

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

*Neutralização dos efeitos biológicos e
enzimáticos induzidos pela peçonha de
Bothrops neuwiedi pauloensis pelo extrato aquoso
de Schizolobium parahyba*

Mirian Machado Mendes

Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, Universidade Fe-
deral de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG
Janeiro---2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MIRIAN MACHADO MENDES

*Neutralização dos efeitos biológicos e
enzimáticos induzidos pela peçonha de
Bothrops neuwiedi pauloensis pelo extrato aquoso
de Schizolobium parahyba*

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia

Banca Examinadora:

Dra: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dra: Maria Inês Homsí-Brandenburg

Cristiani Baldo

Ms.: Cristiani Baldo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

*Neutralização dos efeitos biológicos e
enzimáticos induzidos pela peçonha de
Bothrops neuwiedi pauloensis pelo extrato aquoso
de Schizolobium parahyba*

Mirian Machado Mendes

Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em 11/11

Dra. Ana Angélica
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Janeiro—2005

Agradecimentos

- ☛ À professora Dra. Maria Inés Homsí-Brandeburgo pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório o que me fez ir muito além do que eu imaginava, pela confiança, por sua preocupação não só com os trabalhos e pela amizade.
- ☛ À Dra. Amélia Hamaguchi pela confiança e por sua disponibilidade em ajudar, solucionar dúvidas mesmo que não fossem de Bioquímica.
- ☛ À professora Dra. Veridiana pela contribuição em meus trabalhos, que acompanhou meu crescimento nos últimos três anos.
- ☛ À professora Dra. Vera Lúcia de Campos Brites pelas peçonhas doadas ao nosso laboratório, sem as quais este trabalho não se realizaria.
- ☛ À amiga Carla que sempre me ouviu e se mostrou feliz com cada conquista minha.
- ☛ Às amigas Cristiani e Renata que sempre me ajudaram.
- ☛ Ao amigo Luís Carlos que engana com seu “ar de seriedade” mas que sempre nos faz rir e está pronto a ajudar (mesmo que vá reclamando...)
- ☛ Ao meu amigo Alan, que me ajudou a coletar folhas, que me fez rir muitas vezes quando eu queria chorar.
- ☛ À amiga Francislene que sempre quer trocar idéias, bolar experimentos e ajudar seus amigos. Você é especial.
- ☛ As amigas Dayane e Carol.
- ☛ Aos colegas Gilvan, Poliana, André, Luís Antonio, Fábio Lucas, Johara, Márcio, Luís Henrique, Luís Fernando e Rodrigo.
- ☛ Aos funcionários do Instituto: Marlene, Tianinha, Gerson, Sr. Vilmar, Dona Nen-zinha e Cleuber.
- ☛ Àqueles que sempre duvidaram da minha capacidade. Vocês me ajudaram muito, despertando em mim o desejo de provar o contrário.

Obrigada.

Dedicatória

A DEUS

Que me conhece antes da minha formação
Que me dá animo para enfrentar todas as lutas
Que me dá força para levantar mesmo depois das quedas e derrotas
Que misericordiosamente me concedeu e tem concedido muito mais vitórias.

Aos meus pais

Vocês que sempre foram e permaneceram sendo meu referencial, meu porto seguro e meu ponto de partida.
Mãe você é fantástica!

Ao meu paciente amor

Obrigada pela eterna disponibilidade, pela cumplicidade, pela amizade, pelo amor e pela paciência. As palavras não podem dizer, mas você Ricardo foi o melhor presente que Deus me deu.

Sumário

1	Introdução	1
2	Objetivo	8
3	Materiais e métodos	10
3.1	Peçonha Bruta	11
3.2	Reagentes	11
3.3	Animais para testes	11
3.4	Preparação da peçonha	11
3.5	Dosagem de proteínas	11
3.6	Preparação do Extrato Vegetal (EV)	12
3.7	Atividades enzimáticas	12
3.7.1	Atividade Coagulante	12
3.7.2	Atividade Fibrinogenolítica	12
3.7.3	Atividade Fosfolipásica A_2	13
3.8	Atividades biológicas	13
3.8.1	Atividade Hemorrágica	13
3.8.2	Atividade Miotóxica	14
3.8.3	Fixação e Processamento do material para microscopia de luz	14
3.9	Análises Estatísticas	15
4	Resultados	16
4.1	Atividades enzimáticas	17
4.1.1	Atividade Coagulante	17
4.1.2	Atividade Fibrinogenolítica	18
4.1.3	Atividade Fosfolipásica A_2	18

4.2	Atividades Biológicas	19
4.2.1	Atividade Hemorrágica	19
4.2.2	Atividade Miotóxica	22
4.2.3	Neutralização da atividade miotóxica avaliada pela análise das alterações teciduais por microscopia de luz	24
5	Discussão	26
6	Referências Bibliográficas	32

Lista de Figuras

1	Inibição da atividade coagulante da peçonha bruta de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato vegetal aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	17
2	Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato vegetal aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	18
3	Inibição da atividade fosfolipásica A_2 da peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato vegetal aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	19
4	Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato vegetal aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	20
5	Neutralização da atividade hemorrágica da peçonha bruta de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato vegetal aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	21
6	Neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato vegetal aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	23
7	Fotomicrografia de músculos gastrocnêmios injetados com 25 μg da peçonha bruta	25

Lista de Abreviaturas

DMH	dose mínima hemorrágica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EV	extrato aquoso vegetal
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PB	peçonha bruta
<i>PLA</i> ₂	fosfolipase <i>A</i> ₂ (E.C.3.1.1.4)
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N',-tetrametil etilenodiamina
TRIS	tris hidroximetilaminometano
PBS	tampão fosfato de sódio

Resumo

Durante séculos pessoas tem usado plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças. *Schizolobium parahyba* conhecida popularmente por faveira é da família das Leguminosas (Caesalpinoideae), originária da Mata Atlântica, porém propagou-se até o cerrado mineiro e vem sendo usada para neutralizar os efeitos lesivos das peçonhas de serpentes por moradores desta região. Longo tem sido o caminho na busca de um antídoto seguro contra venenos animais, em especial aqueles de natureza ofídica. Este trabalho teve como objetivos avaliar a capacidade do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* em inibir os principais efeitos enzimáticos e biológicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A atividade coagulante foi inibida nas duas razões testadas (1:10 e 1:50 (m/m, peçonha:extrato)). A atividade fibrinogenolítica foi melhor inibida na razão de 1:50 (m/m, peçonha:extrato) protegendo a cadeia $B\beta$, porém o extrato vegetal foi capaz de reagir com o fibrinogênio e provocar o "desaparecimento" das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$. A atividade PLA_2 não apresentou inibição estatisticamente significativa. As atividades biológicas foram feitas usando três condições: A) pré-incubando a peçonha bruta com o extrato vegetal por 30 minutos a 37 °C; B) injetando o extrato vegetal 15 minutos antes da injeção da peçonha bruta; C) injetando o extrato vegetal 15 minutos após a injeção da peçonha bruta. Para todos os tratamentos foi utilizada a razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato). A atividade hemorrágica foi completamente inibida quando ensaiada na razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato) na condição de incubação por 30 minutos a 37 °C. A atividade miotóxica foi quantificada pela dosagem de creatina cinase e foi melhor inibida também na condição de incubação por 30 minutos a 37 °C na razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato). Esses resultados foram confirmados pela microscopia de luz de cortes dos músculos injetados. Em nosso trabalho nós demonstramos que o extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* foi efetivo em inibir as atividades coagulante, fibrinogenolítica, hemorrágica e miotóxica induzidas pela peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A investigação de novos inibidores de peçonhas de serpentes pode ser útil para a elucidação do mecanismo de ação de toxinas purificadas. Além do mais, estes inibidores podem ser utilizados como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos em acidentes ofídicos.

Resumo

Durante séculos pessoas tem usado plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças. *Schizolobium parahyba* conhecida popularmente por faveira é da família das Leguminosas (Caesalpinoideae), originária da Mata Atlântica, porém propagou-se até o cerrado mineiro e vem sendo usada para neutralizar os efeitos lesivos das peçonhas de serpentes por moradores desta região. Longo tem sido o caminho na busca de um antídoto seguro contra venenos animais, em especial aqueles de natureza ofídica. Este trabalho teve como objetivos avaliar a capacidade do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* em inibir os principais efeitos enzimáticos e biológicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A atividade coagulante foi inibida nas duas razões testadas (1:10 e 1:50 (m/m, peçonha:extrato)). A atividade fibrinogenolítica foi melhor inibida na razão de 1:50 (m/m, peçonha:extrato) protegendo a cadeia $B\beta$, porém o extrato vegetal foi capaz de reagir com o fibrinogênio e provocar o "desaparecimento" das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$. A atividade PLA_2 não apresentou inibição estatisticamente significativa. As atividades biológicas foram feitas usando três condições: A) pré-incubando a peçonha bruta com o extrato vegetal por 30 minutos a 37 °C; B) injetando o extrato vegetal 15 minutos antes da injeção da peçonha bruta; C) injetando o extrato vegetal 15 minutos após a injeção da peçonha bruta. Para todos os tratamentos foi utilizada a razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato). A atividade hemorrágica foi completamente inibida quando ensaiada na razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato) na condição de incubação por 30 minutos a 37 °C. A atividade miotóxica foi quantificada pela dosagem de creatina cinase e foi melhor inibida também na condição de incubação por 30 minutos a 37 °C na razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato). Esses resultados foram confirmados pela microscopia de luz de cortes dos músculos injetados. Em nosso trabalho nós demonstramos que o extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* foi efetivo em inibir as atividades coagulante, fibrinogenolítica, hemorrágica e miotóxica induzidas pela peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A investigação de novos inibidores de peçonhas de serpentes pode ser útil para a elucidação do mecanismo de ação de toxinas purificadas. Além do mais, estes inibidores podem ser utilizados como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos em acidentes ofídicos.

1 Introdução

Durante séculos pessoas têm usado plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças, registros escritos de plantas medicinais datam de no mínimo 500 anos atrás com os Sumérios^[1].

A forte ligação entre plantas e a saúde humana começou a se desenrolar em 1897, quando Fredrich Bayer e Co. introduziram o ácido acetil salicílico (Aspirina) no mundo. A aspirina é um sintético análogo ao ácido salicílico, que é um composto ativo obtido da casca do salgueiro, usado como remédio para dores e febre^[2].

O tratamento alternativo com uso de plantas medicinais é bastante estudado, visto que aproximadamente 25% de todas as drogas prescritas são de origem vegetal^[3].

Como exemplo de medicamentos sintéticos que apresentam substâncias derivadas de plantas podem se citar os antimaláricos (quininos), antiamebianos (ipeca), analgésicos (morfina, aspirina) e anticoagulantes (dicumarol)^[4]. Historicamente plantas medicinais sempre foram objeto de estudos, criando um ramo da farmacologia chamado de farmacognosia, que se ocupa dos estudos voltados para examinar e caracterizar drogas ou bases medicamentosas de origem vegetal^[5].

Por estarem presentes na natureza em abundância o estudo de extratos vegetais tem se difundido cada vez mais, buscando investigar a sua segurança (toxicidade e dose efetiva), sua eficiência e constância de atividade, bem como identificação e isolamento do princípio ativo, determinação de sua estrutura e a possibilidade de síntese e modificações desse princípio.

Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases encontrados em seus órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos. A maioria desses inibidores são moléculas pequenas, estáveis, abundantes e podem também estar envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas ou patógenos^[6].

O metabolismo das plantas pode ser dividido didaticamente em primário e secundário. No metabolismo primário são produzidas substâncias como lipídios, proteínas, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos que estão relacionados com o crescimento e desenvolvimento do vegetal. No metabolismo secundário são produzidas substâncias que tem função de proteger contra pragas e doenças e também atrair polinizadores^[7].

Existem alguns fatores que afetam o teor dos princípios ativos como por exemplo: altitude, temperatura, incidência de luz solar, umidade e qualidade do solo^[7].

MARTINS et al. (1995)^[8] citam que dentre os fatores que podem interferir na composição química de uma planta, a nutrição é o que merece maior destaque, sendo que a deficiência ou excesso de nutrientes pode levar a maior ou menor produção de princípios ativos por uma planta.

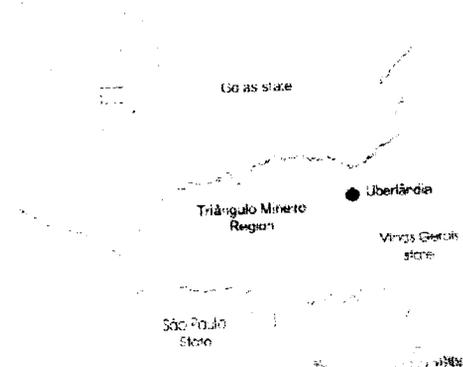
Uma alternativa à soroterapia para neutralizar os efeitos lesivos das peçonhas é a busca na flora medicinal de princípios ativos de plantas, que muitas vezes a população leiga de uma região já utiliza, uma vez que esses conhecimentos são transmitidos pelas gerações ao longo dos anos, como crendices e, até mesmo, em rituais. Assim a comunidade científica tem se empenhado na tentativa de comprovar esses efeitos.

Muitas plantas já foram estudadas quanto à atividade antiofídica tais como: *Eclipta prostrata* (erva botão), que apresentou proteção contra quatro doses letais da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*^[9]; *Curcuma longa* (açafrão); que neutraliza uma neurotoxina purificada da peçonha de *Naja naja siamesis*^[10]; *Hibiscus esculentus* (quiabo), que apresentou eficácia do extrato aquoso obtido das sementes frescas ou secas do quiabo na inibição da peçonha de *Bothrops jararaca*^[11] e o óleo essencial de *Casearia sylvestris* (guaçatonga), que inibiu significativamente o edema e a permeabilidade vascular induzidos pela peçonha de *Bothrops alternatus*^[12]. Posteriormente, BORGES et al. (2000)^[13] com a mesma planta ratificou o potencial antiofídico quanto à inibição de peçonhas brutas e miotoxinas de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacuçu* ainda IZIDORO et al. (2003)^[14] conseguiram neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi* e uma de suas metalproteases isoladas, a neuwiedase, pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*.

Há atualmente cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil estão representadas 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies correspondendo a 10% do total de espécies conhecidas^[15].

Dos acidentes ofídicos ocorridos no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993 foram notificados 81.611 acidentes ofídicos no Brasil, ou seja, em média 20.000 casos por ano, sendo que a maioria dos acidentes notificados foram nas regiões sul e sudeste. A maioria dos acidentes ofídicos são provocados por serpentes do gênero *Bothrops* (73%) e os indivíduos acometidos eram em sua maioria homens (70%) entre 15 e 49 anos (52,35%) picados nas pernas ou pés (70,8%) sendo que a letalidade dos acidentes ofídicos com serpentes do gênero *Bothrops* é de 0,39% e com o gênero *Crotalus* é de 1,48%^[16].

Dados mais recentes confirmam os números coletados de 1990 a 1993. Como se pode ver num estudo de epidemiologia dos acidentes ofídicos na região central do Brasil como mostrado na figura extraída do artigo de Da SILVA et al. (2003)^[17], de 1993 a 1995 quando foram notificados 90 casos de acidentes com serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* sendo que 68% desses acidentes ocorreram de outubro a março, entre às 6 e 12 horas (93%) e 89% das vítimas eram do sexo masculino, entre 20 e 30 anos (27%)^[17].



No período de janeiro de 1998 a dezembro de 2000 foram notificados à Secretaria de Saúde do estado de Goiás 3261 casos de acidentes ofídicos sendo 78% dos casos com serpentes do gênero *Bothrops*, 20,8% com serpentes do gênero *Crotalus* e 6% com serpentes do gênero *Micrurus*. A maioria das incidências de acidentes ocorreu de outubro a abril sendo que as vítimas em sua maioria eram do sexo masculino (78,5%) entre 20 e 30 anos. A letalidade dos acidentes botrópicos foi de 0,5% , já os acidentes crotálicos tiveram letalidade de 1%^[18].

O ofidismo constitui um problema de saúde pública e também um problema de ordem econômica no Triângulo Mineiro, onde a pecuária é um ramo de destaque já que freqüentemente gado bovino e eqüino são picados e muitas vezes morrem acarretando prejuízos.

Os principais gêneros responsáveis pelos acidentes ofídios no Brasil são as serpentes botrópicas, denominadas popularmente jararacas e as crotálicas, que são as cascavéis; sendo as primeiras distribuídas em todo território nacional^[19]. O gênero *Bothrops* contem mais de 30 espécies e subespécies que estão distribuídas do sul do México até a Argentina e em algumas ilhas do Caribe^[20]. No gênero *Bothrops* as espécies *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jaracussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedis* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos do Brasil^[21].

As serpentes botrópicas habitam ambientes úmidos como matas, possuem hábitos noturnos, são muito agressivas e se ameaçadas atacam em silêncio. No Triângulo Mineiro, no período de 1984 a 1991, os acidentes ofídicos confirmados foram causados principalmente por serpentes das espécies: *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*^[22].

Bothrops neuwiedi conhecida popularmente por jararaca do rabo branco ou jararaca pintada trata se na verdade de um complexo de espécies que era tradicionalmente tratado como uma única espécie com 12 subespécies. *Bothrops neuwiedi* reúne agora as antigas subespécies *Bothrops neuwiedi goyazensis*, *Bothrops neuwiedi meridionalis*, *Bothrops neuwiedi paranaensis*, *Bothrops neuwiedi urutu*, *Bothrops neuwiedi diporos*, *Bothrops neuwiedi lutzi*, *Bothrops neuwiedi matogrossensis*, *Bothrops neuwiedi pauloensis*, *Bothrops inglesiasi*, *Bothrops pubescens* e *Bothrops sp* (marmorado). São serpentes de pequeno a médio porte dificilmente ultrapassando um metro de comprimento, apresentam grande agilidade e são muito agressivas^[23].

As peçonhas de serpente são provavelmente as mais complexas de todas as peçonhas animais. Cerca de 90 a 95% de seu peso seco é constituído por proteínas compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas, podendo exercer diferentes atividades farmacológicas^[24]. Essas proteínas são responsáveis pelos efeitos do envenenamento, como a miotoxicidade, distúrbio na coagulação sangüínea e edema, proteínas essas que têm sido amplamente estudadas a fim de reconhecer suas ações.

1 Introdução

Para uma mesma espécie a composição da peçonha pode variar principalmente em função de três fatores:

1. Idade do animal: serpentes jovens apresentam maior atividade procoagulante^[25];
2. Distribuição geográfica: serpentes de uma mesma espécie coletadas em regiões diferentes tem diferenças nas atividades de suas peçonhas^[26];
3. Caráter individual: serpentes de mesma espécie, idade e procedência tem diferenças na intensidade das atividades farmacológicas que variam de acordo com a dieta do animal^[25].

As toxinas das peçonhas ofídicas inicialmente surgiram como secreções salivares que tinham por função lubrificar os alimentos e higienizar os dentes. Ao longo da evolução esta secreção foi acrescida de proteínas e enzimas tóxicas que passaram a ter função de paralisar e matar a presa^[27].

Apesar de serem raros os acidentes fatais por serpentes botrópicas, os casos se agravam muito devido à intensidade dos efeitos locais principalmente dor, edema, necrose do tecido muscular e hemorragia local. O edema é caracterizado pela saída do plasma e infiltração celular, envolvendo a participação de mediadores endógenos (eicosanóides), ativação do fator de agregação plaquetária, liberação de histamina e serotonina^[28]. A necrose local afeta a pele e as camadas musculares mais profundas e nos casos mais severos pode haver a completa destruição do tecido^[29]. São observados outros efeitos locais proeminentes tais como: dor, edemas, bolhas hemorrágicas^[30], esses efeitos são produzidos principalmente pela ação das enzimas fosfolipase A_2 (PLA_2), uma das toxinas mais abundantes das peçonhas de serpentes^[31].

Na peçonha existem ainda outras enzimas fosfolipases (A_1 , C , D) que agem em diferentes posições do substrato, liberando diferentes produtos. A fosfolipase A_2 (PLA_2) ocorre também em artrópodes e no suco pancreático^[32]. Esta enzima apresenta importante papel no catabolismo dos lipídios da dieta e no metabolismo geral de lipídios estruturais de membrana. São enzimas hidrolíticas que clivam fosfolipídios, hidrolisando a ligação acil na posição 2 do fosfoglicerídio^[33], liberando como produto final o ácido graxo, que pode ser o ácido araquidônico e lisofosfatídeos. Todas as PLA_2 são enzimas de baixo peso molecular com estrutura terciária rígida devido a presença de 5 a 8 pontes dissulfeto^[34] conferindo a estas enzimas grande estabilidade.

As fosfolipase A_2 miotóxicas das peçonhas botrópicas podem ser divididas em duas classes: as que apresentam atividade enzimática sobre substratos artificiais que são as Asp_{49} e aquelas que não tem atividade catalítica que são as Lys_{49} ^[35].

Mionecrose ou necrose muscular é uma característica comum de envenenamento por espécies botrópicas. Segundo MEBS & OWNBY (1990)^[36], miotoxidade é definida como

uma ação específica da peçonha no músculo esquelético, afetando somente fibras musculares, sendo que outros tecidos como tecido conjuntivo, nervos e vasos permanecem essencialmente intactos. Este efeito pode ser devido à ação direta de miotoxinas sobre as membranas plasmáticas de células musculares ou por uma ação indireta, causada por hemorraginas, que provocariam danos vasculares, levando à depleção do sangue que suprime as células musculares, induzindo isquemia e, conseqüentemente, morte celular. Em ambos os casos as miofibrilas são drasticamente afetadas como uma conseqüência da ação da peçonha.

As metaloproteases constituem outra importante classe de proteínas, diretamente relacionadas com o quadro clínico característico do envenenamento botrópico. São enzimas extremamente versáteis, exibindo grande diversidade estrutural e funcional^[37].

As metaloproteases são classicamente conhecidas por toxinas hemorrágicas embora existam inúmeras exceções quanto à atividade hemorrágica^[38], RODRIGUES et al. (2000)^[39] purificaram a neuwiedase, uma metaloprotease da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, com atividade fibrinogenolítica e não hemorrágica. São sintetizadas nas glândulas de peçonha em forma de zimogênio que contem uma seqüência de aminoácidos que é perdida após um processamento proteolítico, resultando na ativação destas enzimas^[40]

As hemorraginas causam hemorragia local devido a pequenas lesões nas paredes dos vasos sangüíneos^[41]. Uma vez lesionado o endotélio deixa exposto o subendotélio onde estão as proteínas adesivas, fator de von Willebrand e colágeno que se ligam aos receptores da plaquetas que são glicoproteínas, desencadeando a agregação plaquetária^[42]

Na hemostasia a trombina é uma enzima muito importante, pois apresenta a capacidade de formação e estabilização de coágulos de fibrina hidrolisando as cadeias do fibrinogênio pela remoção de pequenos fragmentos conhecidos como fibrinopeptídeos A e B, ^[43]. O sistema de coagulação sangüíneo é baseado em 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 varias interações do sistema de coagulação^[44].

Outra classe de proteínas presentes nas peçonhas de serpentes são as toxinas coagulantes conhecidas como "Thrombin-like", que são serinoproteases capazes de fazer a ativação dos fatores X e V e com ação semelhante à da trombina, ocasionando o consumo de fibrinogênio, a formação da rede de fibrina^[45] e formação do coágulo de fibrina, atuando na fase final do processo de coagulação sangüínea. Têm a capacidade de interferir em diversos pontos da cascata de coagulação sangüínea.

Estas enzimas, "Thrombin-like", têm aplicação terapêutica na prevenção e tratamento de distúrbios trombóticos bem como na produção de cola de fibrina, que é um adesivo biológico, sendo utilizado para aumentar o poder de cicatrização em suturas^[46].

Quando administradas “in vivo” causam efeito desfibrinogente, tornando o sangue incoagulável por depletar o estoque de fibrinogênio plasmático, sendo utilizadas na medicina como agente antitrombótico, podendo até mesmo desfazer coágulos. Quando ensaiadas “in vitro” apresentam ação procoagulante^[47].

Atualmente a soroterapia tem sido o caminho mais usado para reverter os efeitos danosos de acidente ofídicos, entretanto a eficiência dessa terapia esta relacionada além de outros fatores, diretamente com o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento e a quantidade de peçonha inoculada^[48]. Como os efeitos locais ocorrem muito rapidamente, geralmente não são revertidos pela soroterapia^[42].

Longo tem sido o caminho na busca de um antídoto seguro contra venenos animais, em especial aqueles de natureza ofídica. O uso de antivenenos — os soros — está vinculado a existência de serviços formais de saúde, e seu emprego permanece restrito às regiões de maior desenvolvimento socioeconômico, onde existem sistemas de atenção médica estruturados. Assim as populações de localidades remotas se vêem compelidas a buscar alternativas terapêuticas para este tipo de agravo, geralmente no campo da fitoterapia.

No interior do Ceará é comercializado há mais de 20 anos um fitoterápico de nome “Específico Pessoa” que tem como base um tubérculo conhecido como “cabeça de negro”. Outros exemplos de fitoterápicos são o “Pau-X” usado no interior do Pará; “composto P. Esser” produzido em Santa Catarina e também o “kutelak” vendido no litoral norte de São Paulo.

O fato de estarem hoje sendo comercializados no Brasil vários produtos antiofídicos — a maioria dos quais de origem vegetal — representa forte indício da existência de demanda importante para esta “opção terapêutica”^[15].

Moradores da zona rural de Araguari no estado de Minas Gerais, utilizam chá e infusão das sementes de *Schizolobium parahyba* para inibir as ações das peçonhas de serpentes.

Schizolobium parahyba conhecida popularmente por faveira pertence a família das Leguminosas (Caesalpinoideae), originária da Mata Atlântica, porém propagou-se até o cerrado mineiro. Dois de seus princípios ativos de composição protéica, já foram estudados, são inibidores protéicos do tipo kunitz um inibidor de tripsina e outro inibidor de quimotripsina, isolados a partir das sementes desta planta^[49, 50, 51].

Assim este trabalho deverá contribuir apresentando resultados que podem validar cientificamente a utilização deste extrato na neutralização de peçonhas ofídicas.

2 *Objetivo*

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* em inibir os principais efeitos enzimáticos e biológicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

3 Materiais e métodos

3.1 Peçonha Bruta

A peçonha bruta da serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis* (PB) utilizada neste trabalho foi doada pela Prof. *Dr.^a* Vera Lúcia de Campos Brites coordenadora do setor de répteis da Universidade Federal de Uberlândia e pela Pentapharm do Brasil.

3.2 Reagentes

Fibrinogênio bovino, β -mercaptoetanol, glicina, EDTA, acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, Coomassie Brilliant blue R-250, persulfato de amônio, todos da Sigma Chem. Co. kit CK Bioclin. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3 Animais para testes

Foram utilizados camundongos da raça Swiss machos (18 a 30 g) fornecidos pela Pentapharm do Brasil e mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia.

3.4 Preparação da peçonha

Cerca de 10 mg da peçonha liofilizada eram pesados e ressuspensos em 1000 μl de salina e centrifugados a 4000 g a 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante era então transferido para um eppendorf e etiquetado, obtendo-se assim a peçonha bruta (PB), que era dosada em seguida.

3.5 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método descrito por BRADFORD (1976)^[52]. O reagente de trabalho foi preparado utilizando-se Coomassie G (100 mg), etanol (50 ml) e ácido fosfórico 85% (100 ml) completando para 1 l com água deionizada. As dosagens de proteínas eram realizadas misturando-se 3 ml deste reagente e soluções contendo cerca de 3 a 30 μg de proteínas e posteriormente realizavam-se as leituras de absorbância a 595 nm feitas em espectrofotômetro da marca Pharmacia Biotech. Os valores obtidos eram lançados na equação da reta obtida previamente com dosagens de soroalbumina bovina 1 mg/ml, por meio de regressão linear.

3.6 Preparação do Extrato Vegetal (EV)

As folhas de *Schizolobium parahyba* foram coletadas de uma árvore adulta no município de Araguari, estado de Minas Gerais, no mês de agosto de 2004. Foram lavadas e trituradas em água deionizada usando a razão de uma parte de água para duas partes de folhas. Em seguida o material foi filtrado e centrifugado a 2000 g por 20 minutos. O sobrenadante então foi congelado, liofilizado e estocado a -20°C .

3.7 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram realizadas usando peçonha bruta como controle positivo, peçonha bruta incubada com o extrato vegetal nas razões de 1:10 ou 1:50 (m/m, peçonha:extrato) e extrato vegetal como controle negativo. A incubação da peçonha com o extrato vegetal foi feita por 30 minutos a 37°C .

3.7.1 Atividade Coagulante

A atividade coagulante da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* ($10\ \mu\text{g}$) foi realizada segundo ASSAKURA et al. (1992)^[53] com o aparelho coagulômetro Quick Timer (DRAKE LTDA) que determina o tempo de coagulação de uma amostra de plasma bovino citrado ($140\ \mu\ell$), até um tempo máximo de 120 segundos, utilizando um sistema óptico que detecta a variação brusca da densidade óptica da amostra no instante da coagulação (devido a formação do coágulo de fibrina); ou seja, sobre $100\ \mu\ell$ de plasma bovino citrado (substrato), adicionando a este $40\ \mu\ell$ de amostra teste. Assim que os $40\ \mu\ell$ eram adicionados ao plasma o cronômetro do aparelho era acionado registrando o tempo (em segundos) necessário para a formação da rede de fibrina. Os tempos obtidos foram comparados ao controle positivo apenas com a peçonha para verificar se houve ou não inibição da atividade coagulante.

3.7.2 Atividade Fibrinogenolítica

Usando o método de EDIGAR & PRENTICE (1973)^[54] as amostras testes foram preparadas usando $10\ \mu\text{g}$ da peçonha bruta, e em seguida foram incubadas com o extrato vegetal nas razões testadas. Após a incubação a cada amostra foram acrescentados $50\ \mu\ell$ de uma solução de fibrinogênio (FIB) em salina ($1,5\ \text{mg}/\text{m}\ell$) e novamente foi feita incubação a 37°C por uma hora. A reação foi interrompida por adição de $25\ \mu\ell$ de STOP (solução de Tris-HCl $0,06\ \text{M}$ pH 6,8 contendo glicerol a 10% e azul de Bromofenol a 0,001%) e $10\ \mu\ell$ de β -Mercaptoetanol equivalente a 10% do volume da amostra mais o STOP. Em seguida, todo esse conjunto foi aquecido a 100°C em banho-maria por 5 minu-

tos, sendo retirados de 10 a 20 $\mu\ell$ que eram aplicados em gel de poliacrilamida a 14% com agente desnaturante (PAGE SDS). O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025 M, pH 8,2, SDS a 0,1% e glicina 0,192 M. A eletroforese foi realizada a 600 V e corrente de 20 mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. As proteínas foram fixadas com metanol 50% e ácido acético 5% durante 15 a 20 minutos e coradas por aproximadamente uma hora numa solução de 0,2% (m/v) de Coomassie Blue R-250 em água e metanol 50% na proporção de 1:1 (v/v). O gel foi descorado numa solução contendo ácido acético a 10% e etanol a 30% (v/v).

3.7.3 Atividade Fosfolipásica A_2

A atividade fosfolipásica A_2 foi realizada pelo método potenciométrico descrito por DE HAAS et al. (1968)^[55], que usa como substrato gema de ovo, que é rica em fosfolipídios. Foi feita uma emulsão usando-se uma gema de ovo de galinha em 50 ml de água desionizada, da qual foram retirados 15 ml e acrescentados 10 ml de desoxicolato de sódio 0,03 M e 1 ml de $CaCl_2$ a 0,6 M e completado o volume final para 100 ml com água deionizada. Foram utilizados para cada ensaio 10 ml desta emulsão. As fosfolipases A_2 hidrolisam fosfolipídios contidos na solução liberando ácidos graxos que são titulados com solução de $NaOH$ padrão (0,1208 N), em pH 8,0 e temperatura ambiente (28 °C). A atividade PLA_2 específica foi realizada utilizando-se 10 μg de peçonha bruta e calculada pela quantidade de microequivalentes de base consumida por minuto por mg de proteína ($\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{mg}$) nas condições acima descritas. Foram feitos os controles positivo e negativo e ainda os testes de inibição nas duas razões testadas.

3.8 Atividades biológicas

A capacidade de neutralização do extrato de *Schizolobium parahyba* em inibir as atividades biológicas foi testada em três diferentes condições: A) *Incubação*: incubando a peçonha bruta com o extrato vegetal por 30 minutos a 37 °C; B) *Pré-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos antes da injeção da peçonha bruta; C) *Pós-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos após a injeção da peçonha bruta. Para todos os tratamentos foi utilizada a razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato)

3.8.1 Atividade Hemorrágica

Esta atividade foi realizada segundo NIKAI et al. (1984)^[56] com algumas modificações. Foram utilizados camundongos machos da raça Swiss divididos em grupos de 4 animais (n=4). Os animais controles negativos receberam injeção intradérmica no dorso previamente depilado de 50 $\mu\ell$ de PBS ou de 160 μg de (EV) os outros grupos receberam

doses da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* que corresponderam a 2 DMH (Dose mínima hemorrágica = 8,13 µg) combinados ou não com o extrato vegetal. Após 3 horas de inoculação, os animais foram sacrificados, as peles removidas e a presença de halos hemorrágicos na superfície interna da pele foi indicativo de atividade hemorrágica positiva.

3.8.2 Atividade Miotóxica

Grupos de 04 camundongos Swiss machos (18 – 22 g) foram injetados intramuscularmente no músculo gastrocnemius direito com doses de 25 µg de peçonha bruta em 50 µl de PBS combinados ou não com o extrato vegetal. Os animais controles negativo receberam injeção de 50 µl de PBS ou de 250 µg de extrato vegetal. Três horas depois os camundongos foram sacrificados e sangrados por punção cardíaca, coletando-se o sangue em eppendorfs contendo solução de citrato a 0,105 M e imediatamente centrifugados. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se 4 µl de plasma pelo kit CK-UV cinético Bioclin. O princípio deste método consiste nas seguintes reações:

1. Na reação entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP), catalisada pela enzima creatina cinase, formam-se a creatina e a adenosina trifosfato (ATP);
2. o ATP formado é utilizado para fosforilar a glicose, produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P) na presença da hexocinase;
3. a seguir a G-6-P é oxidada a 6-fosfogluconato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato(NADP), esta reação é catalisada pela glicose-6- fosfato desidrogenase;
4. durante esta oxidação uma quantidade equimolar de NADP é reduzido a NADPH aumentando a absorbância em 340 nm.

A variação em absorbância é diretamente proporcional a atividade da enzima creatina cinase. O procedimento deste método consiste em incubar 4 µl do plasma citratado com 1,0 ml de reativo dissolvido em água destilada por 3 min a 37 °C e realizar leituras a 340 nm nos intervalos 0 a 3 minutos. A atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro, constituindo uma unidade o resultado da fosforilação de um nanomol de creatina por minuto a 25 °C.

3.8.3 Fixação e Processamento do material para microscopia de luz

Grupos de 04 camundongos foram injetados intramuscularmente no músculo gastrocnemius direito com doses de 25 µg da peçonha bruta em 50 µl de PBS combinados ou não com o extrato vegetal. Os animais controles negativos receberam injeção somente de

50 $\mu\ell$ de PBS ou de 250 μg de extrato vegetal. Após 24 horas de inoculação os animais foram sacrificados. Os músculos atingidos foram retirados e fixados com formol a 10% em PBS a 0,1 M e pH 7,2 por 24 horas. Após a fixação seguiu-se a desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (50 – 100%). Em seguida os materiais foram pré-infiltrados em um mistura 1:1 de resina pura 1 (LEICA) e etanol absoluto por 2 horas em temperatura ambiente. Os materiais foram imersos em resina pura (Infiltração) por 24 horas para impregnação da resina. A inclusão dos materiais e blocos se fez pela mistura de 15 ml de resina pura e 1 ml de endurecedor (Derivado de ácido barbitúrico - Dimetil Sulfoxido) em temperatura ambiente. Cortes de 2,5 μm de espessura dos blocos obtidos foram feitos em um micrótomo (LEICA Instruments), aderidos em lâminas de vidro (26x7 mm / 1 – 1,2 mm) e corados com azul de toluidina 0,5%. A montagem das lâminas de vidro se fez com Entellan (MERCK) e lamínula de vidro (24x40 mm), sendo em seguida examinados ao microscópio de luz e posteriormente fotografados.

3.9 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com significância de 0,05 utilizando o programa R language 1.9.1.

4 Resultados

4.1 Atividades enzimáticas

4.1.1 Atividade Coagulante

A peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* induziu a coagulação do plasma bovino em aproximadamente 25 segundos. O extrato vegetal foi ensaiado por 4 minutos e não coagulou o plasma.

O extrato de *Schizolobium parahyba* exerceu um leve efeito no tempo de coagulação, prolongando-o somente em uma pequena extensão quando este foi incubado com o extrato na razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato); no entanto quando a peçonha foi incubada com o extrato na razão de 1:50 (m/m, peçonha:extrato) houve aumento maior no tempo de coagulação como pode ser evidenciado na figura 1.

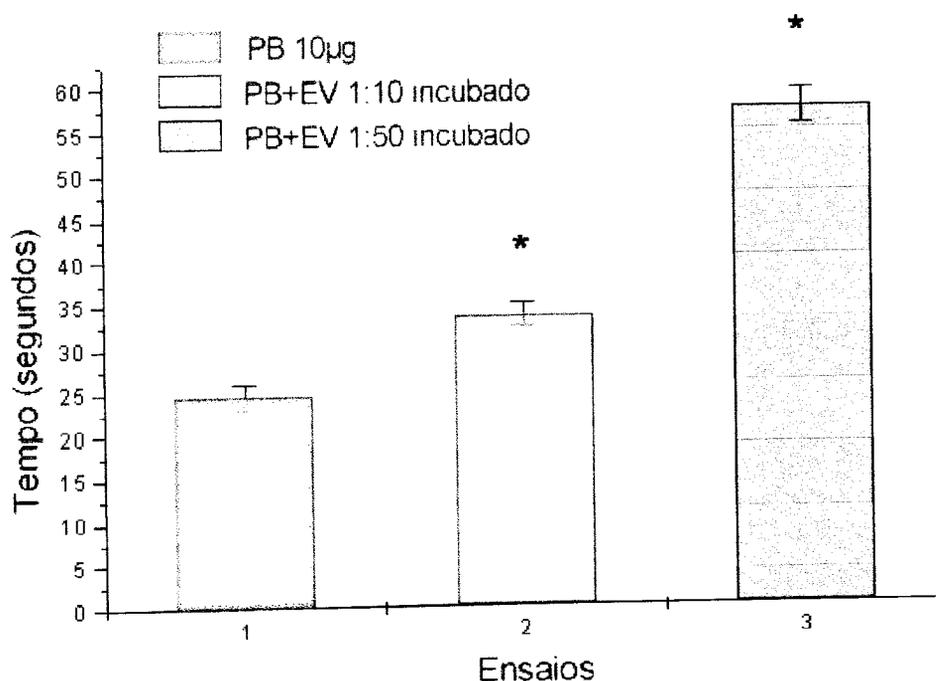


Figura 1: Inibição da atividade coagulante da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre 100 μl de plasma bovino citratado. Os resultados apresentam uma média de 5 experimentos.

* Significância estatística em relação ao controle positivo: (H=7,2 e $P < 0,02732$)

4.1.2 Atividade Fibrinogenolítica

A figura 2 mostra o efeito do extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* sobre a atividade fibrinogenolítica da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

A peçonha bruta causou hidrólise total das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$, (linha 2) o que foi claramente observado pela eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 14%. Na mesma figura pode se observar que houve uma maior proteção da cadeia $B\beta$ do fibrinogênio quando foi utilizada uma razão de 1:50 (m/m, peçonha:extrato) como se vê na linha 4. No entanto quando incubou se apenas o extrato vegetal com o fibrinogênio pode se verificar o desaparecimento da cadeia $A\alpha$ sem o surgimento de produtos de degradação proteolítica do substrato (linha 5).

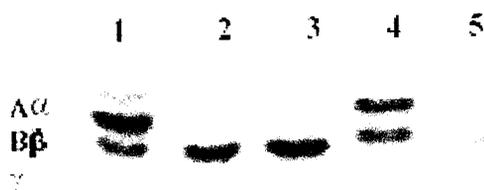


Figura 2: Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal de *Schizolobium parahyba*. 1: Fibrinogênio (Fib)(50 µg), 2: Fib+ PB, 3: Fib+PB+EV (1:10 m/m), 4: Fib+PB+EV (1:50 m/m), 5: Fib+EV (500 µg)

4.1.3 Atividade Fosfolipásica A_2

A atividade PLA_2 da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (10 µg) foi inibida pelo o extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* na razão de 1:50 (m/m, peçonha:extrato) como mostrado na figura 3. Porém a análise estatística dos dados obtidos demonstrou que a inibição da atividade PLA_2 não foi significativa em nenhuma das duas condições testadas em relação ao controle positivo com apenas a peçonha bruta ($H=3,8056$ e $P<0,1492$). O extrato vegetal não apresentou atividade PLA_2 .

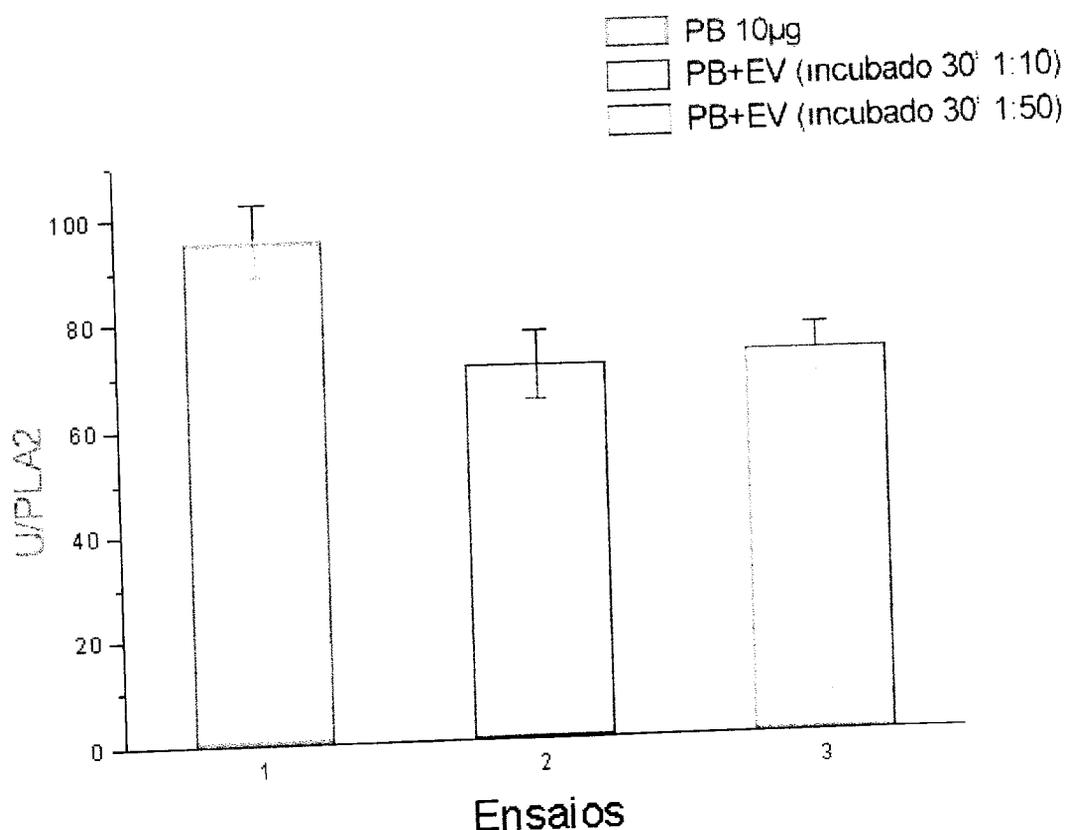


Figura 3: Inibição da atividade fosfolipásica A_2 da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal de *Schizolobium parahyba*. Para esta atividade foi utilizada uma emulsão de gema de ovo, desoxicolato de sódio 0,03 M e cloreto de sódio 0,06 M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH padrão a 0,1208 N durante 3 minutos de reação à temperatura ambiente. Os resultados referem-se à média de 5 ensaios

4.2 Atividades Biológicas

4.2.1 Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi completamente inibida pelo extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* quando este foi incubado com a peçonha por 30 minutos como mostrado nas figuras 4 e 5(D). Nos testes com o extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* o pré-tratamento e o pós-tratamento mostraram significativa inibição da atividade da peçonha (figura 5(D) e 5(E)). Para controle positivo foi utilizado a peçonha bruta não incubada com o extrato vegetal de *Schizolobium parahyba*.

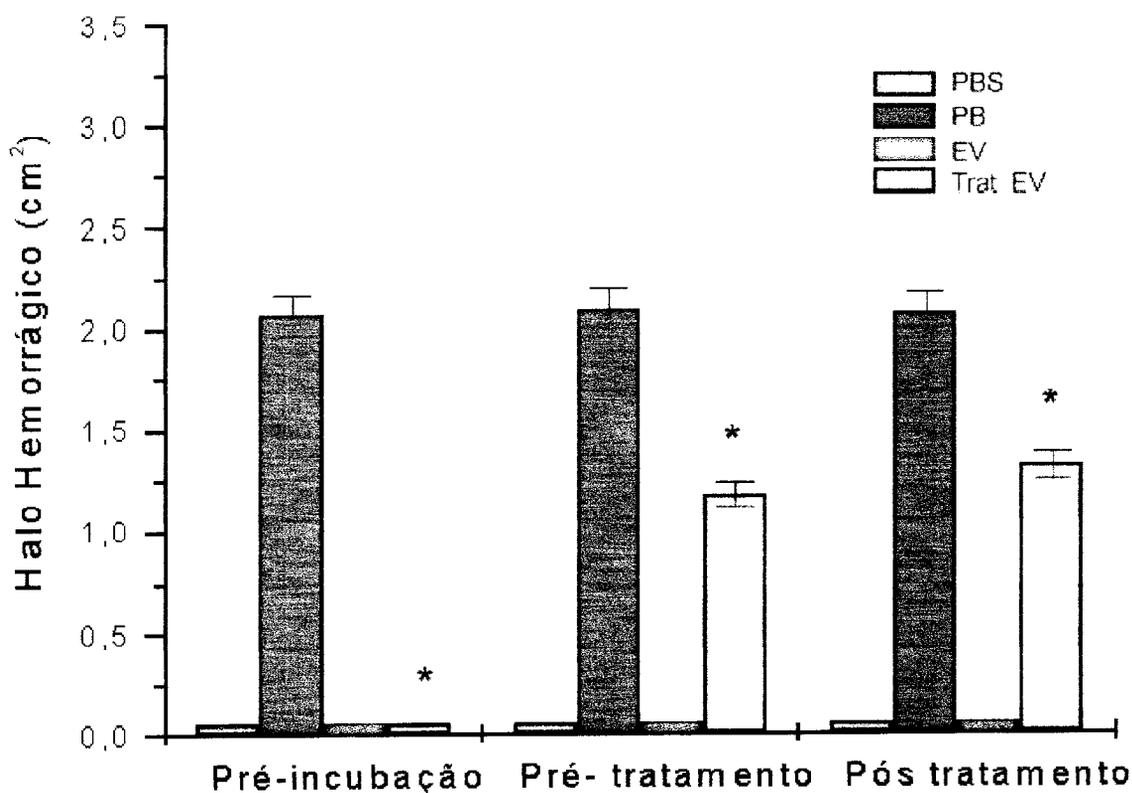


Figura 4: A capacidade de neutralização do extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* em inibir a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta, foi testada em três diferentes condições: A) *Incubação*: incubando a peçonha bruta com o extrato vegetal por 30 minutos a 37 °C; B) *Pré-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos antes da injeção da peçonha bruta; C) *Pós-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos após a injeção da peçonha bruta. Para todos os tratamentos foi utilizada a razão de 1:10 (peçonha bruta: extrato vegetal). Os resultados são apresentados pelo tamanho do halo hemorrágico (cm²). Os resultados foram apresentados pelas médias dos halos hemorrágicos de 5 animais.

* Significância estatística em relação ao controle positivo: (H=24,49 e P<0,0004).

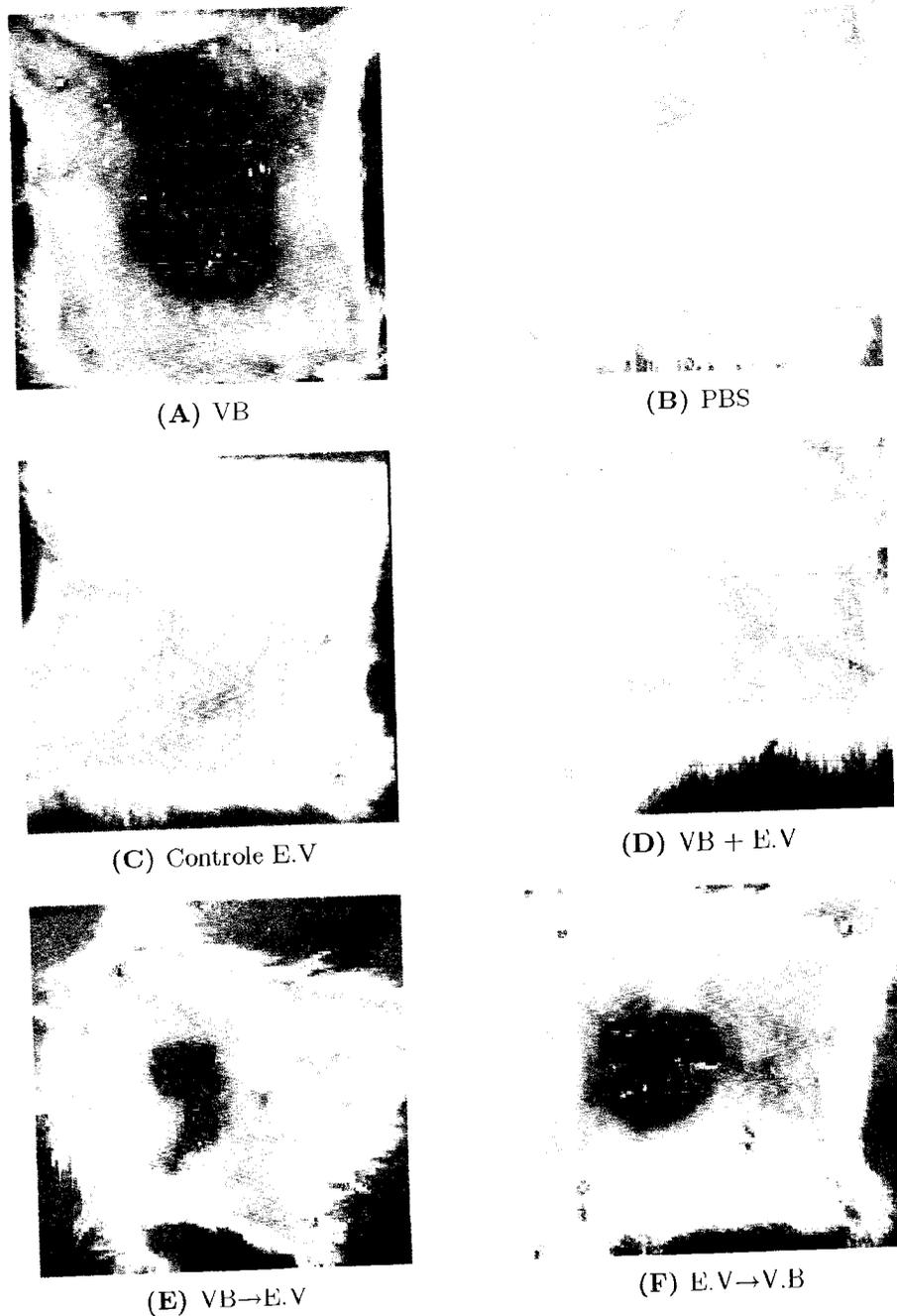


Figura 5: Neutralização do extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta, foi testada em três diferentes condições: A) *Incubação*: incubando a peçonha bruta com o extrato vegetal por 30 minutos a 37 °C (figura 5(D)); B) *Pré-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos antes da injeção da peçonha bruta (figura 5(F)); C) *Pós-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos após a injeção da peçonha bruta (figura 5(E)). Para todos os tratamentos foi utilizada a razão de 1:10 (peçonha bruta: extrato vegetal). Para este teste foram utilizadas concentrações da peçonha bruta que correspondem duas vezes a dose mínima hemorrágica (DMH:8, 13 µg). As amostras foram injetadas intradermicamente no dorso de camundongos e após 3 horas os animais foram sacrificados e a pele retirada para análise. Para controle positivo foi utilizada a peçonha bruta não incubada com o extrato vegetal de *Schizolobium parahyba*.

4.2.2 Atividade Miotóxica

A figura 6 apresenta os resultados de neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* nas 3 diferentes condições de tratamento. Como pode ser observado nesta figura quando a peçonha bruta é incubada com o extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* a inibição é praticamente completa quando comparada com os valores plasmáticos de creatina cinase de animais controles negativo com apenas PBS. Na condição de pós-tratamento o extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* foi capaz de inibir a liberação de creatina cinase significativamente, já no pré-tratamento a inibição da atividade miotóxica pelo extrato vegetal foi menor e não se mostrou significativa quando comparada ao controle positivo com a peçonha bruta. O mesmo resultado foi obtido quando realizamos uma análise morfológica dos tecidos injetados com a peçonha bruta (Figura 7).

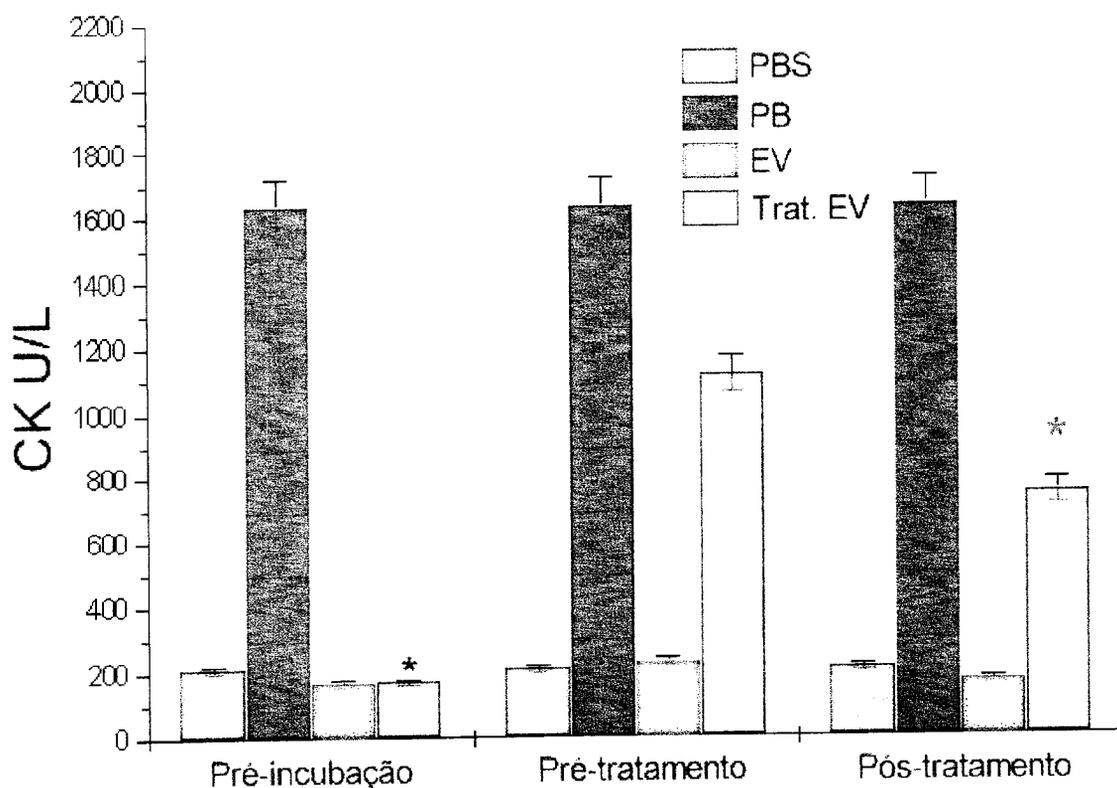


Figura 6: Neutralização da atividade mitotóxica induzida pela peçonha bruta medida através de dosagens dos níveis de creatina cinase (C.K.) plasmática. A capacidade de neutralização do extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* em inibir a mitotoxicidade induzida pela peçonha bruta foi testada em três condições: A) incubando a peçonha bruta com o extrato vegetal por 30 minutos a 37 °C; B) injetando o extrato vegetal 15 minutos antes da injeção da peçonha bruta; C) injetando o extrato vegetal 15 minutos após a injeção da PB. Para todos os tratamentos foi utilizada a razão de 1:10 (peçonha bruta: extrato vegetal) Os resultados são apresentados em unidades/litro. Os resultados foram apresentados pela média mais o desvio padrão (n=4)

* Significância estatística em relação ao controle positivo: (H=12,066 e P<0,0339)

4.2.3 Neutralização da atividade miotóxica avaliada pela análise das alterações teciduais por microscopia de luz

As alterações morfológicas induzidas pela peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre o músculo gastrocnêmio direito de camundongos, após 24 horas de inoculação mostraram de um modo geral fibras com vários graus de destruição (figura 7(A)). Houve também um elevado efeito hemorrágico evidenciado pela presença de um grande número de eritrócitos no espaço inter e intracelular. Nesta figura evidencia-se um elevado infiltrado leucocitário polimorfonuclear. O extrato vegetal foi eficiente em inibir a ação da peçonha bruta quando este foi incubado a 37 °C por 30 minutos (figura 7(D)). No entanto a ação necrosante da peçonha bruta não foi satisfatoriamente inibida quando foram realizadas as duas outras formas de tratamento com o extrato vegetal sobre o tecido muscular (figuras 7(E) e 7(F)). O controle negativo com apenas o extrato vegetal se mostrou incapaz de provocar alterações no tecido muscular (figura 7(C)).

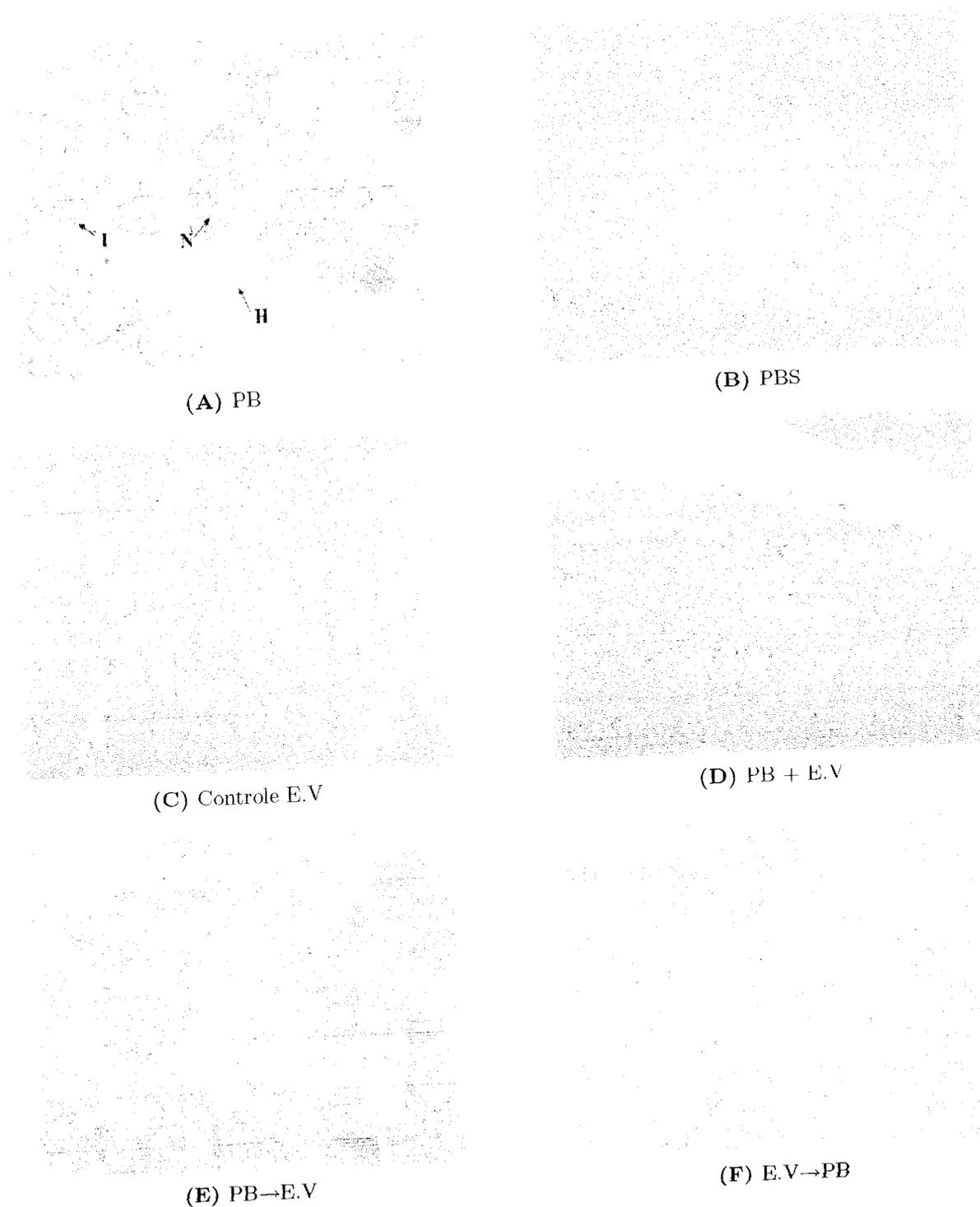


Figura 7: Fotomicrografia de cortes transversais com $2,5 \mu\text{m}$ de espessura do músculo gastrocnêmio injetados com $25 \mu\text{g}$ da peçonha bruta por via intramuscular. A capacidade de neutralização do extrato vegetal de *Schizolobium parahyba* em inibir a miotoxicidade induzida pela peçonha bruta foi testada em três condições: A) *Incubação*: incubando a peçonha bruta com o extrato vegetal por 30 minutos a 37°C (figura 7(D)); B) *Pré-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos antes da injeção da peçonha bruta (figura 7(F)); C) *Pós-tratamento*: injetando o extrato vegetal 15 minutos após a injeção da peçonha bruta (figura 7(E)). Para todos os tratamentos foi utilizada a razão de 1:10 (peçonha bruta: extrato vegetal). A coloração foi feita com azul de toluidina 0,5%. Aumento foi de 260 X. I \rightarrow Infiltração, H \rightarrow Hemorragia, N \rightarrow Necrose

5 *Discussão*

Este trabalho teve como objetivo testar a capacidade inibitória do extrato de *Schizolobium parahyba* sobre as principais atividades enzimáticas e biológicas da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

O tratamento de várias doenças e inclusive de acidentes com serpentes e outros animais ocorre desde os tempos primordiais com extratos, chás, infusões e cataplasmas obtidos de plantas. Apesar de não se conhecer os princípios pelos quais ocorria a cura, os conhecimentos sobre plantas e suas funções foram sendo repassados para gerações seguintes. Novos estudos começaram a surgir na tentativa de comprovar o efeito científico desses extratos, que princípios ativos eles possuem e como estes atuam^[57].

Nossos ensaios mostram que o extrato de *Schizolobium parahyba* foi bastante eficiente em inibir a atividade coagulante da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sendo capaz de dobrar o tempo de coagulação do plasma bovino quando ensaiada na razão de 1:50 (m/m, peçonha:extrato) formando apenas um coágulo frouxo (figura 1). BORGES (1998)^[57] usando *Casearia sylvestris* obteve 38% de inibição da atividade coagulante, já IZIDORO (2001)^[4] usando *Casearia mariquitensis* conseguiu inibir 15% da ação da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, usando a razão de 1:3 sem incubação.

A inibição da atividade proteolítica da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre o fibrinogênio foi avaliada e pode se observar a proteção da cadeia $B\beta$ na razão de 1:50 com incubação da peçonha com o extrato vegetal por 30 minutos (figura 2). No entanto o extrato vegetal causou a “degradação” total da cadeia $A\alpha$ e parcialmente a cadeia $B\beta$ do fibrinogênio quando feito o controle negativo com apenas fibrinogênio e 500 μg do extrato. Freitas (2002)^[58] também observou que utilizando razões crescentes do extrato aquoso de *Casearia grandiflora* havia uma degradação das cadeias do fibrinogênio.

Recentemente, VALE (2004)^[59] demonstrou que o extrato de *Schizolobium parahyba* foi eficiente em inibir a atividade fibrinogenolítica das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops alternatus* na razão de 1:10 (m/m, peçonha:extrato) resultando em uma proteção total da cadeia $B\beta$ e parcial da $A\alpha$ do fibrinogênio. Entretanto neste mesmo trabalho, foi demonstrado que utilizando concentrações crescentes apenas do extrato aquoso, havia um desaparecimento gradual das cadeias do fibrinogênio, sem que houvesse o surgimento concomitante dos produtos de degradação proteolítica do substrato.

VALE (2004)^[59] fracionou o extrato de *Schizolobium parahyba* em resina LH-20 e em sua fração aquosa quando testada na razão de 1:40 (m/m, fibrinogenio:extrato vegetal) promoveu a precipitação das cadeias do fibrinogênio visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes. Acredita se que esta fração seja rica em taninos que suportam a ação do calor do processo de obtenção, sendo que alguns destes podem estar atuando de forma seletiva, ligando especificamente a certos domínios do substrato^[60].

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água que podem precipitar proteínas em soluções aquosas. Os taninos têm massa molecular entre 1000 e 3000 Da sendo capazes de formar complexos não só com proteínas mas também com outras moléculas que possuem grupos carboxilas e aminas além de formar pontes de hidrogênio com macromoléculas susceptíveis a autooxidação^[61]. Os taninos também se complexam com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio entre outros)^[60, 59]

A capacidade de inibição da atividade fosfolipase A_2 da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi avaliada neste trabalho usando como fonte de substrato gema de ovo (figura 3). O extrato de *Schizolobium parahyba* foi capaz de inibir a atividade PLA_2 da peçonha, porém nas duas razões testadas as inibições não foram significativas quando comparadas ao controle com apenas a peçonha bruta.

Segundo BORGES et al. (2000)^[13] o extrato de *Casearia sylvestris* contém compostos capazes de neutralizar a atividade catalítica de PLA_2 e enzimas proteolíticas de venenos de serpentes e abelhas. Estes autores sugeriram que extratos de plantas causam inibição destas enzimas por se ligarem a íons divalentes que são importantes para suas atividades enzimáticas. Resultados semelhantes foram obtidos quando wedelolactona, um composto isolado do extrato da planta *Eclipta prostrata*, neutralizou as atividades PLA_2 e proteolítica de algumas peçonhas.

As PLA_2 são proteínas compactas de baixa massa molecular resistentes a altas temperaturas devido a até sete pontes dissulfeto, as quais estabilizam e promovem a rigidez de sua estrutura^[62], talvez essa rigidez estrutural seja o motivo da baixa inibição da atividade PLA_2 pelo extrato de *Schizolobium parahyba* da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* impedindo a complexação entre os compostos do extrato e as proteínas da peçonha. A interação entre taninos e proteínas é específica e depende da estrutura de ambos, segundo SPENCER et al. (1988)^[63] proteínas de alto peso molecular se associam mais fortemente aos taninos e proteínas de estruturas mais abertas e flexíveis tem maior afinidade aos taninos.

Os danos locais induzidos pelas peçonhas de serpentes ou toxinas isoladas são difíceis de prevenir pela soroterapia usual. Diante dessa problemática dos antivenenos em não inibir completamente os efeitos locais induzidos pelas peçonhas, uma variedade de inibidores naturais e sintéticos têm sido caracterizados^[64]. Extratos vegetais também se constituem em uma fonte rica de substâncias de uso potencial na neutralização de venenos^[65].

Várias propostas surgem com a finalidade de diminuir ou até mesmo inibir completamente os danos locais induzidos pelas peçonhas e ou suas toxinas isoladas. Uma combinação da rápida administração de antivenenos com altos títulos contra estas toxinas junto com a injeção local de inibidores naturais e ou sintéticos, podem melhorar satisfatoriamente o dano tecidual local que é um dos sintomas mais agravantes no envenenamento principalmente por serpentes do gênero *Bothrops*.

Com este intuito, realizamos os testes de neutralização sob diferentes formas de tratamento: O pós-tratamento injetando no local da lesão o extrato vegetal de *Schizolobium parahyba*, para se verificar a eficiência destes agentes após o envenenamento e com esta condição de tratamento estaríamos representando de uma forma mais real as condições de um envenenamento. O pré-tratamento foi realizado para verificar a eficiência dos compostos potencialmente inibitórios previamente no local da injeção da peçonha.

A inibição da atividade hemorrágica pelo extrato vegetal de *Schizolobium parahyba*, teve maior efeito quando a peçonha bruta foi pré-incubada com o extrato vegetal (figura 4). Este dado pode ser melhor observado no teste de atividade hemorrágica em que o halo hemorrágico foi quase inexistente (figura 5(D)). Em contrapartida o pré e o pós tratamento com extrato vegetal mostrou níveis intermediários de neutralização hemorrágica (figuras 5(E) e 5(F)), quando comparados com a hemorragia causada pela peçonha bruta. A incubação foi capaz de inativar muitos componentes da peçonha que são responsáveis pelo quadro de necrose tecidual, e com isso quando injetados no animal já não são capazes de exercerem suas ações tóxicas.

A necrose muscular é uma característica bastante marcante no envenenamento botrópico. A miotoxicidade pode ser devido a ação direta das miotoxinas sobre a fibra muscular ou pode ser por ação de metaloproteases hemorrágicas que provocariam danos vasculares e depleção de sangue que nutre as células musculares, provocando isquemia e conseqüentemente morte celular^[66, 67].

Os resultados de avaliação da atividade miotóxica mostram que os animais aplicados com apenas peçonha apresentam níveis de creatina cinase plasmática muito altos, quando comparados ao controle PBS, enquanto que os animais submetidos a condição de incubação da peçonha e extrato vegetal apresentam estes níveis bem menores se comparados ao controle positivo. Ao contrário do que ocorreu na condição de incubação, no pré-tratamento e no pós-tratamento, o nível de creatina cinase foi relativamente maior, embora menor quando comparado com os altos níveis plasmáticos de creatina cinase induzidos somente pela peçonha bruta (figura 6) indicando que o extrato vegetal conseguiu neutralizar a ação lesiva da peçonha sobre o músculo.

As alterações morfológicas provocadas no músculo esquelético (gastrocnemius) é um indício da potente ação das toxinas presentes na peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A musculatura quando injetada com peçonha bruta mostrou-se bastante danificada (figura 7(A)). As fibras musculares encontravam-se fragmentadas com uma ligeira separação entre as fibrilas onde pode ser observado áreas necrosadas com elevado efeito hemorrágico e infiltrado leucocitário. Isso certamente se deve ao fato da habilidade das toxinas presentes na peçonha em degradar proteínas da matriz extracelular^[39] o que também explica a alteração na membrana basal. A neutralização da atividade miotóxica

da peçonha bruta, pelo extrato vegetal de *Schizolobium parahyba*, foi melhor representada quando esta foi pré-incubada com o extrato vegetal (figura 7(D)).

Os ensaios de neutralização dos ensaios biológicos, claramente demonstraram que na condição de incubação houve uma melhor inibição dos danos teciduais locais induzidos pela peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, provavelmente por esta condição permitir um maior contato prévio entre as proteínas da peçonha bruta e os componentes do extrato de *Schizolobium parahyba*.

Os danos teciduais locais, como hemorragia e necrose não foram totalmente inibidos quando foram realizados o pré-tratamento e o pós-tratamento com o extrato vegetal no local da injeção. Provavelmente, na condição de pré-tratamento componentes do extrato já presentes no sítio da lesão estariam interagindo com proteínas do tecido muscular e dessa forma diminuindo a proporção de compostos ativos que inibiriam as toxinas presentes na peçonha. Na condição de pós-tratamento, o efeito inibitório do extrato vegetal também foi menor quando comparado com a incubação da peçonha mais o extrato vegetal, talvez pelo fato de as toxinas da peçonha terem se distribuído pelos tecidos próximos do local da injeção, uma vez que as peçonhas botrópicas são ricas em enzimas proteolíticas que agem sobre diferentes substratos principalmente componentes de matriz extracelular tais como colágeno tipo IV, fibronectina e laminina^[37].

Desde que nossos experimentos foram realizados com extrato bruto, não se sabe quais são os metabólitos responsáveis pelos efeitos inibitórios observados. Os princípios ativos de extratos de plantas são metabólitos secundários que mostram uma complexa estrutura e função. Alguns destes possuem atividade terapêutica como taninos, terpenos, alcalóides, flavanóides, saponinas e ligninas^[5].

Em nosso trabalho nós demonstramos que o extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* foi efetivo em inibir as atividades coagulante, fibrinogenolítica, hemorrágica e miotóxica da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A investigação de novos inibidores de peçonhas de serpentes pode ser útil para a elucidação do mecanismo de ação de toxinas purificadas. Além do mais, estes inibidores podem ser utilizados como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos em acidentes ofídicos.

6 *Referências Bibliográficas*

- 1 SWERDLOW, J. Nature's Medicine: Plants that health. **National Geographic Society**, 2000.
- 2 PIERPOINT, W. S. Salicylic acid and its derivates in plants: Medicine, metabolites and messenger molecules. **Adv. Bot. Res.**, n. 20, p. 163–235, 1994.
- 3 RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, n. 39, p. 603–613, 2000.
- 4 IZIDORO, L. F. M. Estudos de neutralização dos principais efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica Uberlândia-MG, 2001.
- 5 DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e Ciência**. 1. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 1996.
- 6 MACEDO, M. L. R.; MATOS, D. G. G.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: Purification and properties. **Phytochemistry**, n. 54, p. 553–558, 2000.
- 7 FURLAN, M. R. **Cultivo de plantas medicinais**. 2. ed. Cuiabá-MT: SEBRAE, 1999.
- 8 MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa-MG: UFV, 1995. 220p.
- 9 MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, n. 30, p. 1131–1141, 1992.
- 10 CHERDCHU, E.; SRIDUKAVAT, K.; KOON, K. R. Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma sp.* (Zingiberaceae). **Journal Medicine Thailand**, n. 61, p. 544, 1978.
- 11 PEREIRA, N. A.; PEREIRA, P. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta med**, n. 60, p. 99–100, 1994.
- 12 RODRIGUEZ, M.; CARVALHO, J. C. T.; LUCIA, M.; MESQUITA, J. M.; SARTI, S. J. Avaliação da atividade antiofídica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* sobre modelos animais estimulados com veneno de *Bothrops alternatus*. **III Jornada Paulista de Plantas medicinais**, n. 3, p. 110–111, 1997. Campinas-SP.
- 13 BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, J. M.;

- GIGLIO, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on action of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A_2 . **Compendium Biochemistry Physiology**, n. 127, p. 21–30, 2000.
- 14 IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; 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**, n. 85, p. 669–675, 2003.
- 15 CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil : Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo-SP: Sarvier, 2003.
- 16 Fundação Nacional de Saúde. **Sistema de informação de agravos e notificação**. 48. ed. Brasília-DF, 2001.
- 17 Da SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brasil. **Toxicon**, n. 41, p. 251–255, 2003.
- 18 PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, v. 1, n. 50, p. 93–96, 2004.
- 19 ROSENFELD, G. Venomous animals and their venoms. **Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America**, n. 5, p. 345–362, 1971.
- 20 GREENE, H. W. Snakes: The evolution of mystery in nature. **Berkeley: University of California Press**, p. 351, 1997.
- 21 HOGE, A. R. Sinopse das Serpentes peçonhentas do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, n. 42, p. 373–496, 1981.
- 22 NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. P. Clinical and epidemiological study of cases of lance-headed vipers. **An Tropical Medicine Parasitology**, n. 86, p. 89–81, 1992.
- 23 SILVA, V. X. **Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2000.
- 24 DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; M., S. A.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno Botrópico. **Memórias Instituto Butantan**, n. 54, p. 21–30, 1992.
- 25 FURTADO, M. F. **Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* em função da idade das serpentes**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 1987.
- 26 DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, n. 537, p. 40, 1996.

- 27 GANS, C.; GANS, K. A. Biology of reptilia. **Academic Press of New York**, v. 8, p. 1-180, 1978.
- 28 TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, n. 26, p. 292-300, 1989.
- 29 MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation from venoms of different species of Bothrops Snakes. **Toxicon**, n. 24, p. 713-723, 1991.
- 30 PEREZ, O. C. A.; KOSCINZUK, P.; TEILBLER, P.; NEGRETE, M. S.; RUIZ, R.; MURANAK, S.; BOGARIN, G. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas in almofadilla plantas del raton inducidas por venenos de serpientes de cor genesos bothrops y crotalus de Argentina. **Toxicon**, n. 36, p. 1165-1172, 1998.
- 31 SUZUKI, T.; IWANAGA, S. Snake venoms. In: ERDÖS, E. G. (ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1970. v. 25, cap. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, p. 193-212.
- 32 SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, I. M.; TOYAMA, M.; LOMBARDI, F.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys₄₉. Myotoxin II from *Bothrops moojeni* (Caissaca) crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, n. 36, p. 503-514, 1998.
- 33 DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (Jararaca chico) venom with novel Kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, n. 35, p. 1205-1215, 1997.
- 34 SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A₂. **Science**, n. 250, p. 1541-1546, 1990.
- 35 HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacuçu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, n. 7, p. 615-627, 1988.
- 36 MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: Their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.**, n. 48, p. 223-236, 1990.
- 37 GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, n. 82, p. 841-850, 2000.
- 38 BALDO, C. Lesão tecidual e inflamação induzidas pela neuwiedase: Uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia-MG, 2004.

- 39 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; M. F. M. R.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a non hemorrhagic fibrinolytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, n. 381, p. 213–224, 2000.
- 40 GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS**, n. 335, p. 76–80, 1993.
- 41 OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. **Hand. Exp. Pharmac**, v. 52, p. 480–546, 1979.
- 42 KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, n. 34, p. 627–642, 1996.
- 43 CASTRO, H. C.; DUTRA, D. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.; ZINGALI, R. B. Bothroaltermnin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, n. 36, p. 1903–1904, 1998.
- 44 MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, n. 36, p. 1749–1800, 1998.
- 45 OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, n. 9, p. 945–966, 1992.
- 46 LEITE, C. V. S.; NARESE, L. E.; ARANTES, H. L.; NI, M. J. S.; MERCADANTE, M. C.; BARRAVIEIRA, B.; KOBAYASI, S. An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. **Journal Venom Animal and toxins**, n. 6, p. 130–141, 2000.
- 47 OLIVEIRA, F. Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caissaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthas) e caracterização bioquímica da BthTI. Tese (Doutorado) — Universidade de Brasília, 2001. Distrito Federal.
- 48 FRANÇA, F. O. S. Associação da venenomia e de gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantã, de São Paulo, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. **Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, n. 3, p. 187–190, 1998.

- 49 TELES, R. C. T.; FREITAS, S. M.; SOUSA, E. M. T.; AREAS, E. P. G. Vibrational spectroscopic analysis of a chymotrypsin inhibitor isolated from *Schizolobium parahyba*. **Spectrochimica acta**, n. 55, p. 1279–1289, 1999.
- 50 TELES, R. C. L.; SOUSA, E. M. T.; CALDERON, A.; FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, n. 65, p. 793–799, 2004.
- 51 ELISABTH, M. T. H. S.; MISAKO, U.; CLAUDIO, A. M. S. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 521–525, 1995.
- 52 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248–254, 1976.
- 53 ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Compendium Biochemistry and Physiology**, n. 102, p. 727–732, 1992.
- 54 EDIGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of anecrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis Research**, n. 2, p. 85–89, 1973.
- 55 DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEENHVIZEM, W.; VAN DEENEN, L. L. M. Purification and properties of phospholipase A_2 from porcine pancreas. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, n. 159, p. 103–117, 1968.
- 56 NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, n. 231, p. 309–311, 1984.
- 57 BORGES, M. H. Inibição dos principais efeitos tóxicos causados por venenos animais pelo extrato vegetal de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). 303 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica Uberlândia-MG, 1998.
- 58 FREITAS, F. G. de. Neutralização dos principais efeitos tóxicos de peçonhas botrópicas (*B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. newwiedi pauloensis*) pelo extrato aquoso de *Casearia grandiflora* (Flacourtiaceae). Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica Uberlândia-MG, 2002.
- 59 VALE, L. H. F. Neutralização das atividades fibrinogenolíticas e coagulante das peçonhas das serpentes *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pelo

- extrato aquoso e frações de *Schizolobium parahyba*. Monografia (Graduação) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2004.
- 60 SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre-Florianópolis: UFRGS, 2003. 1102 p.
- 61 RICCO, R. A.; SENA, G. A.; VAI, V. M.; GURNI, A. Taninos condensados de *Ephedra chilensis*. **Càtedra de Farmacobotânica**, 2002.
- 62 DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A_2 . **Journal of Biology and Chemistry**, n. 269, p. 13057–13060, 1994.
- 63 SPENCER, C. M.; CAI, Y.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P. N.; HASLAN, E. Polyphenol complexation some thoughts and observations. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2397–2409, 1988.
- 64 XUE, C. B.; HE, X.; RODERICK, J.; DEGRADO, W. F.; DECICCO, C.; COPELAND, R. A. Potent matrix metalloproteinase inhibitors: Amino-carboxylate compounds containing modifications of the P1 residue. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, n. 4, p. 379–384, 1996.
- 65 MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; SILVA, M. H. D.; MELO, P. A.; KURTZ, G. S. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**, n. 27, p. 1003–1009, 1989.
- 66 OWNBY, C. L.; BJARNASON, J. B.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Am. J. Pathol**, n. 93, p. 201–218, 1978.
- 67 RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol**, n. 63, p. 186–199, 1995.