni* promoveu um aumento considerável no tempo de coagulação do sangue dos animais (figura 10). O EB inoculado com PB, causou inibição da alteração da coagulabilidade sangüínea induzida por PB em todas as doses utilizadas. Porém, quando inoculado na ausência de PB, o EB também foi capaz de induzir a diminuição da coagulabilidade sangüínea em camundongos, elevando o tempo de coagulação do sangue de 17" (controle que recebeu apenas PBS) para 33".

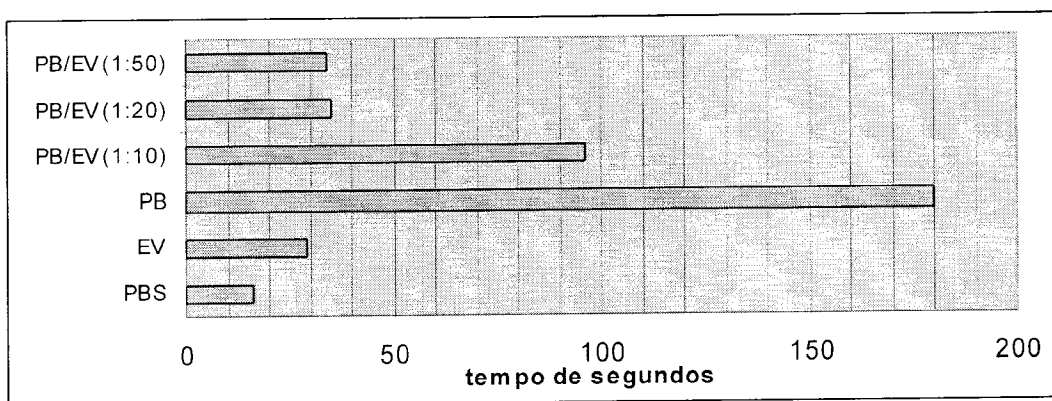


Figura 10: Para induzir a alteração da coagulabilidade sangüínea utilizava-se 100µg de PB injetadas via intraperitoneal dissolvidos em 50 µL de PBS, ou PB adicionado com EB em diferentes proporções (1:10, 1:20, 1:50, m/m). Após 4 horas, os animais eram sacrificados e o sangue de cada animal foi coletado por punção cardíaca, colocado em tubo de ensaio e o tempo para formação do coágulo era cronometrado. Testou-se também as alterações induzidas por EB e de PBS sozinho, como controle negativos.

5.9. Inibição da alteração da coagulabilidade sangüínea induzida por PB de *B. moojeni* pelo EB, FE e Ppt de *C. grandiflora*.

Ao testarmos a inibição da alteração da coagulabilidade sangüínea verificou-se que Ppt possui um efeito inibitório da incoagulabilidade sangüínea maior se comparado com EB, tanto quanto se comparado com FE, este não apresentou inibição significativa da atividade, tem o tempo de coagulação muito semelhante que recebeu somente PB.

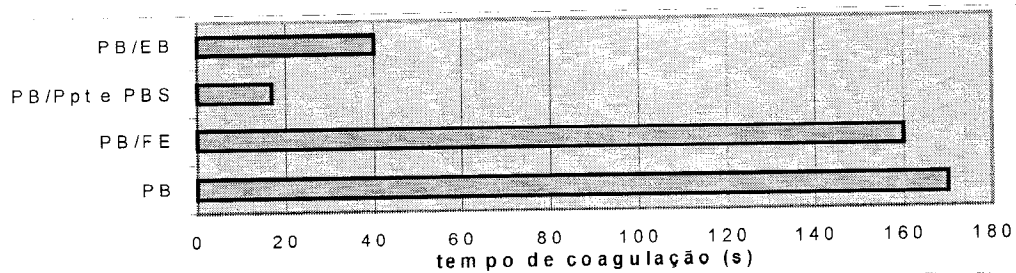
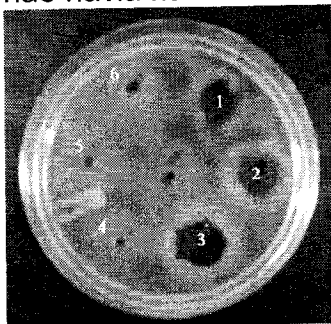


Figura 11: Inibição da incoagulabilidade sangüínea induzida por PB de *B. moojeni* pelo EB de *C. grandiflora* e suas frações (FE e Ppt).

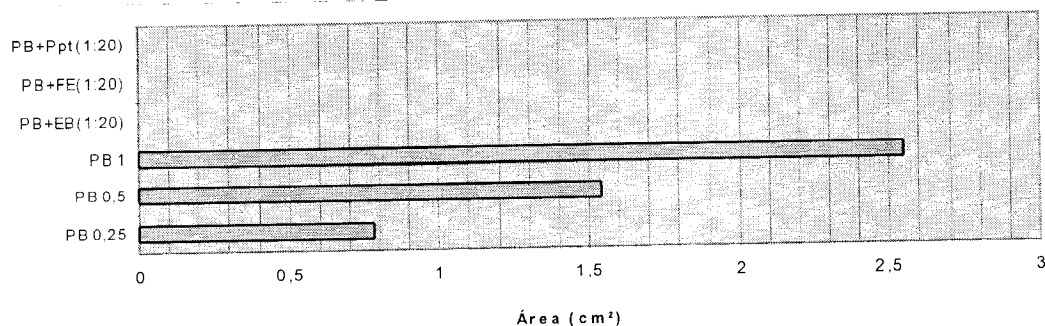
Para os teste de coagulabilidade sangüínea, PB(100µg) foi inoculada via intraperitoneal dissolvido em 50 µL de PBS ou PB misturado com as amostras vegetais (EB, Ppt e FE) . Após 4 horas, cada animal foi sacrificado e o sangue coletado por punção cardíaca e colocado em tubo de ensaio para determinar o tempo necessário para formação do coágulo.

5.10. Neutralização da atividade fibrinolítica:

Nos ensaios de neutralização da atividade fibrinolítica todas as amostras testadas (EB, FE e Ppt) foram eficientes em neutralizar a atividade fibrinolítica, causando a neutralização total em todas as doses testadas. Porém não observou-se diferenças entre as amostras, uma vez que na presença destas não havia halo de fibrinólise (figura 12).



A



B

Figura 12: Neutralização da atividade fibrinolítica de PB de *B. moojeni* por EB, FE e Ppt de *C. grandiflora*.

Para determinação da atividade fibrinolítica em placa de fibrina, utilizou-se 2,5 μ g ; 5 μ g e 10 μ g de PB para induzir a digestão do coágulo de fibrina e adicionou-se EB, FE e Ppt na proporção 1:20, como mostrados na figura 12 A. As amostras eram diluídas em PBS para um volume final de 10 μ L e aplicadas em pocinhos, abertos na placa. Incubava-se as placas em câmara úmida por 24h a 37°C, e então eram medidos os diâmetros dos halos de fibrinólise. **A:** fotografia da placa de fibrinona, 1 - 2,5 μ g de PB; 2- 5 μ g de PB; 3- 10 μ g de PB; 4 a 6 - 10 μ g + 200 μ g de (EB, FE e Ppt), respectivamente. **B:** neutralização mostrada pela área do halo de fibrinólise.

6. Discussão:

A atividade coagulante induzida por PB de *Bothrops moojeni* sobre o plasma bovino foi inibida pela adição de EB de *Casearia grandiflora*, como mostrado na figura1, outros trabalhos utilizando extratos aquosos de plantas com potencial antiofídico como de IZIDORO(2001), de BORGES(2001), de FREITAS(2002), DO VALE(2004) mostraram resultados similares para inibição da atividade coagulante, sendo os efeitos inibitórios dos extratos brutos significativos a partir da proporção de 1:5 ou 1:10, o extrato bruto de *C. grandiflora* se mostrou eficiente para neutralizar a coagulação induzida pela peçonha, e reduziu pelo menos 4 vezes a velocidade de conversão de fibrinogênio em fibrina, o que pode indicar que atuará evitando a depleção do estoque de fibrinogênio plasmático, isso porque o extrato possui compostos capazes de inibir enzimas trombin-like presentes na peçonha de *Bothrops moojeni*. FE não inibiu atividade coagulante nas doses testadas, como apresentado na figura2, mostrando que os compostos capazes de inibir a coagulação são em água e não são solúveis em etanol ou em compostos orgânicos, como no trabalho de DO VALE(2004) as frações solúveis em metanol não foram eficientes em inibir a atividade coagulante, os resultados da figura 2 mostram que o Precipitado Etanólico, possui em maior proporção em relação a EB e FE os compostos capazes de inibir a atividade das enzimas serinoprotease das peçonhas de serpente, estas enzimas são as principais enzimas componentes da cascata de coagulação e o EB e Ppt tendo compostos capazes de inibir estas enzimas é possível que estes tenha atividade direta sobre a cascata de coagulação sangüínea.

O tempo de coagulação induzida pela adição de CaCl_2 , não foi alterado pela presença de EB, isso mostra que este não é capaz de capturar os íons Ca^{2+} da solução teste, o que mostra que mesmo provavelmente possui poucos taninos e fitatos que podem se ligar a íons metálicos bivalentes em diferentes graus de afinidade(SIMÕES et al 2003), estes não causaram efeito sobre a coagulação pela reposição de Ca^{2+} como no trabalho de DO VALE (2004).

A inibição da atividade fibrinogenolítica foi observada para todas as amostras(EB, FE e Ppt) testadas, mostradas nas figuras 3, 4 e 5, mostrando efeito dose resposta e inibindo mais eficientemente nas proporções 1:20 e 1:50(PB:amostras), EB e FE inibiram somente a degradação da cadeia B β , e causam a precipitação da cadeia A α não sendo possível analisar a atividade sobre esta, não encontrando trabalhos com resultados similares, porém Ppt mostrou-se eficiente em inibir a degradação das cadeias A α e B β sem causar a precipitação do fibrinogênio, resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos, porém utilizando extrato bruto como o de BORGES(2001), IZIDORO(2001), FREITAS(2002), DO VALE(2004).

No entanto o trabalho de FREITAS(2002) mostrava que o extrato bruto de *C. grandiflora* não apresentou a capacidade de causar a precipitação do fibrinogênio, como no presente trabalho o que é mostrado na figura1(coluna 8) e na figura2(coluna 5), esta divergência porem pode ser devido a época do ano e da localidade, nas quais as folhas foram coletadas para preparação do extrato bruto, pois o extrato testado no presente trabalho utilizou folhas coletado no mês de fevereiro e o de FREITAS(2002) utilizou de folhas coletadas no mês de novembro, porque os compostos presentes no extrato são formados em decorrência da adaptação do vegetal a diversos fatores como, temperatura, umidade, pH e nutrientes disponíveis no solo, dentre outros (HARBERMEHL, 1998), nos resultados de VALE(2004) a pricipitação da cadeias do fibrinogênio foi mostrado e justificada pela presença de taninos que podem interagir com as proteínas levando esta a se precipitarem na solução. O resultados das atividade fibrinogenolítica mostram que o extrato bruto e suas frações possuem compostos que são capazes de diminuir o efeito das peçonha de serpentes na degradação do fibrinogênio o principal substrato da coagulação do plasma sangüíneo, assim sendo as amostras testadas parecem ser capazes de minimizar o efeito de depleção do estoque de fibrinogênio plasmático, um dos evento que gera a incoagulabilidade sangüínea.

A hemorragia induzida pela inoculação de PB via intradérmica foi neutralizada pela adição de EB em proporções maior ou igual a 1:20(PB/EB),

como nos trabalhos de MELO(1994), BORGES(2001), IZIDORO(2001) e FREITAS(2002) nos quais a proporção da 1:10(PB/EB) foi capaz de neutralizar a atividade hemorrágica, FE e Ppt também foram capazes de causar a inibição da atividade hemorrágica, porém não se testou concentrações capazes de neutralizar a atividade, pois o interesse neste teste era comparar as diferenças no potencial de inibição entre as frações, e nestes teste Ppt mostrou-se mais eficiente uma vez que inibiu em maior taxa que o EB e FE. Os resultados da neutralização da atividade hemorrágica mostra que EB de *C. grandiflora*, FE e Ppt são eficientes inibidores da atividade hemorrágica local característica do acidente Botrópico, desta forma o extrato de *Casearia grandiflora* demonstra possuir compostos ativos capazes de neutralizar as metaloproteases das peçonhas de serpente, podendo ser capaz de inibir outras metaloproteases semelhantes como a da matriz extracelular e de células tumorais(KHOKLA, 1994).

Coagulabilidade sangüínea esta diretamente ligada a concentração de fibrinogênio, a presença de plaquetas em condições normais e de trombina no plasma, as toxinas das peçonhas de serpentes são capazes de interferir em diferentes pontos e de variadas formas na cascata de coagulação, muitas das vez levando a depleção do estoque de fibrinogênio e conseqüente incoagulabilidade sangüínea ou atuando diretamente nas plaquetas, atingindo os sítios integrinas ou ligante de colageno da membrana plaquetária, a inibição de incoagulabilidade sangüínea foi testada resultados similares foram obtidos por IZIDORO(2001) através de técnicas mais refinadas, utilizando a dosagem de fibrinogênio plasmático dos animais testados, aonde o extrato de *Casearia mariquitensis* foi capaz de neutralizar a depleção do estoque de fibrinogênio. Mostrou também que EB possui atividade inibitória a tem um certo nível, porém EB também foi capaz de alterar a coagulação sangüínea no controle negativo, entretanto Ppt tem efeito neutralizador da incoagulabilidade sangüínea induzida por PB e não causa efeito sobre a coagulação no controle negativo. Os resultados mostram que o EB de *C. grandiflora* e o Ppt são eficientes neutralizadores das hemorragias sistêmicas induzidas pelas trombin-

like presentes nas peçonha Botrópicas, atuando na diminuição da atividade de conversão de fibrinogênio em fibrina destas enzimas ou impedindo a atuação desta peçonha sobre os sítio integrina das plaquetas.

A neutralização dos agentes trombolíticos presentes em PB foi observada para todas as amostra(EB, FE e Ppt) e proporções maiores que (1:10) PB/amostra, nenhuma das amostras foi capaz de causar fibrinólise no controle negativo, estes resultados mostram que EB de *C.grandiflora* e suas frações são eficiente em neutralizar a digestão de coágulos o que pode levar a diminuição de hemorragias sistêmicas, uma vez que os coagulação normalmente existente não serão digeridos.

Todos resultados mostram que o extrato bruto de *Casearia grandiflora* possui inibidores de enzimas proteolíticas, tanto serinoproteases quanto metaloproteases, presentes na peçonha de *Bothrops moojeni*, a identificação dos inibidores de proteases tem grande importância medica, porque proteases estruturalmente similares as das peçonha de serpente são encontradas em células de mamíferos. Proteases e seus inibidores endógenos possuem um delicado equilíbrio para manutenção da homeostase(PEREZ & SÁNCHEZ, 1999).

Protease atuando em diversos processos de ativação e degradação de hormônio protéicos como insulina e glucagon (SMEEKENS, 1993). Proteases atuam na migração de células através da matrix extracelular onde são necessaria para remodelação do tecido e invasão tumoral (CHEN, 1992). Metaloproteases estão envolvidas em metastase de tumores em humanos(KHOKLA, 1994). Inibidores de proteases tem sido usados com algum sucesso como drogas com potencial de controle da AIDS(Ermolief et al., 1997).

Desta forma estudo mais aprofundados com o extrato de *C. grandiflora* e tentativas para de isolamento dos seus componentes são necessário para serem utilizados como tratamento auxiliar a soroterapia, para a serem testados quanto a suas outras propriedades farmacológicas como por exemplo sobre suas inrações com proteases da matrix extracelular e metaloproteinases de células tumorais, e uma vez conhecida a extrutura a forma de interação

deste inibidores com as proteases, fica aberto o caminho para construção de moléculas similares e mais potente, para ser testadas como novas drogas no tratatento de Câncer, AIDS e de outras interações de inibidores como proteases capazes de ativar ou degrardar hormônios de natureza protéica.

Contudo não podemos deixar de divulgar estes resultado pois em trabalhos como o de SOARES(2004) que fez uma extensa revisão sobre plantas brasileiras, que neutralizam venenos de serpentes, neste a família Flacourtiaceae aparecem em uma posição de destaque, tendo duas espécies que foram validadas como tendo ação antiofídica por teste bioquímicos. Entretanto existe estudos ainda não divulgados como o de FREITAS(2002) que também trabalhou com extrato aquoso de folhas de *Casearia grandiflora* e o de Silva(2002) que trabalhou com o extrato de *Casearia gossypiosperma*. Este estudo como o de outros autores mostram um coerência nos dados encontrados e leva a crer que o gênero das Casearias possui em suas folhas compostos capazes de neutralizar diversas atividade de proteases. E caso estes trabalhos houvesse sido divulgado, a família Flacourtiaceae passaria a ser considerada uma das de maior relevância juntamente com as famílias Apocynaceae e Astreaceae as quais possuem 3 espécies com estudos científicos comprovando as propriedades antiofídicas divulgados, sendo que Flacourtiaceae passaria a ter 4 espécies validadas cientificamente como tendo compostos capazes de neutralizarem a atividade de peçonhas ofídicas. Este fato poderia trazer um maior interesse dos pesquisadores da área de produtos naturais na pesquisa dos extratos de *Casearia* sp, o que provavelmente levaria ao isolamento dos inibidores das proteases presente neste extrato, este compostos isolados propiciariam estudos sobre neutralização de proteases de interesse médico e para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir da estrutura e da interação dos inibidores com as proteases.

7. Conclusão:

Partindo de nossos resultados podemos concluir que, o extrato bruto de *Casearia grandiflora* possui compostos capazes de inibir as seguintes ações induzidas pela peçonha bruta de *Bothrops moojeni*:

- *A coagulação do plasma;
- *A degradação da cadeias B β do fibrinogênio;
- *A atividade hemorrágica;
- *A alteração da coagulabilidade sanguínea;
- *A digestão da rede de fibrina;

Nossos resultados também nós levam a concluir que:

- *O extrato bruto possui compostos que causam a precipitação da cadeia A α do fibrinogênio;
- *O extrato não possui compostos capazes de capturar ions Ca²⁺, pois não altera o tempo para a coagulação induzida pela solução de CaCl₂;

A fração etanólica do extrato bruto de *Casearia grandiflora* possui compostos que inibiram as seguintes atividades induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*:

- *A degradação da cadeia B β do fibrinogênio;
- *A atividade hemorrágica;
- *A digestão da rede de fibrina;

Outros resultados nos levam a concluir que a fração etanólica não inibe os seguintes atividades induzidas pela peçonha bruta de *Bothrops moojeni*:

- *Causa a precipitação da cadeia A α do fibrinogênio;
- *A coagulação do plasma;
- *A alteração da coagulabilidade sanguínea;

O precipitado etanólico do extrato bruto de *Casearia grandiflora* possui compostos capazes de causar a inibição das seguintes atividades induzidas pela peçonha bruta de *Bothrops moojeni*:

- *Coagulante do plasma;
- *Degradação das cadeias do fibrinogênio;
- *A atividade hemorrágica;
- *A alteração da coagulabilidade sangüínea;
- *A digestão da rede de fibrina;

8.Referências Bibliográficas:

ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAUM, F. R. Biochemical and Biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 102B, n. 4, pp. 727-732, 1992.

BAILEY, P.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.** V. 39, p. 175 - 189, 1999.

BARRAVIEIRA, B., PERAÇOLI, M.T.S., **Soroterapia heteróloga. Venenos Animais: uma visão integrada**, Ed. Publicações Científica, Rio de Janeiro, pp. 361-372, 1994.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, V. 62, pp. 352-372, 1994.

BORGES, M.H., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., ANDRIÃO-ESCARSO, S.H., DINIZ, H. HAMAGUCHI, A., QUINTERO, A., LIZANO, S., GUITIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R., HOMSI-BRANDENBRUGO, M.I., Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacoutiaceae) on actinos of snake and bee venoms and on activity phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127B, n.1, pp. 21-30, 2000.

BORGES, M. H, SOARES, A. M., RODRIGUES, V.M., OLIVEIRA F., FRANSCHESCHI A.M., RUCAVADO A., GIGLIO J.R., HOMSI-BRANDERBURGO M.I., Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia Sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, pp. 1863-1869, 2001.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE DO , **Manual de Diagnostico de Tratamento de Acidentes Peçonhentos**. 2ª ed. Brasília : Fundação Nacional Saúde , 131p., 1998.

CARVALHES, S. F.; BARRETO, A. G.; BISCAIA, E. C. Plantas medicinais no Brasil. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro/Vitória, v. 71, n. 720, pp. 5-6, set. 2003.

DA SILVA, C.J., JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A., Epydemiology of snakebite in a central region of Brazil, **Toxicon**, v.41, n.1, pp.251-255, 2003.

DEMUNER, A. J.; MALTHA, C. R. A.; BARBOSA, L. C. A.; PERES, V. **Experimentos de Química Orgânica**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2000. 69p.

EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Trombosis Research.**, v. 2, pp. 85-89, 1973.

ESTEVIÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E. F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic end fibrinolytic systems. *Thrombosis Research*, V.99, n.4, p. 363-376, 2000.

FREITAS, F.G., **Neutralização dos principais efeitos tóxicos de peçonhas botrópicas pelo extrato aquoso de *Casearia grandiflora***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 97p., 1998.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; DEDAS, L., Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the Bushmaster. **Toxicon**, v. 25, pp. 713-720, 1987

HABERMEHL, G.G., Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. **Toxicon**, v.36, pp. 1707-1719, 1998.

HITE, L.A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, V.308, pp. 182-191, 1994.

IZIDORO, L.F.M., RODRIGUES, V.M., RODRIGUES, R.S., FERRO, E.V., HAMAGUCHI, A., GIGLIO, J.R., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae) **Biochimie**, v. 85, pp. 669-675, 2003.

JORGE, M. T., RIBEIRO, L.A., Acidente por serpentes peçonhentas do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasil**. 36 (2), pp. 66-77, 1990.

LORENZII, H., **Arvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2 ed., Plantarum, Nova Obessa-SP, 370 p., 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Hemostasia e Trombose. 3 de., editora Ganabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, pp. 249-279, 1997.

SWENSON, S.; MARKLAND Jr, F. S. Snake Venoms Fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, V. 45, n. 1, pp. 1021-1039. 2005.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, pp. 1131-1142, 1992.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G., THEKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated venoms of different species of Bothrops snake. **Toxicon**, v. 29, n. 6, pp. 713-723, 1991.

OWNBY, C. L.; COLBERTG, T. R. AND ODELL, G. V. Vivo ability of antimyotoxin a serum plus polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize prairie rattlesnake (Crotalus viridis viridis) venom. **Toxicon**, v. 24, pp. 197-200, 1986.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, pp. 603-613, 2001.

RODRIGUES, V.M., SOARES A.M., MANCIN A.C., FONTES M.R.M., HONSI-BRANDEBURGO, M.I. GIGLIO, J.R. Geographic Variations in the composition of myotoxins from Bothrops neuwiedi snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry Physiology**. 121A, pp. 215-222, 1998.

SILVA, T. A. **Ação do Extrato Vegetal Aquoso de Casearia gossypiosperma(Flacourtiaceas) na Inibição de Efeitos Tóxicos das Peçonhas de Serpentes Botrópicas**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 88p., 2002.

SOARES, A.M., JANUÁRIO, A.H., LOURENÇO, M.V., PERREIRA, A.M., PERREIRA, P.S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs of the Future**, 29(11), pp. 1105-1117, 2004.

STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**. V. 20, n. 1, pp. 265-273, 1982.

STANDLEY, P. C. & STEYERMARK, J. A. Leguminosae. **Fieldiana Bot.**, Filadelfia, v. 24, n. 5, pp. 1-425, 1946

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Ethnopharmacol**, v. 51, pp. 239-254, 1996.