

Márcia Helena Borges

Inibição dos Principais Efeitos Tóxicos Causados
por Venenos Animais pelo Extrato Vegetal de
Casearia sylvestris (Flacourtiaceae).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Centro de Ciências Biomédicas

Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

MON
520/11
2000
TES/MEM

Inibição dos Principais Efeitos Tóxicos Causados
por Venenos Animais pelo Extrato Vegetal de
Casearia sylvestris (Flacourtiaceae).

Márcia Helena Borges

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Uberlândia
para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica

Orientadora: Prof. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

DIRBI/UFU



1000184226

Uberlândia-MG

1998

Dedico este trabalho

Aos meus pais: João e Maria

Pelo incentivo, carinho, amor, sacrifício e dedicação.
Que a recompensa seja breve.

Aos meus irmãos: Geraldo e Magdo

Pelo dia-a-dia vivido na esperança sempre de encontrar melhores dias.

Ao meu noivo Frederico

“Saber amar
É saber deixar alguém te amar.”
Herbet Viana

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece. Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal. O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá.

(Coríntios, 13, 4:8)

Agradecimentos

À Prof. Dra. Maria Inês Homs Brandeburgo pela orientação, incentivo e exemplo de vida que tanto contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Aos professores do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo auxílio e contribuição inestimáveis.

À Prof. Ana Angélica de Almeida do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda na identificação e coleta das plantas.

Ao Prof. Heyder Diniz Silva, do Departamento de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia, pelo auxílio nos testes estatísticos.

À Prof. Ana Alice (Departamento de Morfologia) pelo auxílio na confecção e interpretação das fotos.

Aos Profs. Edson Rodrigues Filho (Universidade Federal de São Carlos - UFSCar) e Wellington de Oliveira Cruz (Universidade Federal de Uberlândia - UFU), pela parte de fitoquímica do extrato vegetal.

À Prof. Amélia Hamaguchi, pelo apoio, compreensão e incentivo profissional e pessoal.

À Prof. Ana Bonetti, pelo carinho e interesse a mim dedicados, sempre que precisei.

Ao Prof. Luís Ricardo Goulart e seus orientados, pela amizade e desprendimento que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos: Daniel, Fabiana, Viviane, Soraya, Rosana e Vivian, meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários dos laboratórios de Bioquímica e Biofísica principalmente Tianinha, Heloisa, Cleuber e Hélio, pelo auxílio e boa vontade sempre.

Ao Instituto Vallée e Pentapharm do Brasil pelo fornecimento de animais.

Ao CNPq, CAPES e PROP-UFU, pelo apoio financeiro.

Aos amigos:

Veridiana, Andreimar, Fábio, Regildo e Luiz
Fernando,

“Um verdadeiro amigo é aquele que desculpa
nossas falhas e tolera nosso sucesso.”

Doug Larson

Para vocês não há palavras.....

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1- INTRODUÇÃO:	1
2- MATERIAIS:	16
2.1- Venenos Brutos:	17
2.2- Extratos Vegetais:	17
2.3- Reagentes para Eletroforese, Dosagem Protéica e Atividades Enzimáticas:	17
2.4- Animais:	18

2.5- Materiais para Cromatografia e Obtenção dos Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Infravermelho:.....	18
3- MÉTODOS:	19
3.1- Preparo da Solução de Veneno:.....	20
3.1.1- Dosagem de Proteínas (ITZHAKI e GILL, 1964).	20
3.2- Preparo dos Extratos Vegetais:	20
3.3- Estudos de Inibição:	21
3.3.1- Atividade Fosfolipase A ₂ (PLA ₂) (DE HAAS <i>et al.</i> , 1968).....	21
3.3.2- Atividade Coagulante sobre o Plasma Bovino (ASSAKURA <i>et al.</i> , 1992).	21
3.3.2.1- Cálculo da Dose Mínima Coagulante (DMC)	22
3.3.3- Atividade Fibrinogenolítica (OLIVEIRA, 1997).	22
3.3.3.1- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes (LAEMMLI, 1970).	22
3.3.4- Atividade Miotóxica (RODRIGUES, 1996).	23
3.3.5- Atividade Hemorrágica (NIKAI <i>et al.</i> , 1984).	23
3.3.6- Atividade Edematogênica (LIORET e MORENO, 1993).	23
3.3.7- Inibição da Toxicidade do Veneno.....	24
3.4- Caracterização Parcial do Extrato Vegetal:.....	24
3.4.1- Teste de Solubilidade.	24
3.4.2- Filtração em Sephadex LH-20.	25
3.4.3- Espectro de Ressonância Magnética de Prótons (RMN ¹ H).	25
3.4.4- Espectro de Infra Vermelho.	25

4- RESULTADOS:	26
4.1- Atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂):.....	27
4.2- Atividade Coagulante sobre o Plasma Bovino:	30
4.3- Atividade Fibrinogenolítica:.....	31
4.4- Atividade Hemorrágica:	34
4.5- Atividade Miotóxica:.....	35
4.6- Atividade Edematogênica:.....	37
4.7- Letalidade:	38
4.7.1- Cálculo da DL ₅₀ Veneno Bruto <i>B. neuwiedi</i>	38
4.8- Resumo das Atividades Ensiadas neste Trabalho:	39
4.9- Caracterização Parcial do Extrato Vegetal de <i>Casearia sylvestris</i> - Folhas:.....	40
4.9.1- Teste de Solubilidade.....	40
4.9.2- Filtração em Sephadex LH-20.....	40
4.9.3- Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ¹ H) e Espectrofotometria de Infravermelho.....	40
5- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	46
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

Os venenos animais são constituídos por complexas misturas de toxinas de origem principalmente protéica, com ação enzimática ou não e que são responsáveis pelos principais efeitos dos envenenamentos tais como; miotoxicidade, hemorragia, distúrbios na coagulação sanguínea e edema. Muitas plantas têm sido usadas pelo homem para o tratamento de acidentes ofídicos, mas geralmente seus usos têm sido atribuídos à superstição, e poucos são os conhecimentos científicos relacionados às características apresentadas por estas plantas. O objetivo deste trabalho foi verificar a inibição dos principais efeitos dos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* e da abelha *Apis mellifera* pelo extrato vegetal de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), uma típica planta do Cerrado Brasileiro. Inicialmente, foi preparado um extrato aquoso a partir das folhas e do caule desta planta. Para cada ensaio de inibição, o extrato foi incubado com o respectivo veneno por uma hora antes do teste. Foram realizados ensaios para as atividades fosfolipásica A₂, coagulante, fibrinogenolítica, hemorrágica, miotóxica, edematogênica e toxicidade. Para a atividade fosfolipásica A₂, os resultados mostram uma alta porcentagem de inibição para todos os venenos, onde testes estatísticos revelaram a eficácia do extrato vegetal tanto para o caule quanto para as folhas. Na atividade coagulante, os resultados foram estatisticamente testados pelo teste T e mostraram que apenas *B.jararacussu* incubado com *Casearia sylvestris* folhas, apresentou diferenças significativas (inibição de 38%), enquanto para as outras amostras, não houve inibição significativa. Quando testamos a inibição da atividade fibrinogenolítica, encontramos que o extrato (folhas ou caule) ofereceu pouca ou nenhuma proteção para a cadeia α do fibrinogênio. A neutralização da hemorragia foi determinada por injeções intradérmicas no dorso de camundongos, assim, a atividade hemorrágica apresentou grande inibição para o extrato do caule e das folhas, sugerindo a eficiência deste extrato para esta atividade. Para a atividade miotóxica, os bons resultados obtidos também sugerem a presença de componentes capazes de interferir no efeito tóxico dos venenos, pois os cortes histológicos mostram fibras em perfeito estado para as amostras incubadas com o extrato quando comparadas à aquelas que continham apenas veneno. Na atividade edematogênica, verificou-se que o edema formado pelo veneno de *Bothrops jararacussu* não foi inibido significativamente pelo extrato vegetal das folhas de *Casearia sylvestris*, mas em relação ao controle foi ligeiramente menor. Já para o teste de toxicidade o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* provocou um aumento na sobrevida dos animais que receberam injeções intraperitoniais de 2DL₅₀ (Dose letal 50%) dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* incubados com o extrato do caule ou das folhas. Embora todos os animais morressem ao longo do experimento, verificou-se que o tempo médio de sobrevida foi prolongado. Para todas as atividades, foram realizados controles negativos, utilizando somente os extratos vegetais e podemos concluir que estes extratos não induzem a nenhuma atividade. De acordo com os resultados acima, verificamos o potencial inibitório do extrato de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). As altas porcentagens de inibição para as atividades hemorrágica, fosfolipásica A₂ e miotóxica, indicam a presença de componentes que poderão apresentar grande valor terapêutico para tratamento de envenenamentos animais e talvez até para outras desordens clínicas.

ABSTRACT

Snake venoms are constituted by complex mixtures of proteases, hemorrhagic factors and phospholipases that are responsible for the main effects of the envenomations such as: myotoxicity, hemorrhage, disturbs of blood coagulation and edema. Many plants have been used in popular medicine for the treatment of snakebite, but its use has generally been attributed to the superstition and there are few scientific knowledge related to the characteristics presented by these plants. The purpose of this study was to verify the inhibition of the *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* and *Apis mellifera* venoms main effects by *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) extract, a typical plant from Brazilian Savannah. Initially, an aqueous extract was prepared from the leaves and the stem of this plant and this extract was incubated with the crude venom sample by one hour before the test. We realized some activities as Phospholipase A₂, blood coagulation, fibrinogenolytic, hemorrhagic, myotoxic, edema and toxicity. For Phospholipase A₂ activity the results indicate a high percentage of inhibition for all the venoms, where the statistical analysis revealed that these extract inhibited significantly and that the both extracts (stem and leaves) are equally efficient. In the coagulation activity the results were statistically analyzed by the test T and showed significant differences only to *B.jararacussu* venom incubated with *Casearia sylvestris* leaves (inhibition of 38%), while for the other samples, no significant neutralization was recorded. When we tested the inhibition of the fibrinogenolytic activity, we found that the extract (leaves or stem) offered little or no protection for the fibrinogen α chain. The inactivation of the hemorrhagic activity was determined by intradermic injections in mice. The hemorrhagic activity presented great inhibition for the stem and leaves extract, suggesting the efficiency of this extract for this activity. For myotoxic activity, the histological observations show fibers in perfect state for the samples incubated with the extract when compared to the those that contained only venom and they indicate the presence of the components able to neutralize the toxic effects. In the edema activity was verified that the edema was not inhibited by the extract of the leaves of *Casearia sylvestris*, but the edema produced by the sample incubated with the extract was lightly smaller than that provoked by the venom in the extract absence. Finally, for toxicity test, the *Casearia sylvestris* extract provoked an increase in the lifetime of the animals that received intraperitonials injections of 2DL₅₀ (lethal dose) of *Bothrops jararacussu* and *Bothrops neuwiedi pauloensis* venoms when these were incubated with the stem or leaves extract. Despite all the animals died along the experiment, the lifetime average was prolonged and it showed significant results for *Bothrops jararacussu* venom. For all the activities, negative controls were accomplished, using only the extracts and we can conclude that these extracts don't induce to any activity. In agreement with the results above, we verified that *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) extract can neutralize animals venoms. The high inhibition percentages for the hemorrhagic, phospholipase A₂ and myotoxic activities, indicate the presence of components that could present great therapeutic value for treatment of animal envenomations and perhaps to for another clinical disorders.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	14
Figura 2	28
Figura 3	29
Figura 4	32
Figura 5	33
Figura 6	34
Figura 7	36
Figura 8	37
Figura 9A	41
Figura 9B.....	42
Figura 9C.....	42
Figura 9D	43
Figura 9E.....	43
Figura 9F	44
Figura 10A	45
Figura 10B.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	3
Tabela 2	27
Tabela 3	31
Tabela 4	38
Tabela 5	39
Tabela 6	40

LISTA DE ABREVIATURAS

DL₅₀: dose letal 50%.

PLA₂: fosfolipase A₂.

Temed: N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina.

Bis-acrilamida: N,N' metileno-bis-acrilamida.

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

CC: *Casearia sylvestris* - caule.

CF: *Casearia sylvestris* - folhas.

DMH: Dose mínima hemorrágica.

DMC: Dose mínima coagulante.

1- INTRODUÇÃO:

Os venenos animais, incluindo os de serpentes, escorpiões, aranhas e abelhas apresentam uma mistura de várias substâncias tóxicas, sobretudo de origem protéica, cuja ação pode ocorrer por diferentes mecanismos.

Estes venenos representam as fontes protéicas mais concentradas da natureza, ricas em enzimas de degradação, sendo de inestimável valor para a pesquisa bioquímica. Exemplos podem ser citados como a L-aminoácido oxidase, enzima responsável pela cor amarela dos venenos (PESSATTI *et al.*, 1995), que é utilizada para identificar isômeros ópticos de aminoácidos (PARIKH *et al.*, 1958), preparar α -cetoácidos a partir de L-aminoácidos (MEISTER, 1956) e produzir tirosina (SHIBA e CAHNMANN, 1962). A fosfodiesterase é outra enzima usada para estudos estruturais de ácidos nucleicos e dinucleotídeos. Proteinases também são purificadas para estudos da sequência de aminoácidos, peptídeos e proteínas. Pode-se citar ainda as fosfolipases, as enzimas “thrombin-like” responsáveis pela formação do coágulo de fibrina na fase final do processo de coagulação do sangue e procoagulantes que têm aplicação clínica. Assim, o uso bioquímico e terapêutico das enzimas presentes nos venenos, bem como o interesse pelo estudo de seus mecanismos de ação têm gerado inúmeras tentativas de purificação e caracterização das mesmas.

Em geral, toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos têm sido detectados em quantidades variáveis nos venenos de serpentes de espécies diferentes, mas de uma mesma família. Esta heterogeneidade apresentada pelos venenos pode ser devida às diferenças na idade, nutrição, sexo e habitat das serpentes ou devido à forma como o “pool” de veneno coletado é estocado (liofilizado, cristalizado, congelado *in natura*). Segundo TAN e PONNUDURAI (1990), estas variações individuais levam à pequenas alterações nas atividades biológicas observadas dentro de um mesmo gênero. BONILLA *et al.* (1973) compararam as atividades enzimáticas de “pools” do veneno de cascavel em diferentes estágios de crescimento e observaram que para algumas serpentes ocorria um aumento na quantidade de proteína total, bem como de algumas enzimas presentes durante o crescimento destes animais, enquanto para outras serpentes, havia um pequeno decréscimo. ASSAKURA *et al.* (1992) trabalharam com misturas de veneno das espécies *Bothrops asper*, *Bothrops atrox*, *Bothrops marajoensis* e *Bothrops moojeni*, coletados de diferentes áreas geográficas no Brasil, Peru e Costa Rica e observaram que cada espécie apresenta um perfil protéico característico em eletroforese de poliacrilamida, bem como variações nas atividades testadas (DL_{50} Dose letal, miotoxicidade, hemorragia, coagulação do plasma e fibrinogênio). FERREIRA *et al.* (1992a) também compararam as diversas atividades tóxicas presentes em nove espécies do gênero *Bothrops*, verificando que as principais

toxinas presentes neste gênero não estão igualmente distribuídas entre as espécies. Estas observações indicam que o envenenamento por serpentes botrópicas pode ser diferente de acordo com a quantidade e a qualidade das diferentes toxinas que compõem o veneno, necessitando portanto, de diferentes procedimentos clínicos. A tabela 1, mostra a distribuição de algumas enzimas presentes em venenos de serpentes de acordo com a família a que pertencem.

Tab.1: Distribuição das enzimas presentes em venenos de serpentes de acordo com a família a que pertencem: (SUSUKI e IWANAGA, 1970.)

FAMÍLIA	ENZIMA
Elapidae	Acetilcolinesterase, fosfolipase B, glicerofosfatase
Crotalidae/Viperidae	Endopeptidase, Arginina éster-hidrolase, cininogenase, thrombin-like, ativador de fator X, ativador de protrombina
Em todos os venenos	<u>Fosfolipases A₂</u> , L-aminoácido oxidase, fosfodiesterase, 5' nucleotidase, fosfomonoesterase, deoxirribonuclease, ribonuclease, adenosina trifosfatase, hialuronidase, NAD-nucleosidase, arilamidase, peptidase

No Brasil, somente as serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis* são consideradas peçonhentas.

O gênero *Bothrops*, representado pelas serpentes conhecidas como Jararacas (jararacussu, moojeni ou caissaca, neuwiedi ou boca de sapo), é encontrado principalmente em locais úmidos como matas, áreas de cultivo e onde há proliferação de roedores. São serpentes de hábitos noturnos e quando se sentem ameaçadas atacam em silêncio. Este gênero é responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos ocorridos no país (ROSENFELD, 1971; FERREIRA *et al.* 1992a; RIBEIRO, 1993). Provocam distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea, induzem hemorragia, edema e necrose local. A necrose local frequentemente afeta a pele e as camadas musculares mais profundas e nos casos mais severos pode haver a completa destruição do tecido, perda do órgão ou até mesmo a morte (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991).

As serpentes do gênero *Lachesis* (surucucus) são de pequena distribuição geográfica e apresentam os sintomas de envenenamento semelhantes aos botrópicos.

Os acidentes que envolvem cascavéis (gênero *Crotalus*) são mais graves porque os venenos destas serpentes apresentam neurotoxinas que bloqueiam a

transmissão nervosa, a nível pré ou pós-sináptico, prejudicando a liberação da acetilcolina e levando à morte por asfixia (DÉLOT e BON, 1993)

Já as serpentes do gênero *Micrurus* (corais) também apresentam potentes neurotoxinas, que provocam um elevado índice de letalidade.

Um dos principais componentes dos venenos é a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), que tem como substrato os fosfolipídeos que constituem a membrana celular. Estes fosfolipídeos participam do processo de sustentação da membrana, contribuindo na manutenção de suas características e funções. Com a ação da enzima, os fosfolipídeos são hidrolisados, especificamente na ligação éster do carbono 2 do glicerol (Van DEENEN e DE HAAS, 1963) e a membrana perde sua estrutura, sua permeabilidade seletiva fica comprometida, havendo livre passagem de substâncias do meio externo para o interno, bem como o contrário.

Além da função catalítica primária, as PLA₂ de venenos de serpentes estão relacionadas com os efeitos do envenenamento, tais como: miotoxicidade (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995), hemólise (CONDREA *et al.*, 1981), formação de edema (LLORET e MORENO, 1993), hipotensão (HUANG, 1984), neurotoxicidade pré-sináptica (CHANG *et al.*, 1977) e pós-sináptica (BON *et al.*, 1979), cardiotoxicidade (FLETCHER *et al.*, 1981), agregação plaquetária (YAN *et al.*, 1993) e convulsão ((FLETCHER *et al.*, 1980). Nem sempre, esses efeitos implicam na atividade enzimática (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987), para a qual é essencial a presença de íons cálcio, cuja ligação ao resíduo do aminoácido Asp49 permite a formação da rede catalítica. A troca deste aminoácido para Lys49 (MARANGONE *et al.*, 1984; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988 e FRANCIS *et al.*, 1991) ou Ser49 (KRIZAJ *et al.*, 1991) ou Ala49 (LIU *et al.*, 1991) provoca a perda da atividade catalítica, sem prejudicar a atividade tóxica das fosfolipases A₂.

As PLA₂ são enzimas digestivas que inicialmente surgiram como secreções salivares que tinham por função lubrificar os alimentos e higienizar os dentes. Ao longo do período evolutivo, esta secreção foi acrescida de proteínas e enzimas tóxicas que passaram a ter a função de paralisar e matar a presa (GANS, 1978).

E esta evolução continuou ocorrendo, como podemos comprovar ao se observar a homologia entre as miotoxinas que apresentam atividade PLA₂ (Asp49) e aquelas que possuem estrutura de PLA₂, porém não apresentam a atividade catalítica (Lys-49). Esta homologia é maior entre as proteínas Lys-49 (mesmo entre diferentes gêneros) do que as Asp-49 (de mesma espécie), sugerindo que a divergência do gene ocorreu antes da separação do gênero (FRANCIS *et al.*, 1991).

Muitas miotoxinas têm sido isoladas dos venenos de serpentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984 a, b; LOMONTE e GUTIÉRREZ, 1989; KAISER *et al.*, 1990; HOMSI-BRANDEBURGO, 1987; SELISTRE *et al.*, 1990; LOMONTE *et al.*, 1990a;

MANCUSO *et al.*, 1995; RODRIGUES, 1996; SOARES, 1997). A miotoxicidade pode ser definida como a ação específica do veneno no músculo esquelético. Porém, experimentos usando células em cultura, revelaram que as miotoxinas podem afetar também neurônios, macrófagos e fibroblastos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995).

GUTIÉRREZ *et al.* (1995) propuseram um mecanismo hipotético para a ação das miotoxinas, onde inicialmente, estas proteínas se ligariam a um receptor da membrana (uma proteína, um fosfolípido ou outro componente qualquer). Provavelmente, haveria alguma interação eletrostática entre o sítio catiônico da toxina que seria o responsável pela miotoxicidade e grupos carregados negativamente presentes na membrana. Na etapa seguinte, as miotoxinas penetrariam na bicamada através de interações hidrofóbicas mediadas por uma região citotóxica da molécula, diferente do sítio catalítico. A penetração da região citotóxica no centro da bicamada seria responsável pela desestabilização da membrana, alterando a permeabilidade da mesma. Além desta perturbação inicial, as miotoxinas-PLA₂ induziriam danos na membrana devido à hidrólise dos lipídeos da bicamada (o que não ocorre nas miotoxinas Lys-49). O influxo de cálcio é provavelmente o fato mais relevante na perturbação da membrana, sendo o principal responsável pelos processos degenerativos tais como: alterações do citoesqueleto, danos mitocondriais e ativação de proteases cálcio-dependentes.

Os venenos botrópicos apresentam várias isoformas de miotoxinas-PLA₂, que variam tanto de uma espécie para outra, ou mesmo para um único indivíduo. Em *Bothrops asper*, podem ser observadas eletroforeticamente, pelo menos cinco variantes, mostrando a diversidade na expressão das isoformas (LOMONTE e CARMONA, 1992). NAKASHIMA *et al.* (1993), em seus estudos de clonagem com veneno de *Trimeresurus flavoridis*, observaram a existência de 6 genes diferentes codificadores para as isoenzimas miotóxicas. LOMONTE *et al.* (1987) verificaram que há uma regulação ontogênica da expressão da miotoxina em *Bothrops asper*, pois serpentes recém-nascidas não expressam nenhuma isoforma antes de um mês de vida.

Algumas das miotoxinas botrópicas ocorrem como dímeros como por exemplo as miotoxinas II e III de *B. asper* (LOMONTE e GUTIÉRREZ, 1989; FRANCIS *et al.*, 1991), miotoxina de *B. nummifer* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986a), miotoxina de *B. insularis* (SELISTRE *et al.*, 1990), miotoxinas MV e MVI de *B. moojeni* (SOARES, 1997) e outras como monômeros. A composição de aminoácidos indica que estas toxinas são ricas em aminoácidos hidrofóbicos (HOMSI-BRANDEBURGO, 1988; SELISTRE, *et al.*, 1990; DÍAZ *et al.*, 1992).

Estudos cristalográficos têm sido feitos, a fim de se conhecer a estrutura das miotoxinas, além de definir os sítios tóxicos ou catalíticos, permitindo explorar

estes resultados em estudos de comparação e levar a um melhor entendimento do mecanismo de ação destas proteínas (ARNI *et al.*, 1995).

Miotoxinas purificadas possibilitam a produção de anticorpos policlonais e monoclonais (BORGES, 1995; LOMONTE e KAHAN, 1988), que são utilizados para neutralizar o veneno bruto e para estudos de reação cruzada entre miotoxinas de diferentes venenos. A pré-incubação do veneno bruto de *Bothrops asper* com antimiotoxinas deste mesmo veneno, levou à redução de 70% da miotoxicidade em músculo de camundongos (LOMONTE *et al.*, 1985). BORGES (1995) isolou duas miotoxinas do venenos de *Bothrops jararacussu* (BthTX-I e BthTX-II), a partir das quais produziu anticorpos policlonais e verificou a presença de reações cruzadas entre BthTX-I e BthTX-II, o que pode ser explicado pela alta homologia entre essas duas proteínas (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988). Estes anticorpos também foram capazes de reconhecer as miotoxinas presentes no veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES, 1996). Anticorpos policlonais contra miotoxinas mostraram reação cruzada em uma variedade de venenos brutos de diferentes espécies (LOMONTE *et al.*, 1985) e até entre gêneros (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, 1997), mostrando que miotoxinas-PLA₂ antigenicamente relacionadas ocorrem na maioria dos venenos botrópicos, permitindo um alto grau de reatividade cruzada entre os antivenenos equinos produzidos na América Latina e a maioria das espécies botrópicas. A presença de reações cruzadas, além de ser indicativa de parentesco evolutivo, torna possível a utilização do soro de uma espécie para combater os sintomas produzidos por outra, o que é essencial para a produção de soro à nível industrial (LOMONTE *et al.*, 1990b).

Os venenos botrópicos também induzem a formação de edema (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995). O edema local está frequentemente associado a acidentes ofídicos (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989) e é caracterizado pela saída do plasma e infiltração celular, envolvendo a participação de mediadores endógenos, tais como os eicosanóides, ativação dos fatores de agregação plaquetária, liberação de histamina e serotonina (TREBIEN e CALIXTO, 1989). O exudado inflamatório apresenta a maioria dos tipos celulares englobados na classe dos leucócitos. Leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos estão em grande quantidade nos primeiros estágios do processo inflamatório (CURY *et al.*, 1994). Assim, pode-se verificar que as células brancas do sangue apresentam uma estreita ligação no processo de formação de edema pelos venenos e são relevantes para o desenvolvimento da fase inflamatória aguda, não-imune.

Uma possível teoria para a liberação dos fatores inflamatórios seria que os materiais formados ou transformados na área afetada poderiam ter acesso aos vasos linfáticos, estimulando as células linfocíticas a liberarem os fatores inflamatórios ou

a migrarem para o local da injúria, exercendo aí atividades inflamatórias (BERSANI-AMADO e GARCIA LEME, 1982).

Acreditava-se que o edema induzido por fosfolipases parecia ser devido à habilidade destas em hidrolisar fosfolipídeos (LLORET e MORENO, 1993), mas foi observado que a miotoxina II de *Bothrops asper* pode induzir edema na ausência de atividade fosfolipásica (LOMONTE *et al.*, 1993), implicando em diferentes mecanismos de ação. A ação direta da miotoxina na célula muscular pode causar a rápida resposta do sistema de interleucina-6, provavelmente como uma consequência indireta da necrose muscular, levando a uma fase de resposta aguda.

Os venenos das serpentes brasileiras apresentam também uma gama de enzimas proteolíticas que atuam em vários substratos naturais tais como: caseína, hemoglobina, colágeno, gelatina, elastina, fibrinogênio, insulina e glucagon (IWANAGA e SUZUKI, 1979). Dentre estas enzimas, algumas são proteínas hemorrágicas que degradam proteínas da matriz extracelular (MATRISIAN, 1992), outras atuam na coagulação do sangue: são procoagulantes (MARKLAND e DAMUS, 1971; SELISTRE e GIGLIO, 1987), ou são anticoagulantes (DAOUD *et al.*, 1986). Os venenos atuam na atividade coagulante por diferentes mecanismos: diretamente sobre o fibrinogênio, ativação do fator X, fator V e da protrombina, por ação plaquetária e por ter atividade semelhante à tromboplastina. Estes venenos apresentam uma mistura de diferentes serino-proteases e de metaloproteinases que podem inibir a agregação plaquetária *in vitro* (OUYANG *et al.*, 1979).

O estado normal de fluidez do sangue na circulação é mantido por propriedades não trombogênicas que ocorrem nas paredes dos vasos sanguíneos, nas quais danos levam ao disparo de uma resposta dos componentes hemostáticos (BITHELL, 1993). Estes componentes são representados pela própria parede dos vasos que se contrai devido à liberação de agentes vasoativos, pelas plaquetas circulantes que apresentam propriedades adesivas e de agregação e os fatores de coagulação sanguínea, que levam à formação dos coágulos de fibrina, os quais são posteriormente removidos por uma enzima fibrinolítica denominada de plasmina. Com a lesão no vaso, o colágeno e as microfibrilas da matriz extracelular ficam expostos. As proteínas adesivas, o fator de von Willebrand e o colágeno atuam promovendo a adesão das plaquetas às estruturas subendoteliais. Os receptores plaquetários destas proteínas adesivas são as glicoproteínas (WEISS *et al.*, 1986) e as integrinas (SANTORO, 1988). A interação destes receptores estimula as plaquetas a secretarem seus conteúdos granulares: tromboxana A₂ e serotonina (que promovem a vasoconstrição) e ATP, Ca⁺², ADP que ativam a $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrina que se liga ao fibrinogênio e ao fator de von-Willebrand, promovendo a agregação plaquetária e a formação do tampão que impede o sangramento. Nos casos, onde

qualquer um dos componentes deste mecanismo é alterado, a hemostasia é comprometida, podendo resultar em sangramento.

Na etapa final do processo de coagulação sanguínea, a trombina hidrolisa as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio, retirando pequenos fragmentos denominados de fibrinopeptídeos A e B, que são convertidos em fibrina solúvel (BLOMBACK e VESTEMARK, 1958). Então, os monômeros de fibrina resultante se polimerizam para formar a rede de fibrina insolúvel (BLOMBACK *et al.*, 1978).

Várias enzimas coagulantes com especificidade semelhante à trombina têm sido purificadas dos venenos de serpentes (MAGALHÃES *et al.*, 1981; PIRKLE e STOCKER, 1991; CHANG e HUANG, 1995; ZAGANELLI *et al.*, 1996, OLIVEIRA, 1997) devido ao seu potencial terapêutico e estão sendo usadas como modelo para se entender melhor o modo de ação do sistema de coagulação sanguínea e também em tratamentos clínicos de distúrbios do sistema de coagulação, prevenindo trombos e melhorando a viscosidade do sangue (STOCKER e MEIER, 1988).

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática de PM 330.000. É um dímero composto por três pares de cadeias polipeptídicas $(A\alpha B\beta\gamma)_2$ ligadas por pontes dissulfeto (DOOLITTLE, 1984). No mecanismo de hemostasia, esta glicoproteína, funciona como um ligante na agregação plaquetária e como substrato para a trombina na coagulação sanguínea, como descrito acima. Na agregação plaquetária, o ADP, a adrenalina ou a trombina permitem a ligação do fibrinogênio ao receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrina devido à alterações na sua conformação. Esta ligação se dá através de 2 sítios específicos, sendo um deles denominado de domínio RGD (Arg-Gly-Asp) presente na cadeia α (HAWIGER *et al.*, 1989), enquanto o segundo sítio de ligação localiza-se na cadeia γ do fibrinogênio (HAWIGER *et al.*, 1982).

Algumas enzimas anticoagulantes encontradas nos venenos de serpentes atuam diretamente sobre o fibrinogênio e/ou fibrina levando à incoagulabilidade sanguínea. A jararagina, uma metaloproteinase encontrada no veneno de *Bothrops jararaca*, cliva o fibrinogênio na porção C-terminal da cadeia $A\alpha$, causando a remoção da sequência RGD e conseqüentemente impedindo a agregação plaquetária e também a formação da rede de fibrina. As cadeias β e γ do fibrinogênio não são afetadas pela jararagina (KAMIGUTI *et al.*, 1996).

A hemorragia geralmente aparece logo após o envenenamento e pode ser acompanhada por necrose em volta da área atingida. Resulta em um dos principais efeitos locais, podendo também apresentar-se de forma sistêmica. Dois prováveis mecanismos de ação para a hemorragia têm sido descritos. Um onde as hemáceas e outros componentes do sangue saíam do vaso danificado por diapedese através das junções abertas entre as células, devido à ação proteolítica do veneno. E um

segundo, onde as hemáceas e os componentes sanguíneos saíam através de espaços formados dentro das células endoteliais (OWNBY, 1990). Várias hemorraginas já foram purificadas dos venenos de *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. asper* (MANDELBAUM *et al.*, 1976; ASSAKURA *et al.*, 1985, 1986; PAINE *et al.*, 1992; BORKOW *et al.*, 1993), de *Crotalus viridis* (MACKESSY, 1996) e de *Agkistrodon acutus* (ZHU *et al.*, 1997).

Como já foi dito, as toxinas hemorrágicas presentes nos venenos de viperídeos e crotalídeos são principalmente metaloproteínases e produzem sangramento local devido à lesões nas paredes dos pequenos vasos (OHSAKA, 1979; OWNBY, 1990). Estas enzimas degradam as principais proteínas da matriz extracelular (BJARNASON e FOX, 1988) e muitas delas são dependentes de zinco e podem ser inibidas por quelantes de metais (BJARNASON e FOX, 1994).

Pesquisas mais recentes de elucidação da estrutura primária de metaloproteínases de alto peso molecular revelam uma nova família de proteínas designada de Família desintegrina-metaloproteínase (KINI e EVANS, 1992) que se caracteriza por apresentar um domínio metaloproteínase contendo o íon zinco e um domínio semelhante às desintegrinas presentes em venenos de serpentes, porém este domínio não possui a sequência RGD e sim a sequência ECD (Glu-Cys-Asp).

As desintegrinas dos venenos formam um grupo de polipeptídeos inibidores da agregação plaquetária. Estas proteínas apresentam um baixo peso molecular e contêm as sequências RGD (Arg-Gly-Asp) ou KGD (Lys-Gly-Asp), permitindo portanto, a ligação destes componentes aos receptores integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$) na superfície das plaquetas e inibindo a agregação plaquetária, pois impedem a ligação ao fibrinogênio (SCARBOROUGH *et al.*, 1993). Como as desintegrinas-metaloproteínases não contêm a sequência RGD, ainda não se sabe qual a função que este domínio semelhante à desintegrina desempenha (KAMIGUTI *et al.*, 1996). Talvez ele apresente uma função de reconhecimento celular pois os domínios desintegrina e metaloproteínase foram encontrados também em algumas proteínas de mamíferos, constituindo a família ADAM (que são proteínas de mamíferos contendo domínio desintegrina e metaloproteínase) e estão envolvidos em vários eventos de interação celular.

Como exposto acima, os venenos produzem efeitos lesivos que podem danificar órgãos e membros de modo irreversível. Apesar desta alta toxicidade, os casos de letalidade apresentados pelos venenos botrópicos são raros, pois a letalidade bem como outras atividades é dependente da quantidade e da qualidade das toxinas presentes nos venenos.

Por outro lado, as abelhas, principalmente aquelas pertencentes a espécie *Apis mellifera*, também são responsáveis por um grande número de acidentes.

Nestes casos, as toxinas presentes nestes venenos desencadeiam a liberação de mediadores químicos da resposta alérgica, o que também pode em casos mais graves culminar com a morte do vítima. Aproximadamente de 0,3 a 3% da população têm alergia a algum tipo de insetos (KING, 1997).

Os principais componentes do veneno de *Apis mellifera* são proteínas e peptídeos, onde se destacam a melitina e a fosfolipase A₂ (OWNBY *et al.*, 1997). A melitina representa 40 a 50% do peso seco do veneno de abelhas, é um peptídeo altamente básico com 26 resíduos de aminoácidos e é um fraco alergênico (KING, 1997), mas é capaz de danificar a membrana celular (HABERMANN, 1972) por processos ainda não muito claros (DEMPSEY, 1990). Pode atuar ainda em eritrócitos, leucócitos e trombócitos, provocando a lise direta (FLETCHER e JIANG, 1993).

A fosfolipase A₂ juntamente com a fosfatase ácida e a hialuronidase são as principais proteínas alergênicas encontradas no veneno de *Apis mellifera* (HOFFMAN, 1977). A fosfolipase A₂ purificada corresponde cerca de 10 a 12% do peso seco do veneno e não é capaz de hemolisar a membrana dos eritrócitos, mas quando combinada com a melitina provoca a lise das hemáceas (VOGT *et al.*, 1970). As PLA₂ causam hemólise indireta dos eritrócitos, reduzem a resistência e o potencial de membrana e danificam a mielina (ROSENBERG, 1990).

OWNBY *et al.* (1997), observou que a melitina e a fosfolipase A₂ apresentam atividade miotóxica independentemente, sendo a mionecrose provocada pela PLA₂ semelhante à provocada pela melitina. Na natureza estas duas proteínas, com claras evidências, atuam sinergicamente.

MOLLAY e KREIL (1974) descobriram que a melitina forma um complexo com fosfolipídeos, perturbando o posicionamento de alguns fosfolipídeos e tornando-os acessíveis à hidrólise pela PLA₂. O mecanismo de hidrólise dos fosfolipídeos deve ser semelhante tanto para as PLA₂ do veneno de serpentes quanto para o complexo melitina-PLA₂ dos venenos de abelhas, já que a mionecrose final é muito semelhante.

Entender melhor os mecanismos pelos quais atuam as toxinas animais é o grande desafio de todos os pesquisadores que buscam dia-a-dia alternativas viáveis para reduzir ou eliminar esses efeitos.

Atualmente, a soroterapia tem sido o caminho mais tradicional para se tratar os casos de ofidismo. Entretanto, a eficiência dessa terapia depende, além de outros fatores, diretamente do tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento, principalmente em relação aos efeitos locais que não são revertidos pelo soro antiofidico. A falta ou a escassez de anticorpos para toxinas específicas (OWNBY *et al.*, 1979; LOMONTE *et al.*, 1991) ou ainda a rápida ação destas quando

comparadas à baixa distribuição dos anticorpos para a neutralização (OWNBY *et al.*, 1986; GUTIÉRREZ *et al.*, 1987) representam os principais motivos pelos quais nem sempre a soroterapia é capaz de resolver os problemas causados por acidentes ofídicos.

É importante ressaltar também que no Brasil, a produção de soros antiofídicos é destinada quase que exclusivamente aos acidentes humanos, deixando de lado uma parcela economicamente importante, que são os animais de raça ou geneticamente selecionados. Sem contar os acidentes com abelhas que são tratados com anti-histamínicos, pois não há soroterapia nestes casos.

Assim é preciso buscar novos métodos para neutralizar estas toxinas.

As plantas estão presentes na natureza em abundância e são de fácil acesso, por isso se tornaram a primeira tentativa do homem no que diz respeito à cura de suas doenças. O espírito humano, essencialmente curioso e dotado de grande capacidade imaginativa levou ao acúmulo gradual do conhecimento das propriedades terapêuticas das plantas medicinais.

O uso de extratos vegetais vem se difundindo cada vez mais, mas somente uma pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente e menos ainda farmacologicamente. Os estudos farmacológicos são decisivos na descoberta de produtos isolados que apresentam uso terapêutico direto, ou cujas estruturas sirvam de modelo na busca e síntese de novas drogas. Atualmente, grande parte dos medicamentos sintéticos apresentam substâncias derivadas de plantas, tais como anti-maláricos (quininos), anti-amebianos (ipeca), analgésicos (morfina) e anti-coagulantes (dicumarol). Ao mesmo tempo, não se pode esquecer que o uso destas plantas deve ser racional, a fim de não levar nenhuma espécie à extinção, ou causar um desequilíbrio ecológico.

Os objetivos da pesquisa neste campo são especialmente a investigação da segurança (toxicidade, dose efetiva) dos extratos, sua eficiência e a constância da atividade, a identificação e o isolamento do princípio ativo, a determinação de sua estrutura, a possibilidade de síntese e de modificações desse princípio.

Geralmente, os princípios ativos extraídos dos vegetais são produtos metabólicos secundários (denominados de produtos naturais) decorrentes da adaptação à diferentes estações do ano, tipo de solo, pH, umidade, temperatura, dentre outros fatores. Estes produtos se distribuem diferentemente nas diversas partes do vegetal, como raízes, caule ou folhas e sua composição varia de espécie para espécie e até mesmo dentro de uma espécie (não são de distribuição universal, como os metabólitos primários). Além disso, estes metabólitos secundários apresentam estrutura química complexa e a maioria deles não tem uma função definida no organismo onde se encontra (GEISSMAN e GROUT, 1969). Por isso, é

muito importante a padronização por parte dos pesquisadores e usuários quanto à classificação correta da planta, época e local de coleta, parte utilizada e modo de preparo do extrato vegetal.

Entre os produtos secundários já encontrados em plantas, pode-se citar os taninos, as lignanas, os alcalóides e os terpenos.

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água e com peso molecular entre 500 e 3000. Apresentam grande toxicidade, sendo necessário cuidados especiais quanto a dosagem. Formam precipitados insolúveis com proteínas em meio aquoso, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. Esses taninos quando se complexam com proteínas vegetais, limitam sua digestibilidade, sendo esta uma importante fonte de controle de insetos, fungos ou bactérias e também de utilização na indústria de manufatura do couro. Farmacologicamente, os taninos apresentam efeitos antiinflamatórios na boca e garganta, pois bloqueiam a liberação ou ativação de mediadores da inflamação e previnem a formação da placa dentária e também são bons antidiarréicos, porque impedem a secreção de eletrólitos na luz intestinal (MELLO e CORTEZ, 1997).

As lignanas são produtos secundários do metabolismo de plantas que apresentam larga distribuição na natureza e devido às suas diversas atividades biológicas (antitumoral, hipertensiva, sedativa e antibacteriana, inibidor do crescimento de plantas e antifúngico) tem atraído o interesse de muitos pesquisadores. Recentemente, tem-se isolado lignanas de animais, incluindo os humanos (MELLO e CORTEZ, 1997).

Os alcalóides são substâncias encontradas em plantas e em menor quantidade em microorganismos e animais. Apresentam uma atividade fisiológica intensa o que contribuiu para estimular as primeiras investigações que levaram ao isolamento e à caracterização de alguns alcalóides como a estriquinina, morfina, quinina, cocaína e nicotina. Frequentemente, estas substâncias ativas fisiologicamente, apresentam grande toxicidade, por outro lado muitos alcalóides têm propriedades farmacológicas de uso terapêutico importantíssimo, quando usados em doses subletais. Estes compostos são de grande interesse não apenas para a medicina, mas também para os químicos orgânicos, que investigam as várias vias biossintéticas pelas quais eles são produzidos (GEISSMAN e CROUT, 1969).

Os terpenos são substâncias voláteis e por isso são facilmente descobertos pela fragrância exalada da planta, podendo ser obtidos pela simples destilação das folhas e caule. São chamados de óleos essenciais e são usados na indústria de alimentos, perfumaria e medicina (GEISSMAN e CROUT, 1969).

O uso de plantas medicinais para tratamento de acidentes com serpentes é muito difundido entre a população. Há muitas histórias e poucos são os

conhecimentos científicos a respeito das prováveis características apresentadas por estas plantas.

Desse modo, deve-se dar importância à trabalhos que visem conhecer melhor os efeitos que estas plantas apresentam quando usadas para tratar acidentes com animais peçonhentos.

O extrato alcoólico obtido da planta *Eclipta prostrata*- Asteraceae, conhecida como erva botão, neutralizou 4DL₅₀ do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, quando este foi pré-incubado com extrato vegetal 30 minutos antes da injeção em camundongos. Desta planta, separou-se três constituintes básicos: Wedelolactona, stigmasterol e sitosterol, que também apresentaram proteção contra doses letais deste veneno (MARTZ, 1992). MELO *et al.* (1994) também testaram os efeitos tanto do extrato bruto aquoso de *Eclipta prostrata* quanto da Wedelolactona. Os resultados obtidos mostraram a presença de substâncias antiproteolíticas e anti-hemorragicas, sugerindo a eficiência desta planta e de seus componentes no tratamento de envenenamentos.

O extrato aquoso de *Curcuma longa*- Zingiberaceae, popularmente conhecida como Açafrão, inibe uma neurotoxina extraída do veneno de *Naja naja siamesis* (CHERDCHU *et al.*, 1978). FERREIRA *et al.* (1992b) estudaram a fração ar-turmerone, isolada deste extrato e verificaram a inibição da hemorragia provocada pelo veneno de *Bothrops jararaca*, quando este era complexado com esta fração. A dose letal do veneno de *Crotalus durissus terrificus* também foi inibida em 66% quando misturou-se 12,5µg de veneno com 700µg de ar-turmerone (proporção de 1:58, respectivamente).

PACHECO *et al.* (1995) verificaram a eficiência terapêutica do extrato aquoso obtido das sementes frescas ou secas de quiabo (*Hibiscus esculentus* Malvaceae) na inibição de duas DL₅₀ do veneno de *Bothrops jararaca*. O extrato obtido por maceração a frio ou a quente, foi ingerido pelos animais em experimento uma ou duas horas antes da injeção do veneno. A proporção de extrato foi de 2g/kg (sementes frescas) ou de 1g/kg de peso (sementes secas) dos animais teste. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato a frio não ofereceu uma proteção estatisticamente significativa, enquanto os animais que receberam o extrato a quente, seja das sementes frescas ou secas, uma hora antes da injeção foram protegidos por até 12 horas. Outro dado obtido, foi que o extrato das sementes frescas ofereceram maior proteção mesmo quando ingerido 2 horas antes da injeção.

O chá das folhas de *Brunfelsia uniflora* - Solanaceae (manacá) é utilizado no interior de São Paulo para o tratamento de acidentes ofídicos (RIZZINI *et al.*, 1988).

PEREIRA *et al.* (1992), verificaram a inibição do edema de pata provocado pelo veneno de *Bothrops jararaca*, utilizando o extrato aquoso das folhas desta planta via oral e obtiveram um significativo resultado, tendo mais de 72% de inibição do edema.

A alcachofra (*Cynara scolymos*-Asteraceae) é utilizada por comunidades rurais do Rio de Janeiro antes de percorrerem regiões onde há ocorrência de serpentes. Baseado neste fato, RUPPELT *et al.* (1990) investigaram o extrato aquoso desta planta e comprovaram a presença de componentes com propriedades analgésicas e antiinflamatória.

A planta *Casearia sylvestris* (figura 1) é conhecida popularmente no Brasil como Guaçatonga, Erva de Bugre dentre outros nomes e é empregada na medicina popular como anti-séptica, cicatrizante, anestésico tópico e antiofídica (BORGES *et al.*, 1998).



A



B



C

Fig.1: A- Serpente *Bothrops jararacussu*

B- Serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis*

C- Planta *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)

SOUZA *et al.* 1997, extraíram o óleo essencial de *Casearia sylvestris* de acordo com a Farmacopéia Brasileira e verificaram que este óleo apresentava propriedades antimicrobianas sobre vários microorganismos, dentre eles o *Bacillus subtilis*.

Para verificar a atividade antiúlcera e a toxicidade apresentada por esta planta, BASILE *et al.* (1990) prepararam um extrato bruto etanólico das folhas secas e administraram oralmente em modelos animais. Como resultados, eles verificaram que o extrato das folhas de *Casearia sylvestris* exerceu um significativo efeito preventivo antiúlcera e apresentou uma baixa toxicidade (DL₅₀ 1,840mg/kg animal).

RODRIGUES *et al.* (1997) verificaram a ação do óleo essencial de *Casearia sylvestris* no edema e na permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *Bothrops alternatus* e por histamina. Os resultados obtidos mostraram que o óleo de *Casearia sylvestris* inibiu significativamente o edema e a permeabilidade vascular, quando estes efeitos foram induzidos tanto pelo veneno quanto pela histamina, sugerindo uma estreita relação entre os mecanismos desencadeados pelo veneno e o mediador inflamatório, já que o veneno também leva à liberação desses mediadores.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Identificar em áreas de cerrado e matas do município de Uberlândia-MG, plantas descritas na literatura e utilizadas pela população como antiofídicas;
- Preparar o(s) extrato(s) vegetal(is) aquoso(s) e verificar o potencial inibitório da atividade PLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu*;
- Analisar e selecionar o melhor extrato;
- Explorar a capacidade neutralizadora do extrato selecionado quanto às diversas atividades desencadeadas por venenos de serpentes e abelhas;
- Caracterizar parcialmente os constituintes do Extrato Vegetal selecionado utilizando testes de solubilidade, cromatografia líquida em coluna e espectroscopia por ressonância magnética de prótons (RMN¹H) e infravermelho.

Esta última abordagem foi realizada em trabalho de colaboração pelos Prof. Doutores Edson Rodrigues Filho (Universidade Federal de São Carlos - UFSCar) e Welington de Oliveira Cruz (Universidade Federal de Uberlândia - UFU).

2- MATERIAIS:

2.1- Venenos Brutos:

Os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) e pela Prof^a. Vera Lúcia Brites do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia. Estes venenos foram inicialmente dessecados à vácuo, à temperatura ambiente e posteriormente mantidos a -20°C. O veneno de *Apis mellifera* foi coletado no apiário mantido na Universidade Federal de Uberlândia, através de pequenos choques que provocam a liberação do veneno pelas abelhas em uma placa. Após a coleta, o veneno cristalizado foi raspado e mantido a -20°C.

2.2- Extratos Vegetais:

Os exemplares utilizados foram colhidos na Fazenda Panga, no Clube Caça e Pesca e Itororó e nos arredores do Campus Umuarama, no município de Uberlândia-MG. As plantas foram devidamente identificadas pela Botânica Prof. Ana Angélica Almeida Barbosa (Departamento de Biociências, Universidade Federal de Uberlândia), que orientou para que fosse feita uma coleta racional, de modo a se ter um melhor aproveitamento da planta e ao mesmo tempo sem prejudicar o meio ambiente. Depois de colhidas, as plantas foram protegidas em sacos plásticos e armazenadas em caixa com gelo até o preparo da solução do extrato. As espécies colhidas foram: *Casearia sylvestris* (caule e folhas), *Bidens pilosa* (folhas) e *Sena rugosa* (raiz e folhas).

2.3- Reagentes para Eletroforese, Dosagem Protéica e Atividades Enzimáticas:

Acrilamida, Bis-acrilamida (N,N-metilenobisacrilamida), TEMED (N,N,N'-N''-tetrametiletlenodiamino), SDS (dodecil sulfato de sódio), Coomassie Brilliant Blue R-250, Padrões de Peso Molecular (LMW), EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), Soroalbumina bovina, Azul de Bromofenol, β -Mercaptoetanol, Persulfato de Amônio, Desoxicolato de Sódio foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA)

O plasma bovino foi obtido de animais saudáveis, disponíveis no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

O fibrinogênio foi gentilmente doado pelo Prof. José Roberto Giglio, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.4- Animais:

Os testes *in vivo* utilizaram camundongos da raça Swiss, fornecidos pela Vallée Nordeste e Pentapharm.

Ratos Wistar foram gentilmente doados pela Faculdade Medicina de Ribeirão Preto - USP.

2.5- Materiais para Cromatografia e Obtenção dos Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Infravermelho:

Resina Sephadex LH-20, Espectrômetro Brucken ARX-400 e espectrofotômetro Bomem Modelo M102 do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3- MÉTODOS:

3.1- Preparo da Solução de Veneno:

As amostras de veneno foram preparadas imediatamente antes do uso para se evitar perdas. 5,0mg do veneno foram pesados, dissolvidos em 100,0 μ l de solução salina e centrifugados à 2.500g por 10,0min em centrífuga Micro Centaur e o sobrenadante coletado. Em seguida acrescentou-se mais 100,0 μ l de solução salina ao precipitado formado e novamente centrifugou-se nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante retirado foi misturado ao primeiro.

3.1.1- Dosagem de Proteínas (ITZHAKI e GILL, 1964).

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de veneno, soluções contendo 0,1 a 2,0mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto. A soroalbumina bovina foi utilizada para estimar a reta padrão. As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1,0ml com água, aos quais se acrescentou 500,0 μ l dos reagentes R1 ou R2 (previamente preparados em nosso laboratório) e a seguir foi feita a leitura em espectrofotômetro (SPEKOL) a 310nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 é composto por 0,21% CuSO₄.5H₂O dissolvido em NaOH 30,4% e o R2 é formado por uma solução de NaOH a 30%.

As principais vantagens deste método consistem na estabilidade dos reagentes que permanecem em boas condições à temperatura ambiente, por mais de 1,0 ano e na estabilidade do complexo proteína/reagente permitindo um maior tempo entre o preparo das amostras e a leitura.

3.2- Preparo dos Extratos Vegetais:

Os extratos vegetais foram preparados a partir das folhas, do caule e das raízes (MARTZ, 1992; MELO *et al.*, 1994; BATINA, 1997). As folhas foram lavadas e trituradas com água desionizada em um liquidificador comum por 15,0 minutos e filtradas em uma peneira plástica fina. O filtrado foi centrifugado à 30.000g por 20,0 minutos em centrífuga Himac CR21 e o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C. A raiz e/ou caule foram lavados em água desionizada e colocados para secar em estufa à 40°C, até que estivessem completamente secos. Após a secagem, foram moídos e triturados em água desionizada. Essa solução foi centrifugada como descrito acima e o sobrenadante retirado, liofilizado e armazenado a -20°C. No momento do experimento o extrato foi pesado e dissolvido em água desionizada.

3.3- Estudos de Inibição:

A inibição da toxicidade dos venenos pelos extratos vegetais foi realizada por ensaios *in vitro* e *in vivo* representativos dos principais efeitos lesivos causados por estes venenos, a saber: Atividades fosfolipase A₂, coagulante, fibrinogenolítica, miotóxica, hemorrágica, edematogênica e letalidade.

Para cada ensaio foram feitos inicialmente controles positivos (na presença apenas de veneno) e controles negativos (presença apenas do extrato vegetal). A seguir, as amostras de veneno foram incubadas com os extratos à temperatura ambiente por 1,0 hora antes do teste. A proporção da mistura (veneno bruto:extrato vegetal) foi investigada e posteriormente definida para cada ensaio. A quantidade de veneno utilizada foi obtida pela dosagem de proteínas, enquanto o extrato foi pesado.

3.3.1- Atividade Fosfolipase A₂ (PLA₂) (DE HAAS *et al.*, 1968).

Este ensaio utiliza como substrato uma gema de ovo dissolvida em 50,0ml de água desionizada, desoxicolato de sódio 0,03M e CaCl₂ 0,6M. No momento do teste, prepara-se uma solução de trabalho com 15,0ml de suspensão de gema de ovo, 10,0 ml de desoxicolato de sódio e 1,0 ml de CaCl₂, completando-se o volume final para 100,0 ml de solução com H₂O desionizada. Para cada ensaio foram utilizados 10,0 ml desta solução, acertando-se o pH inicial para 8,0 com solução de NaOH 0,1208N. A liberação dos ácidos graxos pela fosfolipase A₂, a partir dos fosfolipídeos, foi medida durante a titulação potenciométrica, usando-se novamente a solução padrão de NaOH 0,1208N durante os 3,0 primeiros minutos de reação, à temperatura ambiente. Nestas condições, uma unidade de atividade fosfolipásica (PLA₂) corresponde à quantidade de base consumida, por minuto, por mg de proteína.

Inicialmente, este ensaio foi realizado para selecionar os extratos vegetais que mostraram o maior grau de inibição, quando incubados com o veneno de *B. jararacussu* na proporção de 10,0µg do veneno para 50,0µg dos extratos vegetais. Posteriormente, este ensaio foi novamente realizado com o extrato selecionado e os venenos de *Apis mellifera* e *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

3.3.2- Atividade Coagulante sobre o Plasma Bovino (ASSAKURA *et al.*, 1992).

Os testes de coagulação foram realizados a 37°C com 200,0µl de plasma bovino como substrato e 50,0µl da solução de veneno preparada em NaCl a 0,9%. Foi medido o tempo em segundos necessário para a formação da rede de fibrina na forma de um coágulo visível. Para os ensaios de inibição, foi obtida inicialmente a Dose Mínima Coagulante (DMC) para cada veneno. O teste foi realizado utilizando-

se 3DMC dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Para a neutralização dos venenos, estes foram incubados com o extrato vegetal na proporção de 1:3, respectivamente.

3.3.2.1- Cálculo da Dose Mínima Coagulante (DMC).

Para se calcular a DMC, foram realizados diversos ensaios de coagulação como descritos acima, para os venenos de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* em diferentes concentrações, obtendo-se assim o valor médio capaz de coagular o plasma em 1,0 minuto. A DMC é definida como a menor quantidade de veneno que coagula o plasma citratado a 37°C em 1,0 minuto.

3.3.3- Atividade Fibrinogenolítica (EDGAR e PRENTICE, 1973, modificado por OLIVEIRA, 1997).

À 50,0µl de uma solução de fibrinogênio (1,0mg/ml) acrescentou-se 1,0µg dos venenos brutos de *B. jararacussu* ou *B. neuwiedi*. A hidrólise enzimática ocorreu durante cinco minutos à 37°C, após os quais a reação foi interrompida por adição de 25,0µl de Stop (solução de Tris-HCl 0,1M pH 8,8, contendo glicerol a 10,0% e azul de Bromofenol a 0,1%) e 5,0µl de β-mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 16% com agente desnaturante.

3.3.3.1- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes (LAEMMLI, 1970).

Foi realizada a eletroforese com agente desnaturante (SDS) para caracterizar a atividade fibrinogenolítica. O gel de separação foi preparado a 16,0% e o de empilhamento a 5,0%. As amostras com Stop e β-mercaptoetanol foram aquecidas a 100°C em banho-maria por 3 minutos. 10,0µl de cada amostra foram aplicados ao gel, simultaneamente com os padrões de peso molecular, que foram: fosforilase b (94.000), soralbumina (67.000), ovoalbumina (43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α-lactoalbumina (14.400).

O tampão dos eletrodos foi composto por Tris-HCl 0,1M pH 8,3, EDTA 7,8mM, glicina 0,77M e SDS 0,3%. A corrida foi feita à uma corrente constante de 20,0mA por aproximadamente uma hora e trinta minutos, ou até o corante atingir a porção final da placa.

Posteriormente, o gel foi corado em Coomassie Brillhante Blue R-250 a 0,1% (m/v) dissolvido em água desionizada:metanol:ácido acético glacial (40:50:10 v/v) e descorados em água desionizada:etanol:ácido acético (60:30:10 v/v). Em seguida foi

colocado em solução fixadora formada por ácido acético a 7% e então foi secado em papel celofane.

3.3.4- Atividade Miotóxica (RODRIGUES, 1996).

Camundongos Swiss (25-30g) receberam injeções i.m. no músculo gastrocnêmio direito de 50,0µg dos venenos brutos incubados ou não com o extrato vegetal, na proporção de 1:5, respectivamente. Após 24 horas de inoculação, os animais foram anestesiados profundamente por inalação com éter e sacrificados. Os músculos foram retirados e fixados em uma mistura de etanol 95%, formol 30%, ácido acético glacial e água desionizada na proporção de 3:1:1:5 em volume durante 24 horas. Depois as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois e imersas em solução infiltradora e em endurecedor à temperatura ambiente. Então, foram obtidos cortes de 2,5µm de espessura em micrótomo (Leica Instruments), corados com azul de toluidina a 0,25% em água destilada à 40°C e montados em lâminas, que foram posteriormente fotografadas.

3.3.5- Atividade Hemorrágica (NIKAI *et al.*, 1984).

Injeções intradérmicas contendo 3 doses mínimas hemorrágicas (DMH) dos venenos brutos de *Bothrops jararacussu* ou de *Bothrops neuwiedi* dissolvidos em 50µl de salina, foram aplicadas no dorso de camundongos anestesiados com éter.

Após 3 horas, os animais foram sacrificados e as peles foram removidas. A presença de halos hemorrágicos na superfície interna da pele foi indicativa de atividade. O veneno foi incubado com o extrato vegetal na proporção de 1:3(massa de proteína/peso seco), respectivamente.

A dose mínima hemorrágica (DMH) é definida como a quantidade de veneno que produz um halo hemorrágico de cerca de 1 cm (BORKOW *et al.*, 1997). Para o veneno de *B. jararacussu* é de 150µg/camundongo (SOARES, 1994) e para o de *B. neuwiedi* é de 24µg/camundongo (RODRIGUES, 1996).

3.3.6- Atividade Edematogênica (LLORET e MORENO, 1993).

Ratos Wistar (180-200g) receberam injeções subplantar (pata direita) de 25µg do Veneno de *Bothrops jararacussu* dissolvidos em 100µl de salina. Igual volume de salina foi aplicado do mesmo modo na pata esquerda (controle). Os volumes de ambas as patas foram determinados em plestimógrafo computadorizado em vários intervalos de tempo após a injeção. Nestes experimentos, a proporção de

veneno para extrato vegetal foi de 1:5(massa proteína/peso seco), respectivamente. Os resultados foram calculados pela diferença entre os valores obtidos em cada pata e foram expressos como a porcentagem do aumento do volume de pata direita em relação à pata esquerda.

3.3.7- Inibição da Toxicidade do Veneno.

Nestes ensaios, a toxicidade foi medida aplicando-se 2 DL₅₀ (dose letal 50%) de cada veneno: *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi* via intraperitoneal em camundongos, previamente anestesiados com éter. Nos testes de inibição foram incubadas 2DL₅₀ de cada um dos venenos com os extratos vegetais, na proporção de 1:10(massa proteína/peso seco), respectivamente, durante uma hora à temperatura ambiente.

A DL₅₀ de *B. jararacussu* é de aproximadamente 6,3mg/Kg de animal e foi estimada por HOMSI-BRANDEBURGO (1987). Enquanto a de *B. neuwiedi* foi determinada neste trabalho, segundo o método de WEIL (1952).

DL₅₀ significa a menor dose capaz de matar 50% dos animais experimentais. O método de WEIL (1952) permite calcular a DL₅₀ usando números pequenos de animais por grupo. De acordo com este número, pode-se estimar a DL₅₀ com base em tabelas que apresentam um alto grau de confiança.

Para se calcular a DL₅₀ de *B. neuwiedi*, foram separados 4 grupos compostos por 4 animais. Cada grupo recebeu uma dose de veneno, dissolvido em salina, onde a menor dose foi de 1,0mg/kg de animal e a maior foi de 2,35 mg/Kg de animal. Os animais foram observados durante 24 horas.

3.4- Caracterização Parcial do Extrato Vegetal:

3.4.1- Teste de Solubilidade.

No intuito de investigar os componentes presentes no Extrato Vegetal, inicialmente foi realizado um teste de solubilidade deste extrato em diferentes solventes.

O teste utilizou 100,0ml de cada um dos seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetona, metanol e água que foram colocados separadamente em frascos âmbar (para controle da luminosidade). Posteriormente, 50mg do extrato liofilizado foram acrescentadas a cada frascó e então foi analisada a solubilidade.

3.4.2- Filtração em Sephadex LH-20.

O extrato aquoso de *Casearia sylvestris* foi fracionado em uma coluna cromatográfica utilizando como resina o Sephadex LH-20, que separa produtos naturais tais como esteróides, terpenóides, lipídeos e peptídeos de baixo peso molecular. Aproximadamente 200mg do extrato foram dissolvidos em 2,0 ml de metanol absoluto e adicionados à coluna previamente equilibrada com este mesmo solvente. A amostra foi eluída à temperatura ambiente, sendo coletadas 16 frações de 2,0ml cada. Esta coleta foi feita manualmente, as frações foram reunidas de acordo com suas características físicas (precipitação, coloração) e utilizadas para obtenção dos espectros de RMN¹H e infravermelho.

3.4.3- Espectro de Ressonância Magnética de Prótons (RMN¹H).

O espectro de absorção por RMN¹H permite conhecer o número, a natureza e a vizinhança de todos os prótons da molécula (MOURA CAMPOS, 1976).

Foi realizado a 400mHz, utilizando um espectrômetro Bruken ARX-400 (Departamento de Química da UFSCar). As amostras foram diluídas em metanol deuterado. A escala dos espectros é obtida em ppm.

3.4.4- Espectro de Infra Vermelho.

O espectro no infravermelho é interpretado em termos da presença ou ausência de grupos funcionais. Juntamente com o espectro de ressonância magnética nuclear representa uma eficiente ferramenta utilizada pelos químicos para deduzir a estrutura molecular de um composto (ALLINGER *et al.*, 1976).

Foram obtidos os espectros para as frações 11 a 13 e de 14 a 16 em espectrofotômetro Bomem Modelo M102 (Departamento de Química da UFSCar) com transformata de Fourier e Calibração interna, as absorções estão expressas em números de ondas (cm⁻¹).

4- RESULTADOS:

4.1- Atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂):

A atividade fosfolipásica (PLA₂) foi usada para selecionar os extratos vegetais que melhor apresentaram efeito inibitório contra os venenos de serpentes. Estas plantas foram escolhidas a partir da literatura e dos conhecimentos populares. A figura 2 mostra a porcentagem de inibição da atividade PLA₂ do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (controle) em relação às amostras incubadas com os extratos vegetais. Conforme se pode observar, o extrato vegetal da raiz de *Sena rugosa* (SR) não apresentou inibição, enquanto o de *Sena rugosa* folhas (SF) apresentou uma inibição de apenas 19%. Para o extrato vegetal de *Bidens pilosa* folhas foi observada uma atividade de 95,4%, ou seja aproximadamente 4,6% de inibição. Os melhores resultados obtidos foram para os extratos vegetais de *Casearia sylvestris*. Para CC (*Casearia* caule), a porcentagem de inibição da atividade PLA₂ foi de 60%, enquanto CF (*Casearia* folhas), apresentou apenas 17% de atividade (inibição de aproximadamente 83%). Os resultados acima foram estatisticamente analisados pelo teste de Tukey, conforme tabela 02, onde observa-se as médias, acompanhadas de seus respectivos desvios, da atividade PLA₂ para o veneno de *Bothrops jararacussu* e os extratos vegetais. As médias cujas letras são iguais não apresentam diferenças estatísticas significantes. Desse modo, *Casearia sylvestris* folhas e *Casearia sylvestris* caule são estatisticamente iguais e apresentam maior potencial de inibição que os outros extratos, seguido do extrato de *Sena rugosa* folhas, *Bidens pilosa* e *Sena rugosa* raiz.

Tab. 2: Atividade fosfolipase A₂ do veneno de *Bothrops jararacussu* em presença de vários extratos vegetais.

Amostra	Atividade PLA ₂ (Uds/mg/min)*	
<i>Casearia sylvestris</i> folhas	23,37±1,41	a
<i>Casearia sylvestris</i> caule	25,58±9,91	a
<i>Sena rugosa</i> folhas	65,54±8,10	b
<i>Bidens pilosa</i>	95,87±11,8	c d
<i>Sena rugosa</i> raiz	117,93±2,17	d e
<i>B. jararacussu</i> (Controle)	134,44±15,96	e

* Média de 3 ensaios

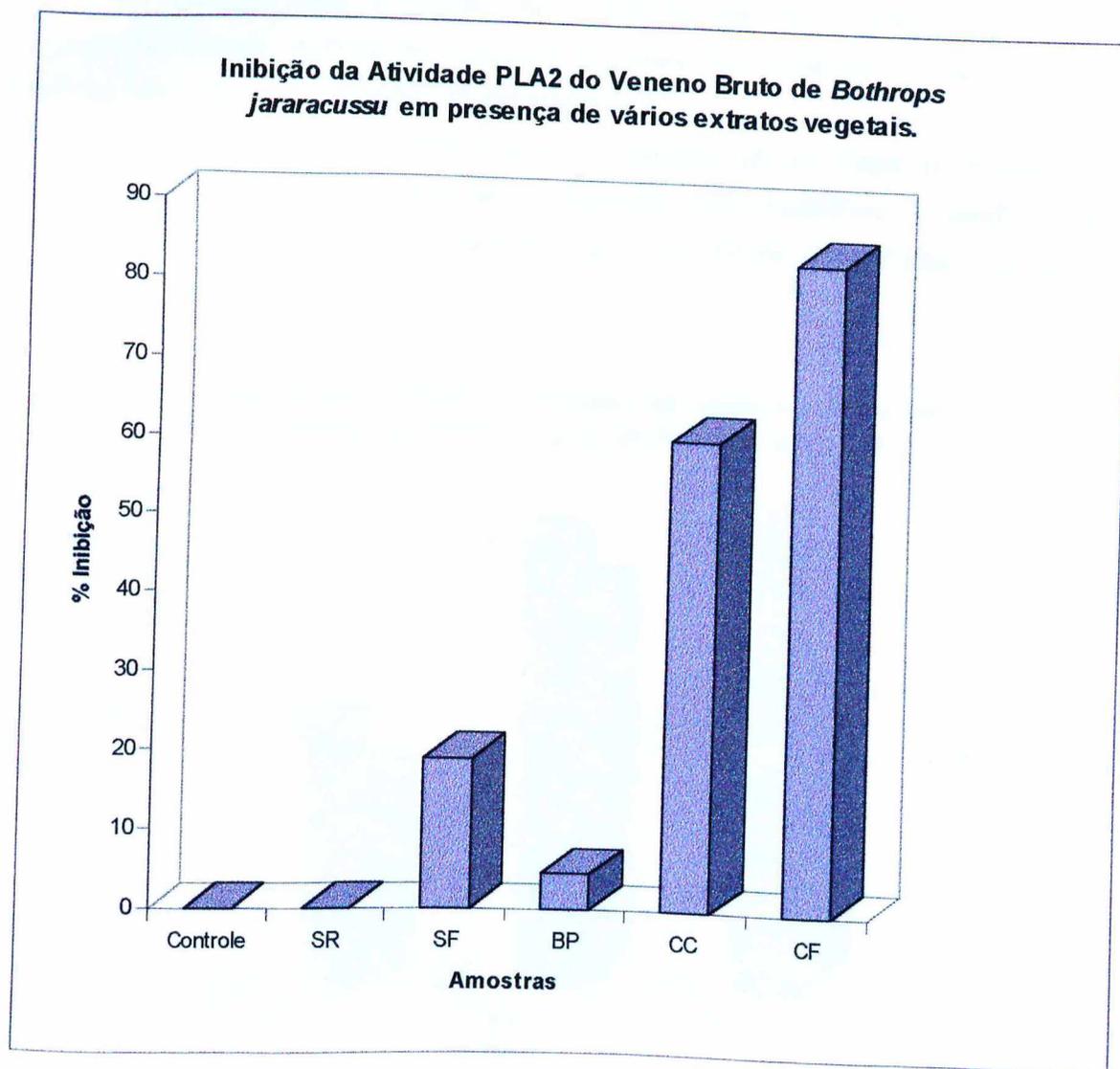


Fig. 2: Inibição da Atividade PLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu* em presença de vários extratos vegetais. O substrato utilizado foi uma emulsão de gema de ovo, desoxicolato de sódio 0,03M e Cloreto de Cálcio 0,6M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH padrão 0,1208N, durante os 3 primeiros minutos de reação à temperatura ambiente. Os resultados referem-se à média de 3 ensaios. Proporção 10µg Veneno:50µg Extrato Vegetal, 1:5, respectivamente

Legenda:

- Controle - Veneno bruto na ausência de Extratos vegetais
- SR - Veneno bruto incubado por 1 hora com o extrato de *Sena rugosa* - raiz.
- SF - Veneno bruto incubado por 1 hora com o extrato de *Sena rugosa* - folhas.
- BP - Veneno bruto incubado por 1 hora com o extrato de *Bidens pilosa* - folhas.
- CC - Veneno bruto incubado por 1 hora com o extrato de *Casearia sylvestris* - caule.
- CF - Veneno bruto incubado por 1 hora com o extrato de *Casearia sylvestris* - folhas.

A partir destas análises todos os outros experimentos de inibição foram realizados somente com o extrato de *Casearia sylvestris* (caule e folhas). Um controle utilizando apenas os extratos vegetais foi realizado e mostrou que os mesmos não induzem atividade fosfolipásica.

A figura 3 mostra a porcentagem de inibição da atividade fosfolipásica para os venenos de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, *Apis mellifera* e também para o veneno de *Bothrops jararacussu* que foi usado na seleção dos extratos vegetais.

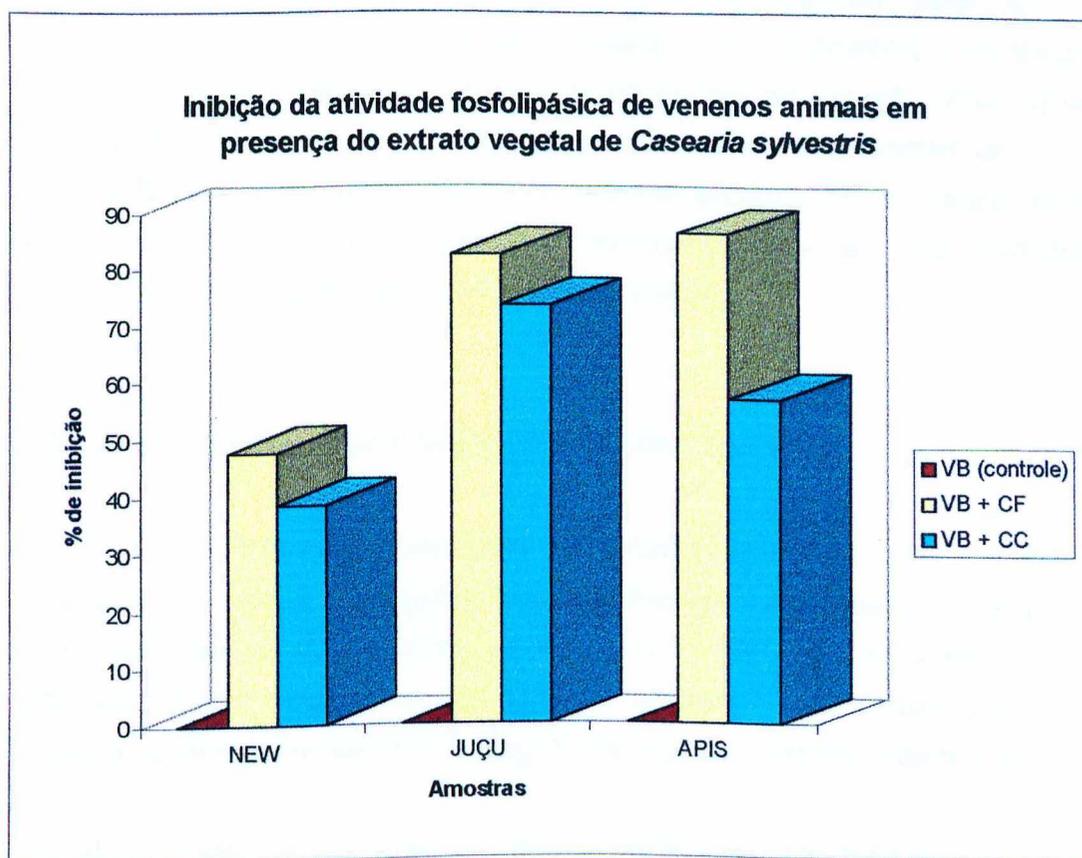


Fig. 3: Atividade Fosfolipase A₂ dos venenos brutos de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Apis mellifera* em presença ou ausência do extrato vegetal de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). O substrato utilizado foi uma emulsão de gema de ovo, desoxicolato de sódio 0,03M e Cloreto de Cálcio 0,6M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH padrão 0,1208N, durante os 3 primeiros minutos de reação à temperatura ambiente. Os resultados referem-se à média de 3 ensaios. Proporção Veneno:Extrato Vegetal, 1:5, respectivamente.

Legenda:

New: Veneno bruto de *B. neuwiedi pauloensis*.

Juçú: Veneno bruto de *B. jararacussu*.

Apis: Veneno bruto de *Apis mellifera*.

CC: *Casearia sylvestris* - caule.

CF: *Casearia sylvestris* - folha.

A atividade fosfolipásica A_2 do veneno bruto foi considerada 100% (ou seja, 0% de inibição). As amostras incubadas com a *Casearia* folhas (CF) apresentaram maior porcentagem de inibição: 50%, 83% e 86% para *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *Apis mellifera*, respectivamente. Já para *Casearia* caule (CC), as porcentagens de inibição foram menores, sendo de 38%, 70% e 60%, para *B. neuwiedi*, *Apis mellifera* e *B. jararacussu*, respectivamente. Nos testes de inibição utilizou-se 10 μ g de veneno para 50 μ g de extrato (proporção de 1:5, respectivamente).

Neste experimento, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, onde observou-se uma diferença altamente significativa na atividade PLA₂ do controle e do tratamento ($p < 0,001$), mostrando realmente a eficiência do extrato na inibição desta atividade. Também verificou-se pelo Teste de Tukey que apesar do extrato de *Casearia sylvestris* caule apresentar porcentagens de inibição menores que *Casearia sylvestris* folhas, estatisticamente essa diferença é insignificante e os dois extratos são igualmente eficientes, confirmando os resultados acima.

4.2- Atividade Coagulante sobre o Plasma Bovino:

A DMC (dose mínima coagulante) que corresponde à menor quantidade de proteínas capaz de causar a coagulação do plasma em 1,0 minuto, foi determinada para os venenos brutos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* conforme item 3.3.2 e apresentou os seguintes valores: VB *B. jararacussu*: 53 μ g e VB *Bothrops neuwiedi pauloensis*: 5,3 μ g. Estes valores correspondem à média de 9 ensaios.

A tabela 3 apresenta a média e o desvio padrão da atividade coagulante sobre o plasma bovino dos venenos brutos de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* comparando os tempos de coagulação das amostras em presença ou não do extrato vegetal *Casearia sylvestris*, na proporção de 1:3 (m/m), respectivamente. Os resultados foram estatisticamente testados pelo teste T e mostraram que apenas *B. jararacussu* incubado com *Casearia* folhas, apresentou diferenças significativas ($p = 0,036$), mostrando uma inibição de 38% da atividade coagulante. O tempo de coagulação para as outras amostras foi muito próximo ao controle, não havendo inibição significativa, como é mostrado pelo valor de p na tabela 3. E ainda podemos observar pela tabela 3 que os extratos testados não provocam coagulação do plasma.

Tab.: 3- Inibição da atividade coagulante veneno *B. jararacussu* e *B. neuwiedi pauloensis* sobre o plasma bovino em presença ou ausência do Extrato vegetal *Casearia sylvestris*.

Amostras	Tempo de Coagulação(segundos)		
	Controle	CC	CF
New	35,6±7,68	30,6±5,03 (p = 0,105)	27,6±0,58 (p = 0,199)
Juçu	50,8±2,31	50,0±3,75 (p = 0,604)	82,0±10,58 (p = 0,036)
CC	*	*	*
CF	*	*	*

* média de 3 ensaios Proporção Veneno:Extrato Vegetal - 1:3(m/m), respectivamente.

Legenda:

New: Veneno bruto de *B. neuwiedi pauloensis*

Juçu: Veneno bruto de *B. jararacussu*

CCaule: *Casearia sylvestris* - caule

CFolha: *Casearia sylvestris* - folha

* : não houve coagulação em até 4 minutos

Quanto ao veneno de abelhas embora testado não apresentou atividade coagulante, não sendo por isso apresentado na tabela 3.

4.3 Atividade Fibrinogenolítica:

O veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* provoca a quebra da cadeia α do fibrinogênio que ocorre quase totalmente nos primeiros 5 minutos de reação (figura 4, linha 3), não diferindo da linha 6 (figura 4) onde a reação enzimática ocorreu durante 15 minutos. Quando tratamos o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* com o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* folhas na proporção de 1:10 (m/m), observamos que não houve proteção da cadeia α , tanto para o tempo de 5 quanto para 15 minutos (figura 4, linhas 4 e 7). O extrato de *Casearia sylvestris* caule, apresentou um pequeno efeito protetor, pois parece que a cadeia α foi melhor preservada quando se usou este extrato (figura 4, linhas 5 e 8). A figura 4 mostra ainda que os extratos vegetais obtidos das folhas e do caule de *Casearia sylvestris* não apresentam qualquer efeito proteolítico sobre o fibrinogênio (linhas 9 e 10).

Na figura 5, observa-se a atividade fibrinogenolítica do veneno de *Bothrops jararacussu*. A linha 2 mostra as cadeias α , β e γ do fibrinogênio e na linha 3, o fibrinogênio foi tratado com o veneno durante 5 minutos, podendo ser observado que a cadeia α foi quase que totalmente degradada. Na linha 4, verifica-se que o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* folhas protegeu, embora parcialmente, a hidrólise do fibrinogênio, o mesmo ocorrendo na linha 5, onde o veneno foi

previamente tratado com o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* caule, que também preservou ainda que parcialmente a cadeia α do fibrinogênio.

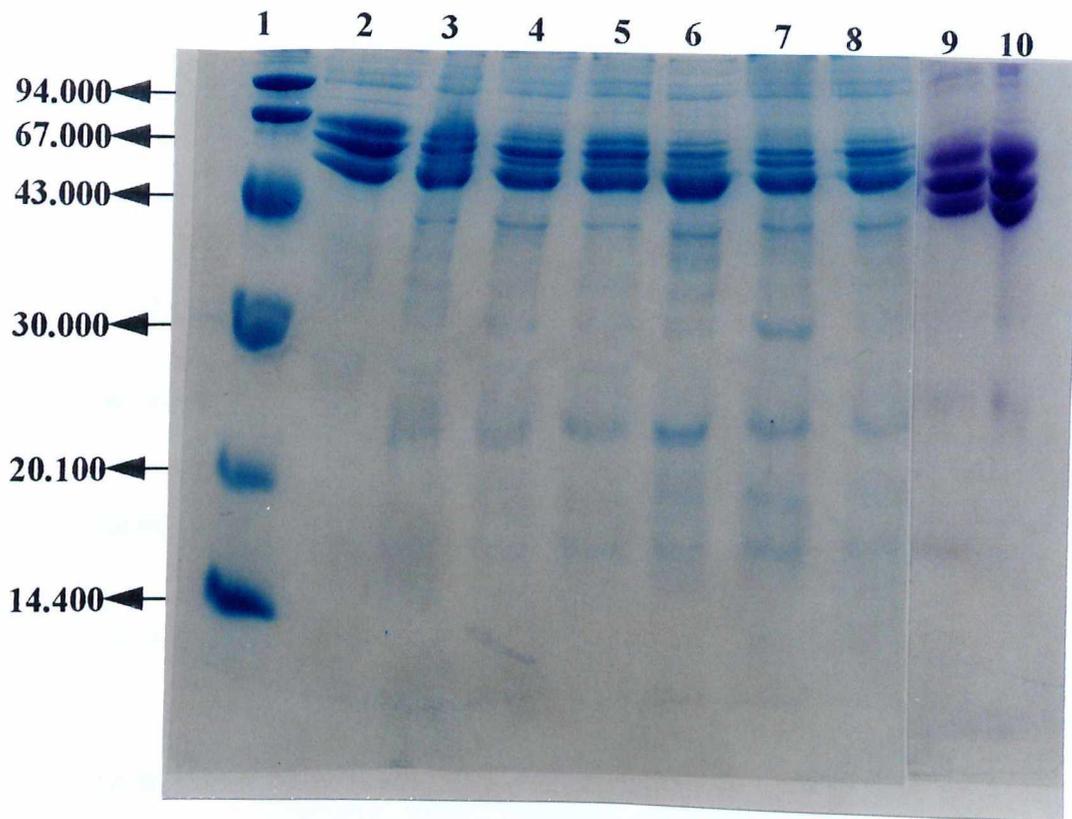


Fig. 4: Inibição da atividade Fibrinogenolítica do Veneno Bruto (VB) de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo Extrato Vegetal de *Casearia sylvestris*. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16% dos produtos de hidrólise de 50 μ l de fibrinogênio (1mg/ml) incubados com 1 μ g do VB a 37°C, durante diferentes tempos, como indicado. Os extratos vegetais foram utilizados na proporção de 1:10 (m/m)

Legenda:

- 1- Padrão (fosforilase b- 94.000; soroalbumina bovina - 67.000; Ovoalbumina- 43.000; Anidrase C.- 30.000; Inibidor de tripsina- 20.100; α -lactoalbumina - 14.400.
- 2- Fibrinogênio.
- 3- VB *Bothrops neuwiedi* - controle positivo (5 min. de hidrólise).
- 4- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* folhas (5 min. de hidrólise).
- 5- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* caule (5 min. de hidrólise).
- 6- VB *Bothrops neuwiedi* - controle positivo (15 min. hidrólise).
- 7- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* folhas (15 min. hidrólise).
- 8- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* caule (15 min. hidrólise).
- 9- *Casearia sylvestris* folhas- controle negativo (2 horas).
- 10- *Casearia sylvestris* caule- controle negativo (2 horas).

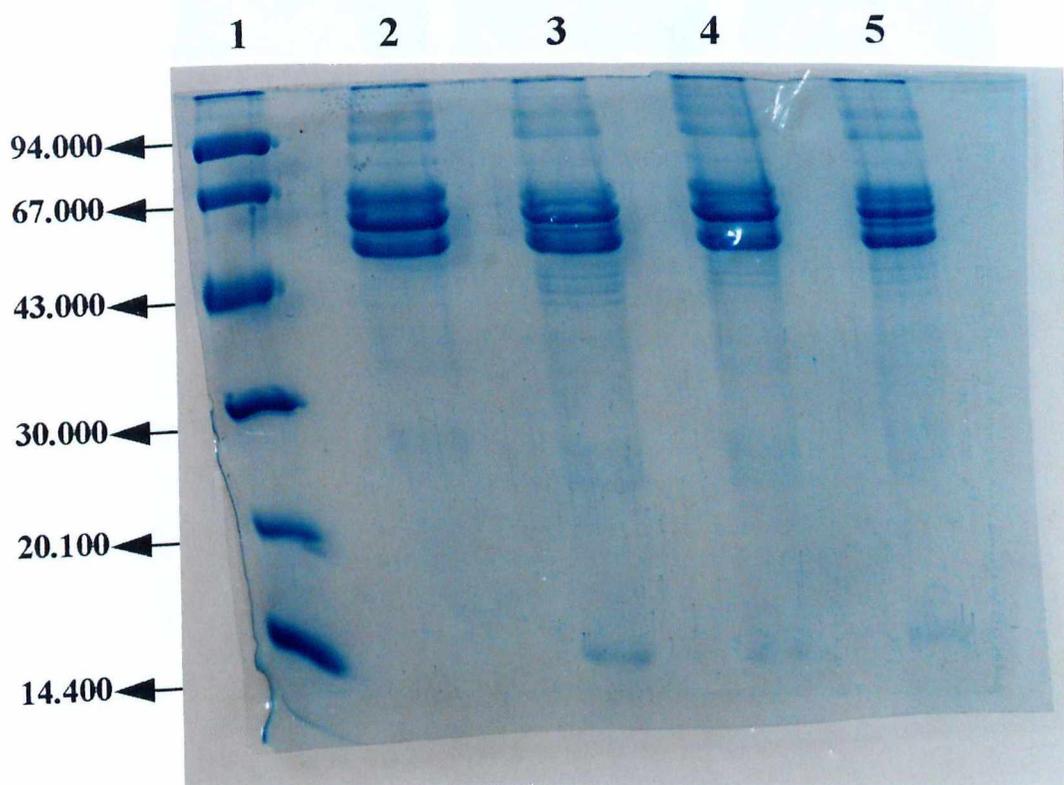


Fig. 5: Inibição da Atividade Fibrinogenolítica do Veneno Bruto de *Bothrops jararacussu* pelo Extrato Vegetal de *Casearia sylvestris*. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 16% dos produtos de hidrólise de 50 μ l de fibrinogênio (1mg/ml) incubados com 1 μ g do VB a 37°C durante cinco minutos. Os extratos vegetais foram utilizados na proporção de 1:10 (m/m).

Legenda:

- 1- Padrão (fosforilase b- 94.000; soroalbumina bovina - 67.000; Ovoalbumina- 43.000; Anidrase C.- 30.000; Inibidor de tripsina- 20.100; α -lactoalbumina - 14.400.
- 2- Fibrinogênio.
- 3- VB *Bothrops jararacussu* - controle positivo (5 min. de hidrólise).
- 4- VB *Bothrops jararacussu* incubado com *Casearia sylvestris* folhas (5 min. de hidrólise).
- 5- VB *Bothrops jararacussu* incubado com *Casearia sylvestris* caule (5 min. de hidrólise).

4.4- Atividade hemorrágica:

A figura 6 evidencia a lesão provocada por injeções intradérmicas no dorso de camundongos pelos venenos de *B. neuwiedi pauloensis* (6.1) e *B. jararacussu* (6.4), controles positivos.

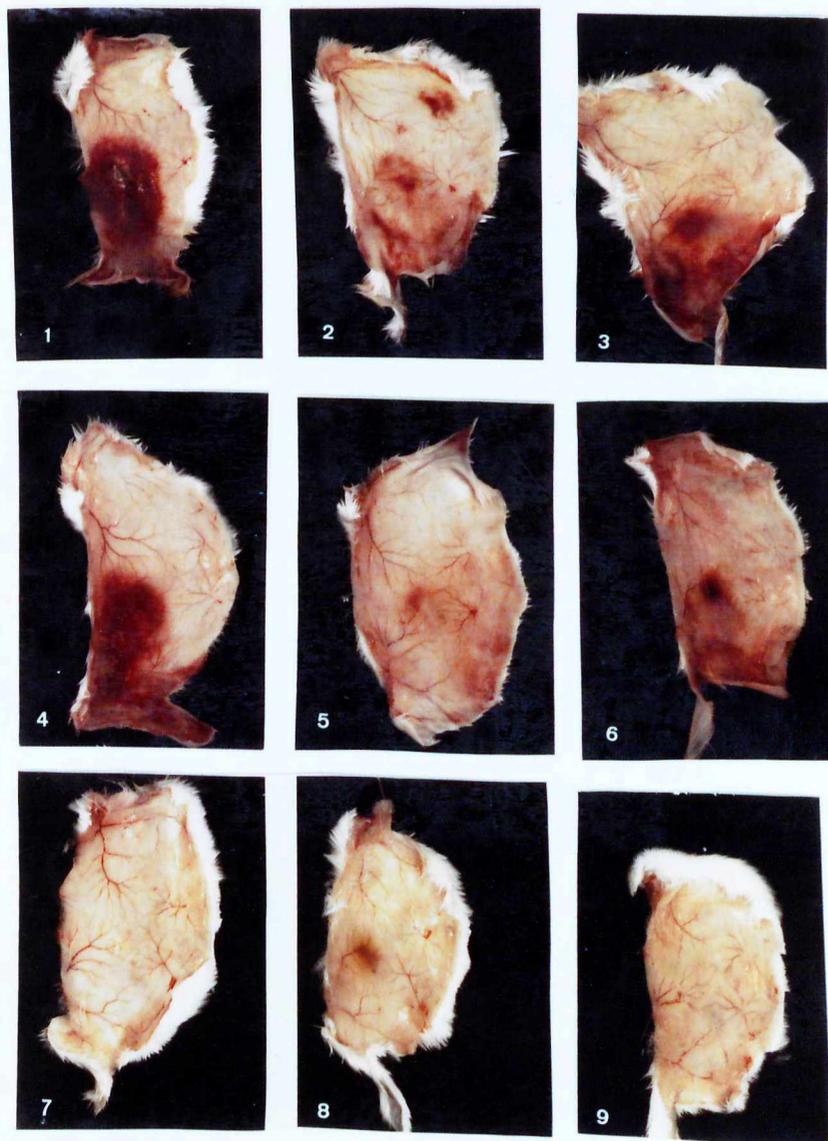


Fig. 6: Inibição da Atividade Hemorrágica dos venenos brutos (VB) pelo Extrato Vegetal. Aliquotas equivalentes à 3 DMH dos VB dissolvidos em 100 μ l de salina aplicadas intradérmicamente no dorso de camundongos. Após 3 horas, as peles foram retiradas e fotografadas.

Legenda:

- 1- VB *Bothrops neuwiedi* - controle positivo.
- 2- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* - folhas.
- 3- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* - caule.
- 4- VB *Bothrops jararacussu* - controle positivo.
- 5- VB *Bothrops jararacussu* incubado com *Casearia sylvestris* - folhas.
- 6- VB *Bothrops jararacussu* incubado com *Casearia sylvestris* - caule.
- 7- Salina - controle negativo.
- 8- *Casearia sylvestris* folhas - controle negativo.
- 9- *Casearia sylvestris* caule - controle negativo.

O veneno de *B. neuwiedi* é altamente hemorrágico, dose mínima hemorrágica (DMH) é de 8,13 μ g, enquanto para o de *Bothrops jararacussu* a DMH é de 50 μ g. A inibição da atividade foi realizada utilizando-se 3DMH de cada veneno, na proporção de 1:3(massa proteína (veneno):extrato pesado).

As amostras incubadas com o extrato das folhas de *Casearia sylvestris* apresentaram um alto grau de inibição da atividade hemorrágica (figura 6.2 e 6.5), sendo de quase 100% para o veneno de *Bothrops jararacussu*. Já o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* caule apresentou menor efeito protetor que *Casearia* folhas na mesma proporção, embora com menor eficiência para os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Figuras 6.3 e 6.6).

Nas figuras 6.7, 6.8 e 6.9 evidenciam-se os controles negativos feitos com salina, extrato vegetal das folhas e do caule. Como se pode observar, o extrato das folhas e do caule não são capazes de provocar hemorragia, quando injetados intradermicamente no dorso de camundongos.

Para estes ensaios, não foram realizados tratamentos estatísticos, devido à dificuldade em se quantificar os halos hemorrágicos.

4.5 -Atividade Miotóxica:

A figura 7 mostra os resultados obtidos para os testes de atividade miotóxica dos venenos de *B. neuwiedi* e *B. jararacussu* e para inibição destas atividades pelos extratos vegetais de *Casearia sylvestris* folhas e caule no músculo gastrocnêmio de camundongo. Verifica-se que as figuras 7.1 e 7.4 representam cortes transversais do músculo atingido pelos venenos brutos de *B. neuwiedi pauloensis* e *B. jararacussu*, respectivamente. As células estão em alto grau de degeneração com presença de hemorragia (grande número de hemáceas, principalmente para o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*), necrose e infiltrados leucocitários. Para muitas fibras apenas o limite celular é evidenciado.

Cortes longitudinais (figura 7.2 e 7.5) mostram os venenos de *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*, respectivamente, incubados por 1 hora com o extrato aquoso obtido a partir da folha de *Casearia sylvestris*. Para este ensaio, foram utilizados 50 μ g de veneno (massa de proteína) para 250 μ g extrato peso seco (proporção de 1:5, respectivamente). As figuras mostram fibras com núcleos periféricos e aspecto normais. Há ainda alguns infiltrados e algumas células em estado degenerativo, mas a presença de hemáceas é muito pequena.

Nas figuras 7.3 e 7.6, pode-se evidenciar as amostras de *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*, respectivamente, incubadas nas mesmas condições anteriores com o extrato do caule de *Casearia sylvestris*. Ainda pode-se observar células em estágio

avanzado de degeneração, grande quantidade de hemáceas e de infiltrados leucocitários, mas há uma evidente proteção em relação aos controles positivos.

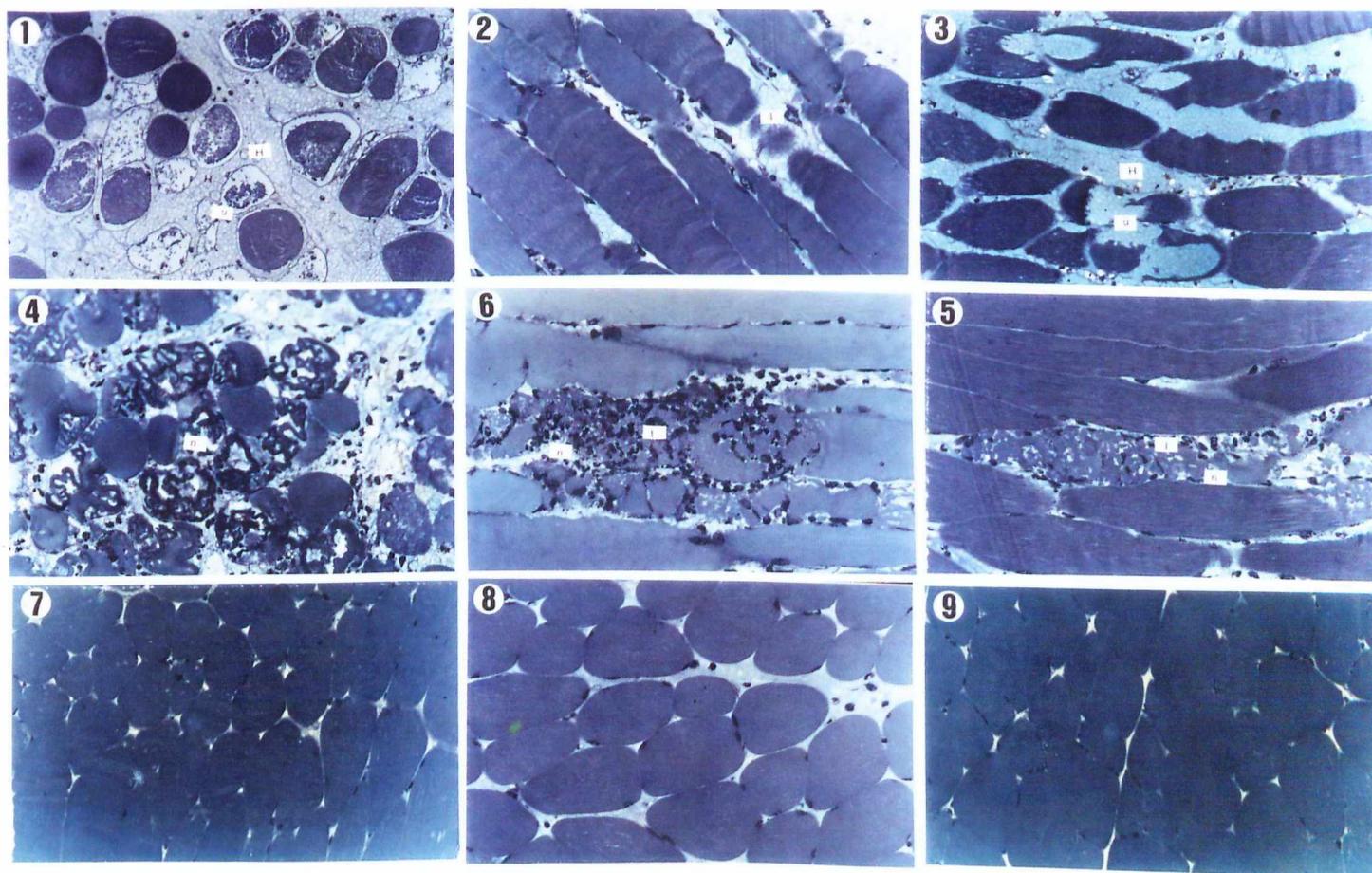


Fig. 7: Inibição da Atividade miotóxica dos Venenos Brutos (VB) pelo extrato Vegetal. Fotomicrografia de corte fino com 2,5 μ m de espessura do músculo esquelético (gastrocnêmio direito) de camundongos, após 24 horas de inoculação. Alterações morfológicas induzidas por 50 μ g dos Venenos Brutos dissolvidos em 50 μ l de salina. O extrato vegetal foi usado na proporção de (1:5) em relação ao Veneno Bruto.

Coloração: Azul de Toluidina. Aumento 40x..

n: necrose H: hemáceas I: infiltrado leucocitário.

Legenda:

- 1- VB *Bothrops neuwiedi* - controle positivo.
- 2- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* - folhas.
- 3- VB *Bothrops neuwiedi* incubado com *Casearia sylvestris* - caule.
- 4- VB *Bothrops jararacussu* - controle positivo.
- 5- VB *Bothrops jararacussu* incubado com *Casearia sylvestris* - folhas.
- 6- VB *Bothrops jararacussu* incubado com *Casearia sylvestris* - caule.
- 7- Salina - controle negativo.
- 8- *Casearia sylvestris* folhas - controle negativo.
- 9- *Casearia sylvestris* caule - controle negativo.

Os controles negativos das folhas e caule da planta *Casearia sylvestris* estão apresentados nas figuras 7.8 e 7.9. Tanto as folhas, quanto o caule não provocam miotoxicidade. A figura 7.7 apresenta o controle negativo feito com solução salina.

4.6- Atividade Edematogênica:

A figura 8 mostra a evolução do edema de patas de rato provocado pelo veneno de *B. jararacussu*. O extrato vegetal de *Casearia sylvestris* folhas não inibiu significativamente a formação do edema, mas a proporção deste foi menor no animal cujo veneno bruto foi incubado com o extrato vegetal.

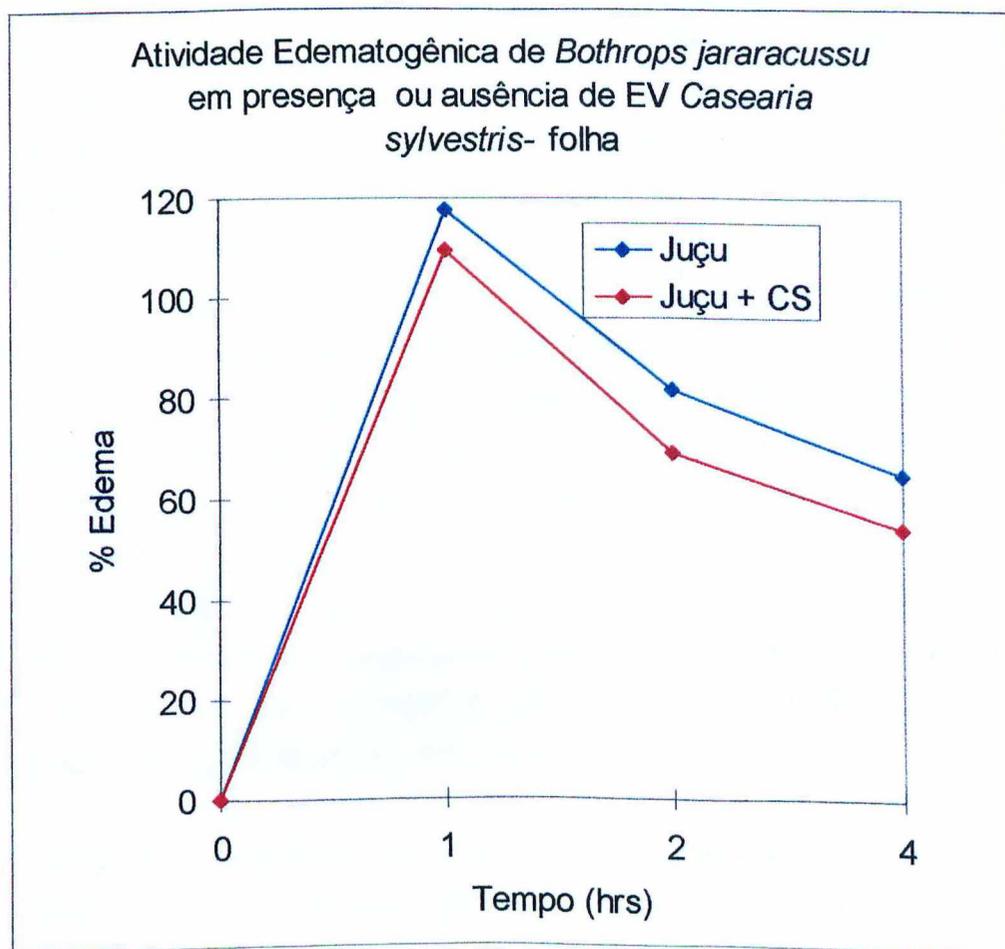


Fig. 8: Inibição da formação do Edema de pata de rato depois de injeção local de VB Juçu. O volume da pata foi determinado em diferentes tempos depois da injeção de 25 μ g de VB Juçu. Os dados são expressos como % do aumento do volume de cada pata.

Legenda:

Juçu - VB *Bothrops jararacussu*.

Juçu +CS - *B. jararacussu* +EV *Casearia sylvestris* folhas na proporção de 1:5 (25 μ g de proteína: 125 μ g de extrato, respectivamente).

4.7- Letalidade:

4.7.1- Cálculo da DL₅₀ Veneno Bruto *B. neuwiedi*.

Para se estudar o efeito inibitório da toxicidade do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, inicialmente foi determinada a DL₅₀ deste veneno, como descrito no item 3.3.7, sendo de $1,66 \pm 0,06 \text{mg/Kg}$, com 95% de confiança.

A tabela 4 mostra o tempo médio que os animais sobreviveram após o tratamento com os venenos e/ou com os extratos vegetais. De acordo com a tabela podemos observar que os extratos vegetais de *Casearia sylvestris* (caule ou folhas) não inibiram a letalidade na proporção de 1:10(m/m) veneno bruto/extrato vegetal. Mas, os resultados foram novamente analisados pelo teste de Tukey que mostra ao nível de 5% de probabilidade, que as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Desse modo, ao se comparar estatisticamente os venenos brutos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi pauloensis*, observa-se que não há diferença significativa entre eles.

Para os ensaios de inibição, podemos verificar que ao se tratar o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* com o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* folhas, obtivemos um aumento significativo na sobrevida dos animais (média de 406,05) em relação ao controle (média de 67,75). Porém, quando este mesmo veneno foi tratado com *Casearia sylvestris* caule, a diferença entre as médias já não foi estatisticamente significativa.

Nos testes de inibição, usando o veneno de *Bothrops jararacussu*, podemos observar que as médias dos tratamentos tanto para *Casearia sylvestris* folhas (média de 237,00) quanto para *Casearia sylvestris* caule (média de 121,5) foram estatisticamente significantes em relação ao controle (76,00).

Tab. 4: Tempo médio de sobrevida dos animais tratados com injeções intraperitoneais de veneno das espécies *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* na presença ou na ausência do extrato vegetal de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae).

Amostra	Tempo até a morte (min)		
	Controle	CF	CC
<i>B. neuwiedi</i>	67,75 (b)	406,05 (a)	81,15 (b)
<i>B. jararacussu</i>	76,00 (b)	237,00 (a)	121,5 (a)

4.8- Resumo das Atividades Ensaçadas neste Trabalho:

A tabela 5 mostra o resumo das atividades realizadas com os venenos de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Apis mellifera* utilizando ou não os extratos vegetais de *Casearia sylvestris*

Tab. 5: Quadro demonstrativo da inibição dos efeitos lesivos causados por venenos de serpentes e de abelhas.

Atividade/Proporção: Veneno bruto/extrato vegetal*	Resultados					
	<i>Bothrops jararacussu</i>		<i>Bothrops neuwiedi</i>		<i>Apis mellifera</i>	
	<i>C. sylvestris</i> folha	<i>C. sylvestris</i> caule	<i>C. sylvestris</i> folha	<i>C. sylvestris</i> caule	<i>C. sylvestris</i> folha	<i>C. sylvestris</i> caule
PLA ₂ (1:5)	inibição de 83%	inibição de 60%	inibição de 50%	inibição de 38%	inibição de 86%	inibição de 70%
Coagulante (1:3)	inibição de 38%	não houve inibição	não houve inibição	não houve inibição	não apresenta esta atividade	idem
Fibrinogenolítica (1:10)	inibição parcial	inibição parcial	não houve inibição	inibição parcial	não testado	não testado
Hemorrágica (1:3)	inibição quase total	inibição quase total	inibição quase total	inibição quase total	não apresenta esta atividade	não apresenta esta atividade
Miotóxica (1:5)	alta taxa de inibição	inibição parcial	alta taxa de inibição	inibição parcial	não testado	não testado
Edematogênica (1:5)	não houve inibição	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
Aumento do tempo de sobrevida (1:10)	significativo	significativo	significativo	não significativo	não testado	não testado

*As proporções correspondem a massa de proteína (veneno) e ao peso seco do extrato..

4.9- Caracterização Parcial do Extrato Vegetal de *Casearia sylvestris* - Folhas:

4.9.1- Teste de Solubilidade.

Por meio de experimentos de solubilização do extrato vegetal em diferentes solventes orgânicos, observou-se que a maior parte dos componentes constituintes deste extrato apresentam polaridade próxima à da água, pois o mesmo tornou-se totalmente solúvel em água e em metanol (solvente polar) enquanto para os demais solventes (de menor polaridade), o extrato mostrou-se insolúvel, como se pode observar na tabela 6.

Tab. 6: Solubilidade do extrato vegetal de *Casearia sylvestris* em diferentes solventes orgânicos:

Solvente	Solubilidade
Hexano	Insolúvel
Clorofórmio	Insolúvel
Acetona	Pouco solúvel
Metanol	Solúvel
Água	Solúvel

4.9.2- Filtração em Sephadex LH-20.

Foram coletadas 16 frações de 2ml cada uma, manualmente, em frascos ambar. Estas frações foram reunidas de acordo com características físicas (coloração, precipitação) e posteriormente analisadas quanto aos espectros de RMN¹H e infravermelho.

4.9.3- Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN¹H) e Espectrofotometria de Infra vermelho.

Os espectros mostram que as frações iniciais são compostas basicamente por açúcares, provavelmente oligossacarídeos (sinais de H⁺ Carbinólicos entre 3-4,5 ppm).

Nas frações seguintes foram detectadas algumas substâncias avermelhadas apresentando em sua estrutura molecular um sistema aromático (acúmulo de sinais entre 6-8,0 ppm). Estas substâncias devem estar na forma de glicosídeos, já que elas apresentam também sinais relativos à hidrogênios de açúcares. Pode-se supor a presença da raminose entre os açúcares já que há sinais para os grupos CH₃ (metilas) em aproximadamente 1,0ppm (figura 9).

Os espectros de infra vermelho mostram bandas largas a 3400cm⁻¹, características de hidroxilas, confirmando assim a RMN¹H (figura 10).

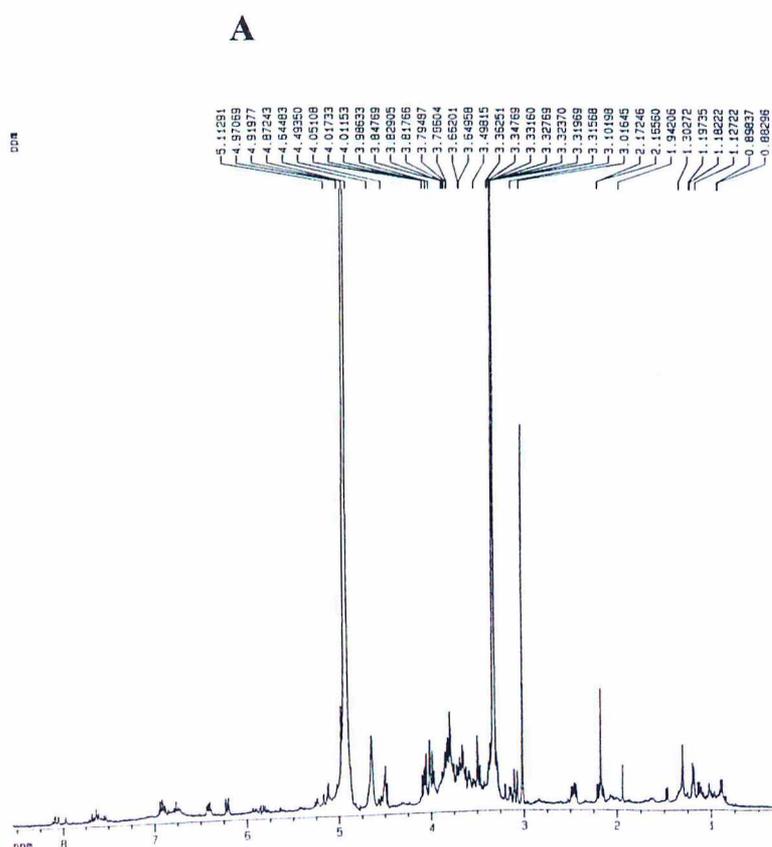
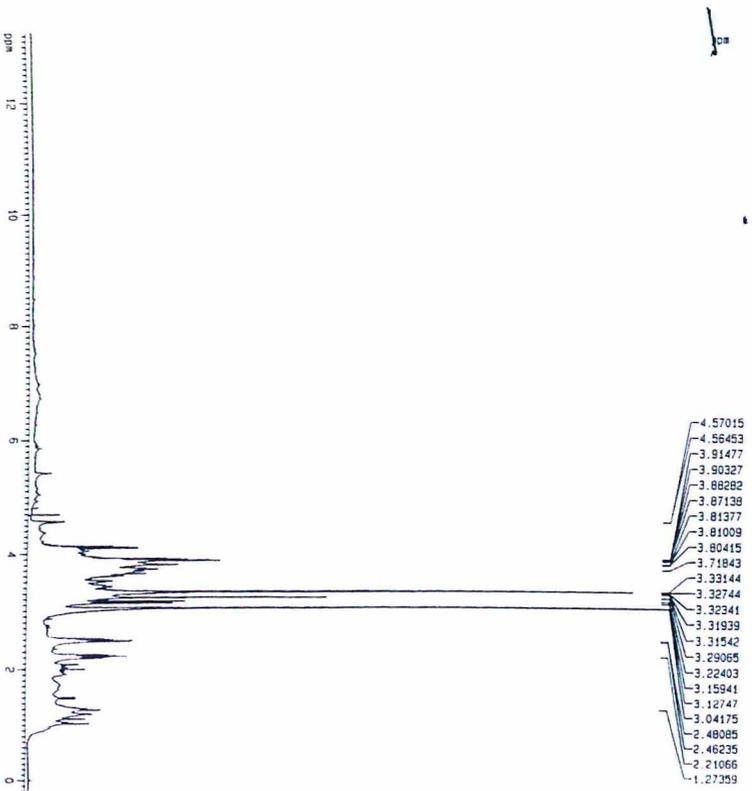


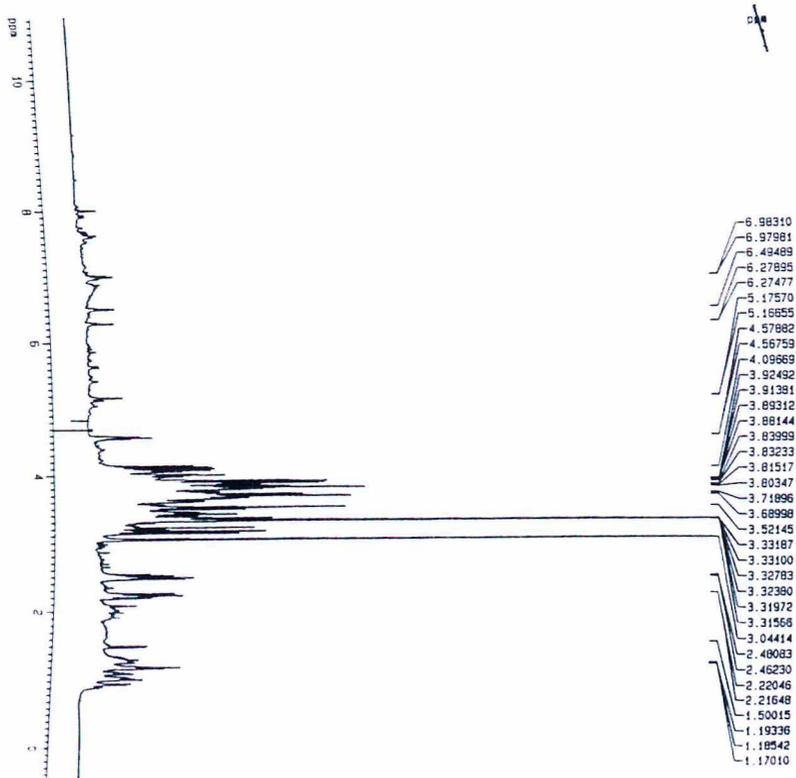
Fig. 9: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN¹H).

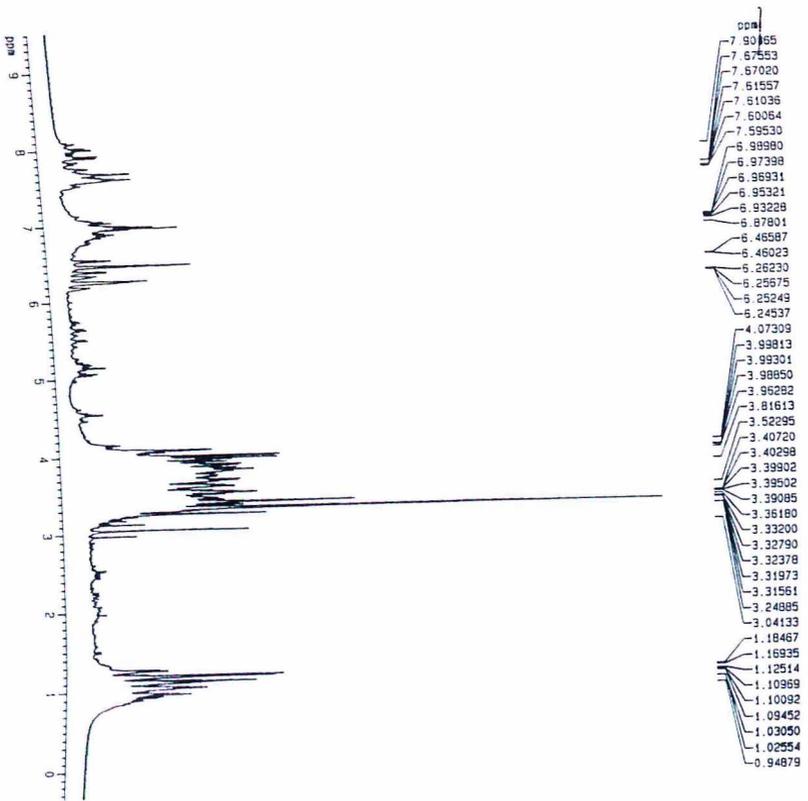
- A) amostra sem purificação.
- B) Frações purificadas - 1-4.
- C) Frações purificadas - 5-7.
- D) Frações purificadas - 8-10.
- E) Frações purificadas -11-13.
- F) Frações purificadas -14-16.

B

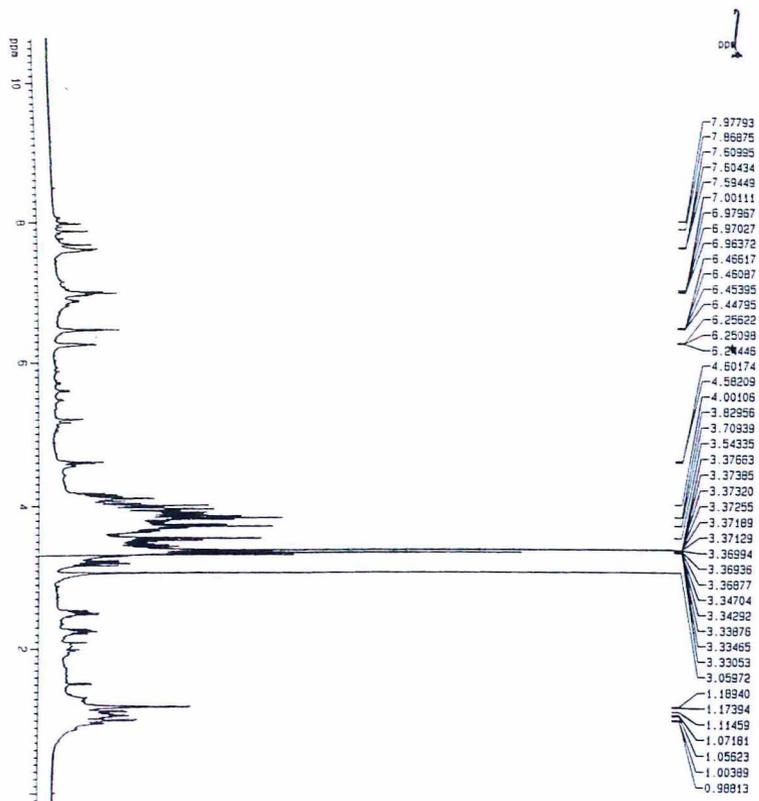


C

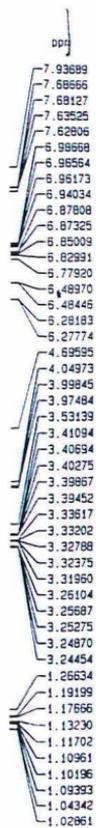
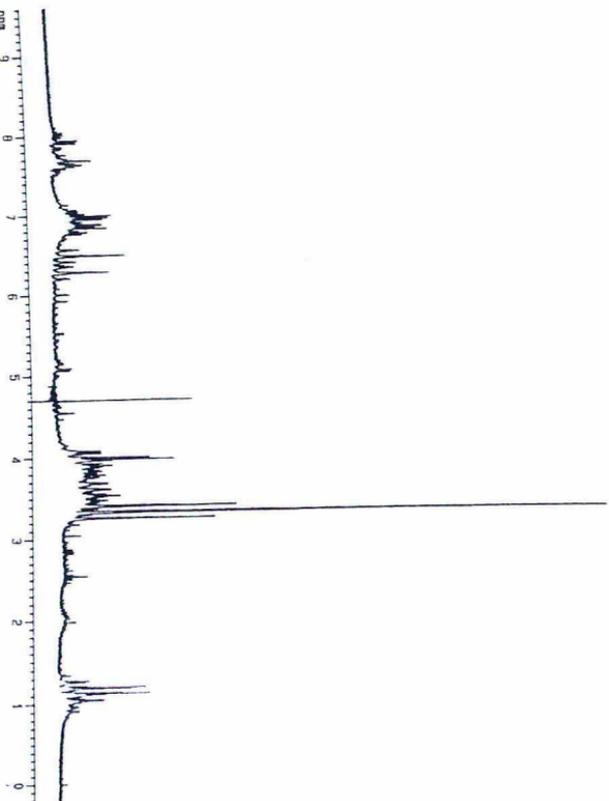




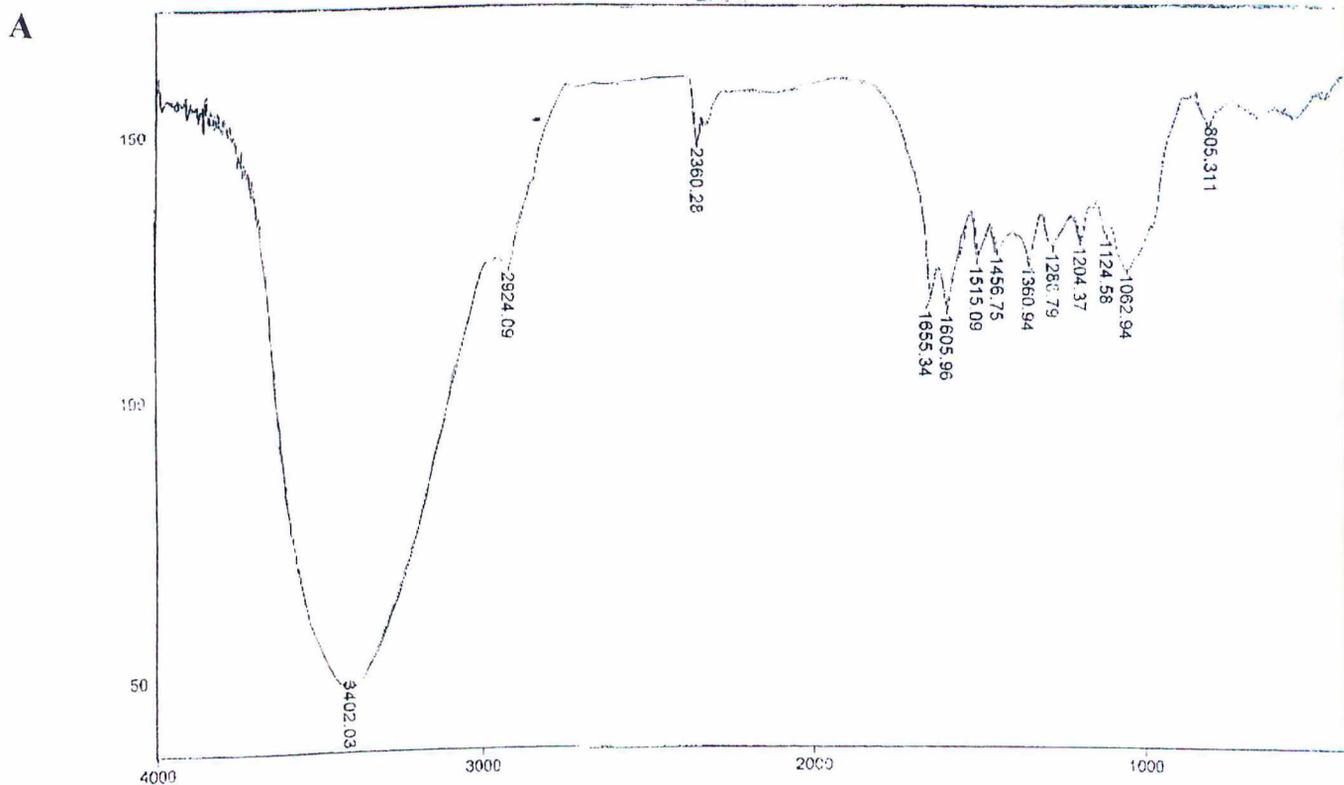
E



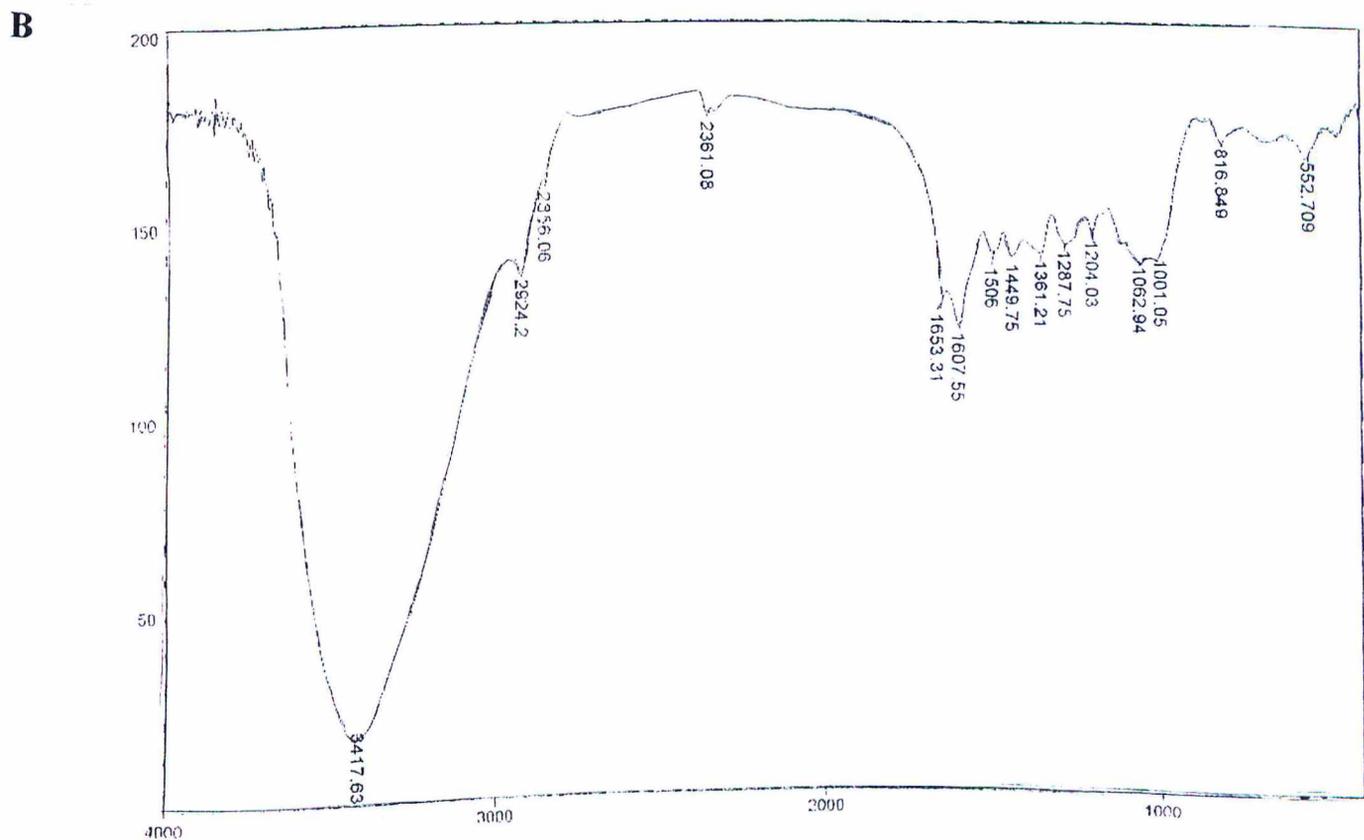
D



F



Transmittance / Wavenumber (cm-1)



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Fig. 10: Espectro de Infravermelho

A - Frações purificadas - 11-13.

B - Frações purificadas - 14-16.

5- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os venenos animais, incluindo de serpentes e abelhas apresentam uma mistura de várias substâncias tóxicas, cuja ação pode levar a efeitos locais, muitas vezes irreversíveis, distúrbios no sistema de coagulação sanguínea, podendo nos casos mais graves chegar à morte.

A soroterapia é a metodologia mais tradicional para se combater os efeitos dos envenenamentos. Porém, esse tratamento está restrito à fatores tais como o tempo decorrido após a picada, pois a hemorragia e a mionecrose começam a ocorrer minutos após o acidente (KAMIGUTI *et al.*, 1996) e à baixa distribuição dos anticorpos frente à rápida ação das toxinas.

Desse modo, vias alternativas para o combate do envenenamento estão sendo estudadas. Tem-se observado que algumas espécies de répteis e mamíferos são relativamente resistentes a estes envenenamentos devido à presença de fatores antivenenos em seu soro que são capazes de neutralizar os efeitos de diversos componentes tóxicos destes venenos. Alguns animais desenvolvem anticorpos naturais que neutralizam as toxinas presentes em vários venenos (NEVES-FERREIRA *et al.*, 1997). A capacidade de neutralização desses fatores naturais é muito maior que o uso da soroterapia.

Várias proteínas antivenenos têm sido isoladas do soro de animais resistentes e seu mecanismo de ação vem sendo estudado (DOMONT *et al.*, 1991, PERALES *et al.*, 1994). Recentemente, SOARES *et al.* (1997) purificaram o complexo antibotrópico (ABC) a partir do soro de *Didelphis albiventris*, um marsupial comum na Região de Ribeirão Preto, São Paulo, e verificaram que esta proteína foi capaz de neutralizar completamente a hemorragia, a miotoxicidade e o edema induzidos por venenos botrópicos e de suas frações isoladas, além de aumentar significativamente o tempo de coagulação sanguínea e inibir parcialmente a atividade PLA₂ destas toxinas.

Mas, o tratamento de várias doenças e inclusive de acidentes com serpentes e outros animais, ocorreu desde os tempos primordiais com extratos (chás, infusões, cataplasmas) obtidos de plantas. Apesar de não se conhecer os princípios pelos quais ocorria a cura, os conhecimentos sobre as plantas e suas principais funções foram sendo repassados entre as gerações. E novos estudos começaram a surgir na tentativa de comprovar o efeito científico destes extratos, que princípios ativos eles possuem e como eles atuam. A falta de uma metodologia biológica onde se pudesse conhecer a aplicação do princípio, foi um dos principais problemas dos químicos orgânicos que iniciaram estes estudos. A combinação de botânicos, biólogos,

químicos e farmacologistas reúne todas as condições ideais para um bom trabalho de investigação dos princípios ativos presentes em plantas.

Considerando a história evolutiva das toxinas dos venenos de serpentes e abelhas, encontramos grandes evidências de que as atuais toxinas surgiram a partir de enzimas digestivas, dentre as quais se destaca uma ancestral de fosfolipases do tipo A_2 (GANS, 1978). Portanto, a evolução explicaria a ampla distribuição destas enzimas nas secreções peçonhentas e seu envolvimento nos principais efeitos lesivos apresentados por estes venenos.

Assim sendo, uma das técnicas mais utilizadas pelos toxinologistas para determinar a atividade fosfolipase A_2 é a titulação potenciométrica, onde a gema de ovo é utilizada como substrato. Este é um método extremamente vantajoso por ter um custo relativamente baixo, muito rápido e de boa reprodutibilidade.

Deste modo, este trabalho teve início utilizando-se a atividade fosfolipase A_2 (PLA_2) para selecionar dentre os extratos vegetais (EV) obtidos de plantas coletadas na região qual(is) o(s) mais eficiente(s) na inibição desta enzima.

Os extratos vegetais de *Sena rugosa* (raiz e folhas) e *Bidens pilosa* (folhas) não apresentaram atividade inibitória (figura 2), apesar destas plantas serem citadas na literatura como antiofídicas (BATINA, 1996). A não inibição pode ser devida ao tipo de extrato preparado, já que foi usado apenas o extrato aquoso.

A atividade fosfolipase A_2 do veneno bruto de *Bothrops jararaca* e da crotoxina, principal proteína tóxica encontrada no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, foi inibida pela wedelolactona, uma fração purificada da planta *Eclipta prostrata* que é muito difundida entre a população para combater sintomas de envenenamento tais como letalidade e miotoxicidade (MELO *et al.*, 1994).

A fosfolipase A_2 está envolvida também nos envenenamentos provocados por abelhas. Neste caso, esta enzima associa-se à melitina (componente deste veneno) e induz a destruição da célula, provocando a mionecrose (OWNBY *et al.*, 1997). Esse processo é caracterizado pela rápida lise da membrana plasmática, hipercontração e desorganização das miofibrilas, que algum tempo depois se rompem e após 24 horas ocorre infiltração de células fagocitárias.

O extrato vegetal de *Casearia sylvestris* apresentou uma inibição significativa da atividade fosfolipásica A_2 dos venenos de *Apis mellifera*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi*, tanto para os extratos aquosos preparados a partir do caule quanto a partir das folhas (figura 3).

Segundo MANCIN *et al.* (1997), as fosfolipases A_2 de venenos provocam a liberação de histamina (envolvida nos processos de defesa do organismo) por mecanismos indiretos, mediados por lisofosfatídeos. As PLA_2 liberariam enzimaticamente o ácido araquidônico que é um componente estrutural dos

fosfolipídeos e que também está envolvido nos processos de inflamação. A idéia de que as fosfolipases A₂ provocariam a liberação de histamina foi fundamentada por se encontrar o ácido araquidônico e seus metabólitos em eventos onde havia grande liberação de histamina, como ocorre nos acidentes com abelhas.

Enzimas semelhantes à PLA₂ tem sua atividade potencializada quando são complexadas com liberadores de histamina. Como estas enzimas geralmente estão presentes em venenos animais e além disso, esses venenos ainda apresentam substâncias que também são liberadoras de histamina, pode então haver uma ação conjunta destas toxinas, provavelmente potencializando o efeito citolítico destas proteínas.

Desse modo, poderíamos relacionar as fosfolipases A₂ ao edema provocado pelo envenenamento (TREBIEN e CALIXTO, 1989), pois o edema formado por venenos botrópicos apresenta um considerável efeito inflamatório local (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986b; FLORES *et al.*, 1993) com a presença de vários tipos de leucócitos nos primeiros estágios do processo inflamatório (CURY *et al.*, 1994). Estes leucócitos liberam mediadores pró-inflamatórios, que são os produtos do metabolismo do ácido araquidônico e que contribuem para eliminar os agentes da injúria e resolver o quadro de inflamação (RAMPART, 1994).

O edema, a hemorragia e a mionecrose provocados pelos venenos de *Bothrops asper* foram reduzidos significativamente quando os animais foram previamente imunizados. Apesar de o início do edema ser o mesmo nos animais controle, a reversão do edema se deu em menor tempo (RUCAVADO e LOMONTE, 1996) nos animais tratados. Esses resultados mostram que a existência de anticorpos antes da injeção do veneno pode reduzir os efeitos provocados por ele.

PEREIRA *et al.* (1992) verificaram a inibição da atividade edematogênica em patas de ratos, utilizando 5µg do veneno bruto de *Bothrops jararaca* e os extratos aquosos de várias plantas, inclusive o de *Casearia sylvestris* (folhas e caule). O extrato foi aplicado oralmente na dose de 1g/Kg de animal, duas horas antes da aplicação do veneno. A proporção de veneno:extrato vegetal foi de aproximadamente 1:4000, respectivamente. Dos resultados obtidos *Casearia sylvestris* folhas apresentou 71.3% de inibição e o caule 67.6%.

No presente trabalho, o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* folhas não inibiu a formação do edema provocado pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. A diferença entre a pata controle e o tratamento foi muito pequena (figura 7). Quando comparamos nosso trabalho ao de PEREIRA *et al.* (1992), observamos que há resultados antagônicos, o que pode ser atribuído ao modo de preparo do extrato, ou à sua forma de utilização, ou até mesmo à quantidade utilizada.

Se a atividade PLA₂ estiver realmente relacionada com um efeito indireto sobre a atividade edematogênica como sugerido por MANCIN *et al.* 1997, e considerando que os resultados de inibição da atividade PLA₂ pelo extrato vegetal de *Casearia sylvestris* foram altamente significativos, então poderíamos considerar que as enzimas fosfolipases A₂ estariam inibidas pelo extrato vegetal e assim a atividade edematogênica deveria ocorrer somente pela ação de outros fatores, resultando assim em um efeito consideravelmente menor, o que não ocorreu neste caso, sugerindo que a atuação das fosfolipases A₂ na formação do edema não deve ser o evento principal.

Os venenos de serpentes são ricos em proteases, muitas das quais já isoladas e estudadas. Estas proteases podem ser divididas em a) serino-proteases que atuam na cascata de coagulação (OUYANG *et al.*, 1992); b) metaloproteases que podem ser hemorrágicas (MANDELBAUM *et al.*, 1984; MORI *et al.*, 1987; SANCHES *et al.*, 1987; TU, 1977) ou não (ASSAKURA *et al.*, 1985; MORI *et al.*, 1987; SANCHES *et al.*, 1987; TU, 1977) e c) proteinases não específicas. As serino-proteases e as metaloproteases hemorrágicas se caracterizam por apresentarem alta especificidade de substrato, enquanto as metaloproteases não hemorrágicas e as proteases não específicas apresentam uma ampla especificidade à vários tipos de substratos.

Os venenos de serpentes afetam a coagulação sanguínea e a função das plaquetas por diversos caminhos. Eles apresentam componentes coagulantes e anticoagulantes e que afetam a agregação plaquetária. A trombina presente no sangue ativa as plaquetas e outras células que mantêm a hemostasia e atua também na atividade fibrinolítica. Os venenos de serpentes contém enzimas “thrombin-like” que são serino-proteases que atuam sobre o fibrinogênio e pelas quais o interesse vem crescendo.

O extrato de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) não inibiu a atividade coagulante dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi*. O aumento do tempo de coagulação do plasma só foi significativo ($p = 0,036$) para o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* folhas usado contra o veneno de *Bothrops jararacussu* (38% de inibição) (Tabela 3). Estes resultados podem indicar diferenças significativas nos mecanismos de ação de diferentes toxinas coagulantes e uma especificidade de ação para o princípio ativo do extrato vegetal de *Casearia sylvestris* folhas. Seria interessante explorar melhor esta inibição, usando-se um extrato parcialmente fracionado e também toxinas coagulantes isoladas da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

Os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi* possuem enzimas proteolíticas que quebram preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio. A

atividade fibrinogenolítica do veneno de *Bothrops neuwiedi* também não foi inibida pelo extrato das folhas de *Casearia sylvestris* e a inibição da hidrólise da cadeia α pelo extrato do caule desta planta foi muito pequena (figura 4). Para o veneno de *Bothrops jararacussu* a proteção da cadeia α também foi pequena, tanto para o extrato do caule, quanto das folhas.

Deste modo, como as atividades coagulante e fibrinogenolítica não foram inibidas pelo extrato vegetal de *Casearia sylvestris*, sugere-se que este extrato não iniba as enzimas “thrombin-like” presentes nestes venenos.

As hemorraginas (2º grupo representante de proteases presentes em venenos de serpentes e que apresentam alta especificidade ao substrato) provocam danos na microvasculatura no local da picada, levando à degeneração do tecido, um efeito que nem sempre pode ser revertido. A hemorragia pode também apresentar-se de forma sistêmica devida ao consumo dos fatores de coagulação pelas enzimas presentes nos venenos, e para muitos pacientes pode ser fatal.

O extrato vegetal das folhas de *Casearia sylvestris* foi muito efetivo na redução da atividade hemorrágica apresentada pelos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi*. O caule mostrou uma menor eficiência protetora, mas ainda foi da ordem de 80% (Figuras 4 e 5).

MELO *et al.* (1994) mostraram que o extrato bruto de *Eclipta prostrata* e sua fração wedelolactona inibiram significativamente a hemorragia provocada pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

FERREIRA *et al.* (1992b) isolaram da planta *Curcuma longa* (Zingiberaceae) uma fração denominada de ar-turmerone que foi eficiente na inibição da atividade hemorrágica provocada pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

Em nosso trabalho, verificamos que não houve inibição significativa das atividades coagulante ou fibrinogenolítica, mas houve uma inibição extremamente alta da atividade hemorrágica. Como já foi dito, as hemorraginas e as enzimas que afetam o mecanismo de hemostasia constituem um grupo de proteases presentes em venenos e portanto, evolutivamente devem apresentar uma mesma origem. Seria então de se esperar que o extrato vegetal atuasse da mesma forma para todas as proteases, porém isto não ocorreu, sugerindo que o extrato de *Casearia sylvestris* apresenta especificidade para as hemorraginas. Poderíamos sugerir até que este extrato vegetal apresentasse substâncias que quelam o zinco e impedem a ação enzimática, já que é conhecido que as hemorraginas são metaloproteínas dependentes de zinco e podem ser inibidas por quelantes de metais (BJARNASON e FOX, 1994). Talvez o extrato atuasse como um quelante natural o que ainda não foi descrito, neste caso a inibição da fosfolipase A₂ poderia se dar pelo mesmo mecanismo, já que estas enzimas são cálcio dependentes. Por outro lado, se a

inibição ocorrer em consequência de interações específicas entre grupamentos funcionais de componentes do extrato vegetal e do domínio hemorrágico das toxinas, as perspectivas futuras para o desenvolvimento de uma droga eficaz no tratamento de hemorragias, são muito promissoras.

A miotoxicidade é outra característica comum do envenenamento por espécies botrópicas. Ocorre devido à ação específica das toxinas do veneno no músculo esquelético que são responsáveis pelo efeito local.

O extrato bruto aquoso de *Eclipta prostrata* e a fração purificada Wedelolactona neutralizaram o efeito miotóxico in vivo e in vitro de duas miotoxinas: botrosptoxina que apresenta estrutura de fosfolipase A₂, mas não tem atividade fosfolipase A₂ (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987) e da crotoxina que tem atividade fosfolipase A₂, e não é proteolítica (MELO *et al.*, 1994).

O extrato de *Casearia sylvestris* foi usado na tentativa de inibir a miotoxicidade, apresentando significantes porcentagens de inibição tanto para o extrato do caule, quanto da folha (Figura 7).

A presença de fosfolipases A₂ juntamente com as miotoxinas nos venenos animais provavelmente acentua a miotoxicidade. Assim, venenos como o de abelhas que são ricos em fosfolipases A₂ também apresentam uma alta miotoxicidade (OWNBY *et al.*, 1997). Em nossos experimentos, tanto a atividade fosfolipase A₂ como a miotoxicidade foram inibidas expressivamente, sugerindo a interação entre as fosfolipases e as miotoxinas.

Os cortes histológicos (figura 7) evidenciam também hemorragia (presença de um grande número de hemáceas) provocada pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, confirmando que este veneno é bem mais hemorrágico que o veneno de *Bothrops jararacussu*, como mostrado na figura 6. Verificamos também que as figuras 7.2 e 7.3 mostram um número bem menor de hemáceas, novamente corroborando com os resultados da atividade hemorrágica, que mostram um eficiente efeito protetor do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a hemorragia.

Várias plantas estudadas mostraram ser eficientes contra a letalidade dos venenos de serpentes. A fração ar-turmerone, proveniente do extrato aquoso de *Curcuma longa* foi capaz de inibir 50% da atividade letal do veneno de *Crotalus durissus*, numa proporção de 1 de veneno para 50 de extrato (FERREIRA, 1992b).

Para verificar se o extrato vegetal de *Peschiera fuchisiaefolia* Apocynacea apresentava eficiência na inibição do veneno bruto de *Crotalus durissus*, BATINA *et al.* (1997) injetaram 10mg deste extrato/100g de rato, 20 minutos antes de aplicar 240µg do veneno de *Crotalus durissus*, que correspondem a 2DL₅₀. A proporção de veneno:extrato utilizada foi de 1:42 e a porcentagem de inibição foi em torno de 80%. Quando foi usada uma proporção de 1:83 (20mg de extrato/100g de rato), foi

observado que houve 100% de inibição, para as mesmas condições anteriores. Em outro experimento, onde BATINA *et al.* (1997) incubaram o extrato vegetal desta planta com $2DL_{50}$ do veneno de *Crotalus durissus*, durante 60 minutos à temperatura ambiente, a quantidade de extrato suficiente para inibir 70% da letalidade foi de 1,25mg/100g de rato para 240 μ g do veneno bruto (1:5,2; veneno bruto:extrato vegetal). Para inibir 100%, foram usadas 2,5mg de extrato/100g de rato para 240 μ g do veneno (1:10,4; veneno bruto:extrato vegetal).

Outras plantas também apresentaram efeitos antiletais contra os venenos de serpentes. *Eclipta prostrata* contra a ação letal de *Crotalus durissus terrificus* (MORS *et al.*, 1989) e *Bothrops jararaca* (MELO *et al.*, 1994). *Apoléia leiocarpa*, *Bredemeyra floribunda*, *Silybum marianum* e *Hibiscus esculentus* contra a letalidade do veneno de *Bothrops jararaca* (PEREIRA *et al.*, 1994; PACHECO *et al.*, 1995). PEREIRA *et al.* (1991) mostraram que o pré-tratamento oral de ratos com extratos das plantas *Phylantus Klotzschianus*, *Casearia sylvestris* e *Apoléia leiocarpa* conferiu 100% de proteção contra o veneno de *Bothrops jararaca*.

O extrato do caule (CC) e das folhas (CF) de *Casearia sylvestris* foi incubado com os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi*. A análise estatística mostrou que não houve diferenças significativas entre os dois venenos brutos. Isso era esperado, pois usamos $2DL_{50}$ para cada veneno, então os efeitos deveriam ser os mesmos. Ao analisar o veneno bruto de *Bothrops neuwiedi* e as amostras incubadas com os extratos: de folhas e caule, verificamos que as folhas diferiram significativamente do controle (veneno bruto), enquanto o caule não (tabela 4).

Para o veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, a inibição foi significativa para o extrato do caule e também para o extrato das folhas. Verificamos que todos os animais morreram ao longo do experimento, mas o tempo médio de sobrevivência dos animais que receberam os venenos tratados com os extratos foi maior em relação aos animais controles (receberam apenas veneno). Como a proporção veneno-extrato foi de 1:10 (massa de proteína:peso seco), acreditamos que aumentando essa proporção, poderemos obter melhores resultados.

A quantidade de antiveneno administrada em casos de acidentes é um dos problemas que se enfrenta nos casos de acidentes ofídicos, mesmo quando se trata do soro antiofídico. O tratamento tradicional, usando anticorpos polivalentes produzidos em cavalos, muitas vezes provoca alergia (KORNALIK e VORVOLOVA, 1990). Também o uso de grande quantidade de extrato vegetal pode provocar efeitos colaterais desconhecidos.

O estudo destas plantas, a identificação e purificação dos princípios ativos, o mecanismo de ação destes princípios, como eles interagem com as proteínas do

veneno, por que eles inibem uma atividade, mas não conseguem inibir outra do mesmo veneno? Estas perguntas agora é que estão sendo respondidas, mas muitas investigações precisam ainda ser feitas para elucidar todo esse processo, não só no que diz respeito às plantas antiofídicas, mas em relação às plantas medicinais como um todo.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a planta *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) possui propriedades capazes de inibir se não totalmente, parcialmente os efeitos de envenenamentos por serpentes. Prováveis explicações desta ação inibitória é que a *Casearia sylvestris* possa apresentar componentes que funcionem como um inibidor enzimático das enzimas presentes no veneno ou possua uma ação antitoxina direta ou ainda provoque inativação química.

Outra hipótese é que a atividade biológica de certas plantas indicam a presença de propriedades antiinflamatórias que podem muitas vezes estar associadas a substâncias imunomoduladoras (HART *et al.*, 1989). Isso pode indicar que a neutralização das toxinas ocorra através de mecanismos imunológicos. Estudos *in vitro* demonstraram que o extrato de *Curcuma longa* inibiu a resposta proliferativa de linfócitos humanos, e a fração ar-turmerone, obtida deste extrato também é um potente inibidor da proliferação de células linfocíticas (FERREIRA *et al.*, 1992b).

O teste de solubilidade mostrou que os constituintes do extrato apresentam alta polaridade, sendo solúveis em solventes polares. A solubilidade em água permitiu que obtivéssemos ótimos resultados, mas poderíamos fazer novos testes usando extratos etanólicos e verificar a eficiência do princípio em água e em solventes orgânicos, já que a maioria dos princípios ativos são obtidos a partir destes solventes. Desde modo, poderíamos talvez obter inibição de todas as atividades.

Os espectros de RMN¹H mostraram claramente que houve um fracionamento razoável do extrato, sugerindo que Sephadex LH-20 é um suporte cromatográfico indicado para futuras separações deste extrato.

Nestes espectros pode se observar que o extrato é composto por açúcares e que há acúmulo de sinais para sistemas aromáticos. A existência de várias moléculas de açúcar ligadas ao núcleo aromático, sugere a presença de alcalóides e justifica a solubilidade do extrato em água.

As plantas estão na natureza ricas e soberanas, apresentando grandes quantidades de substâncias que podem ser a chave para todos os males do homem. Resta a ele encontrar meios para usufruir destes benefícios ao mesmo tempo em que seja capaz de recompensar a sábia natureza, dando às plantas condições para que elas também possam sobreviver.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. DE; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. (1976) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear In **Química Orgânica** 2a. ed Guanabara Dois S.A - Rio de Janeiro RJ, 71-78.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. DE; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. (1976) Espectroscopia no Infravermelho In **Química Orgânica** 2a. ed Guanabara Dois S.A - Rio de Janeiro RJ, 183-192.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J.; GUTIÉRREZ, J. M. and TULINSKY, A. (1995) Crystal structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. **Acta Crystallographica D51**, 311-317.
- ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F. and MANDELBAUM, F. R. (1992) Biochemical and Biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*) **Comp. Biochem. Physiol.** **102B** (4), 727-732.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. and MANDELBAUM, F. R. (1986) Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon** **24**, 943-946.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A. and MANDELBAUM, F. R. (1985) Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon** **23**, 691-706.
- BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T. and AZZOLINI, C. A. (1990) Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology** **30**, 185-197.
- BATINA, M. F.C.; GIGLIO, J. R. and SAMPAIO, S. V. (1997) Methodological care in the evaluation of the LD50 and of the neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by plant *Peschiera fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **J. Venom. Anim. Toxins.** **3**(1), 22-31.

- BATINA, M. F. C. (1996) Inibição das Atividades Letal e Miotóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por *Peschiera fuchsiaefolia* ("leiteiro"-Apocynaceae). **Dissertação apresentada à Faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Univ. São Paulo para obtenção do título de Mestre em Fármacos e Medicamentos.**
- BERSANI-AMADO, C. A. and GARCIA LEME, J. (1982) Some characteristics of the participation of lymphocytes in non-immune inflammation. **Br. J. Exp. Path.** **63**, 463-471.
- BITHELL, T. .C. (1993) The physiology of primary haemostasis. In: **Wintrobe's Clinical Hematology**, (Lee, J. R.; BITHELL, T. C.; FOESTER, J.; ATHENS, J. W. and LUKENS, J. N., Eds.) London: Lea and Febiger, 540-565.
- BJARNARSON, J. B. and FOX, J. W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.** **62**, 325-372.
- BJARNARSON, J. B.; HAMILTON, D. and FOX, J. W. (1988) Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler** **369**, 121-129.
- BLOMBACK, B. and VESTERMARK, A. (1958) Isolation of fibrinopeptides by chromatography. **Arkiv Kemi** **12**, 173-182.
- BLOMBACK, B.; HESSEL, B.; HOGG, D. and THERKILDSEN, L. (1978) A two step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. **Nature** **275**, 501-505.
- BON, C.; CHANGEUX, J. P.; JENG, T. W. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1979) Post-synaptic effects of Crotoxin and it's isolated subunits. **Eur. J. Biochem.** **99**, 471-481.
- BONILLA, C.A.; FAITH, M. R.; MINTON, S.A. (1973) L-amino acid oxidase, phosphodiesterase, total proteins and others properties of juvenile timber rattlesnake (*C.H. horridus*) venom at different stages of growth. **Toxicon** **11**, 301-303.
- BORGES, M. H. and HOMSI-BRANDEBURGO (1998) Ação anti-peçonha do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*. **Biotecnologia C. D.** **4**, 28-30.

- BORGES, M. H. (1995) **Isolamento e produção de anticorpos policlonais das miotoxinas da peçonha de *Bothrops jararacussu*** Monografia (Universidade Federal de Uberlândia), 71.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M. and OVADIA, M. (1997) Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. **Toxicon** **35**(6), 865-877.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M. and OVADIA, M. (1993) Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon** **31**, 1137-1150.
- CHANG, M. C. and HUANG, T. F. (1995) Characterization of a thrombin-like enzyme, grambin, from the venoms of *Trimeresurus gramineus* and its in vivo antithrombotic effect. **Toxicon** **33**, 1087-1098'.
- CHANG, C.C.; LEE, C. Y.; EAKER, D. and FOHLMAN, J.(1977) The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with β -bungarotoxin and crotoxin. **Toxicon** **15**, 571-576.
- CHÁVES- OLÓRTEGUI, C.; PENAFORTE, C. L.; SILVA, R. .R; FERREIRA, A. P.; REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S. and DINIZ, C. R. (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of Brazilian *Bothrops* species and *Crotalus durissus*. **Toxicon** **35** (22), 253-260.
- CHERDCHU, C.; SRIDUKAVAT, K. and RATANABANANGKON, K. (1978) - Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae). **J. Med. Ass. Thailand** **61**, 544
- CONDREA, E.; YANG, C. C. and ROSENBERG, P. (1981) Lack correlation between the anticoagulant activity and phospholipase hydrolysis by snake venom phospholipases A₂. **Thromb. Hemostasis** **45**, 82-89.
- CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. and SUDO, L. S.(1994) Edematogenic responses induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of lymphocytes. **Toxicon**, **32**(11), 1425-1431.

- DAOUD, E.; TU, A. T. and EL-ASMAR, M. F. (1986) Isolation and characterization of an anticoagulant proteinase cerastase F-4, from *Cerastes cerastes* (Egyptian Sand Viper) venom. **Thromb. Res.** **42**, 52-58
- DE HAAS, G.H.; POSTEMA, N.M. e col.(1968) - Purification and properties of phospholipase A₂ from porcine pancreas. **Biochemistry and Biophysics Acta**, **159**, 103-117.1
- DELOT, E. and BON, C. (1993) - Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry** **32**, 10708-10713.
- DEMPSEY, C. E. (1990) The actions of melittin on membranes. **Biochemistry. Biophysics Acta** **1031**, 143-161.
- DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. and LOMONTE, B. (1992) Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys** **298**, 135-142.
- DOMONT, G. B.; PERALES, J. and MOUSSATCHÉ, H. (1991) Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon** **29**, 1183-1194.
- DOOLITTLE, R. F. (1984) Fibrinogen and fibrin. **Ann. Rev. Biochem** **53**, 195-229.
- EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. (1973) The proteolytic action of ancred on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.** **2**: 85-89.
- FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L. and MOTA, I. (1992a). Toxic activities of venoms from Nine *Bothrops* Species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon** **30** (12), 1603-1608.
- FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMEHL, G. G and DE MORAES, V. L. G. (1992b) Antivenom and biological effects of Ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon** **30**(10), 1211-1218.
- FLETCHER, J. E. and JIANG, M. S. (1993) Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. **Toxicon** **31**, 669-695.

- FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C.; RYAN, M. and ROSENBERG, P. (1980) Comparison of a relatively toxic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A₂ from *Hemachatus hemachatus* snake venom II. Pharmacological proprieties in relationship to enzymatic activity. **Biochem. Pharmac.** **29**, 1565-1575.
- FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C. and ROSENBERG, P. (1981) Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A₂ from elapid snake venoms. **Toxic. Appli. Pharmac.** **59**, 375-382.
- FLORES, C. A.; ZAPPELINI, A. and PRADO-FRANCHESCHI, J. (1993) Lipoxygenase-derived mediators may be involved in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon** **31**, 1551-1559.
- FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. and KAISER, I. I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A₂. **Arch. Biochem. Biophys** **284**, 352-359
- GANS, C. and GANS, K. A. (1978) **Biology of reptilia** **8**, 1-180. New York Academic Press.
- GEISSMAN, T. A and CROUT, D. H. G. (1969) General aspects of alkaloid biosynthesis. alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid. In **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism** 1a. ed Freeman, Cooper & Company - USA, 428-463.
- GUTIÉRREZ, J. M. and LOMONTE, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** **33**: 1405-1424.
- GUTIÉRREZ, J. M. and LOMONTE, B.; (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan** **51**, 211-233.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G. and CERDAS, L. (1987) Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the Bushmaster. **Toxicon** **25**, 713-720.

- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. and CERDAS, L. (1986a) Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the *Bothrops nummifer*. **Toxicon** **24**, 885-894.
- GUTIÉRREZ, J. M. ; CRAVES, F.; MATA, E. and CERDAS, L. (1986b) Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Toxicon** **24**, 223-231.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. and ODELL, C. V. (1984a) Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Path.** **40**, 367-379.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. and ODELL, C. V. (1984b) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** **22**, 115-128.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O. and BOLANOS, R. (1980) Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon** **18**, 603-610
- HABERMANN, E. (1972) Bee and wasp venoms. **Science** **177**, 314-322.
- HART, L. A.; VAN DEN BERG, A, J.J.; KUIS, L.; VAN DUK, H. and LABADE, R. P. (1989) An anticomplementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of *Aloe vera*. **Planta Medica** **55**, 509-512.
- HAWIGER, J.; KLOCZEWIAK, M.; BEDNAREK, M. A and TIMMONS, S. (1989) Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. **Biochemistry** **28**, 2909-2914.
- HAWIGER, J.; TIMMONS, S.; KLOCZEWIAK, M.; STRONG, D. D. and DOOLITTLE, R. F. (1982) γ and α chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. **Proc. natn. Acad. Sci. Sa** **79**, 2068-2071.
- HOFFMAN, D. R. (1977) Allergens in bee venom III: identification of allergen B as acid phosphatase. **J. Allergy Clin. Immun** **59**, 364-366.

- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMONI, L. and GIGLIO, J. R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothroptoxin. **Toxicon** **26**, 615-627.
- HOMSI-BRANDEBURGO (1987) **Fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu*: caracterização química parcial de componentes ativos e estudo dos efeitos farmacológicos e anatomopatológicos da Bothroptoxina**. Tese de Doutorado (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Univ. de São Paulo), 95.
- HUANG, H. C. (1984) Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipases A₂ of *Vipera russelli* snake venom. **Toxicon** **22**, 359-365.
- ITZHAKI, R.F. and GILL, D. M. (1964) A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, **9**: 401.
- IWANAGA, S. and SUZUKI, T. (1979) Enzymes in snake venoms. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**, Vol **52**, 61-158
- KAISER, I. I.; GUTIÉRREZ, J. M.; PLUMMER, D.; AIRD, S. D. and ODELL, G. V. (1990) The amino acid sequence of myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.** **278**, 319-325.
- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G. and ZUZEL, M. (1996) Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, **34**(6), 627-642.
- KING, T. P. (1997) Immunochemical studies of stinging insect venom allergens. **Toxicon** **34** (11/12), 1455-1458.
- KINI, R. and EVANS, H. J. (1992) Structural domains in venoms proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon** **30**, 265-293.
- KORNALIK, F. and VORLOVA, Z. (1990) Non-specific therapy of a hemorrhagic diathesis after a bite by a young *Bothrops asper* (barba amarilla): a case report. **Toxicon** **28**, 1497-1501.

- KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A. and GUBENSEK, F. (1991) The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.** **202**, 1165-1168.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685.
- LIU, C. S.; CHEN, J. M.; CHANG, C. H.; CHEN, S. W.; TENG, C. M. and TSAI, I.H. (1991) The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 PLA₂ homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochem. Biophys. Acta** **1077**, 362-370.
- LLORET, S. and MORENO, J. J. (1993) Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon** **31**, 949-956.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A. and HANSON, L. A. (1993) Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cell and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** **17**, 93-105.
- LOMONTE, B. and CARMONA, E. (1992) Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol** **102b**, 325-329.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G. and CALDERON, L. (1991) Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. **Toxicon** **29**, 695-702.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. - P.; VARGAS, O.; CARMONA, E. and ROVIRA, M. E.; (1990a) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon** **28**, 1137-1146.
- LOMONTE, B.; FURTADO, M. F.; ROVIRA, M. E.; CARMONA, E.; ROJAS, G.; AYMERICH, R. and GUTIÉRREZ, J. M. (1990b) South American Snake venom proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **23**(3), 427-435.

- LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J. M. (1989) A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** **27**, 725-733.
- LOMONTE, B. and KAHAN, L. (1988) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. **Toxicon** **26**, 675-689.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MORENO, E. and CERDAS, L. (1987) Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon** **25**, 443-449.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. and MATA, E. (1985) Isolation from a polyvalente antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon** **23**, 807-813.
- MACKESSY, S. P. (1996) Characterization of the major metalloprotease isolated from the venom of the northern pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*. **Toxicon** **34** (11/12), 1277-1285.
- MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA, G. J. and DINIZ, C. R. (1981) Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the bushmaster snake *Lachesis muta noctivaga* **Toxicon** **19**, 273-294.
- MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; GIGLIO, C. A.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; VIEIRA, C. A. and GIGLIO, J. R. (1997) The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A₂. **Biochemistry and Molecular Biology International** **42**(6), 1171-1177.
- MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A. B.; LACHAT, J. J.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; OWNBY, C. L. and GIGLIO, J. R. (1995) Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of Piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon** **33**(5), 615-626.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. and REICHL, A. P. (1984) Characterization of two hemorrhagic factor isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon** **22**, 193-195.

- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A. P. and ASSAKURA, M.T. (1976) Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: **Animal, Plant and Microbial Toxins**, Vol. I, (OHSAKA, A.; HAYASHI, K. and SAWAY, Y., Eds) New York: Plenum Press, 111-121.
- MARANGONE J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J. and HEINRICKSON, R. L. (1984) A new class of phospholipase A₂ with lysine in place of aspartate 49. **J. Biol. Chem.** **259**, 13839-13843.
- MARKLAND, F. S. and DAMUS, P. S. (1971) Purification and properties of enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*. **J. Biol. Chem.** **246**, 6460-6465.
- MARTZ, W. (1992) - Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon** **30**, 1131-1142.
- MATRISIAN, L. M. (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays**, **14**, 455.
- MEISTER, A. (1965) The use of snake venom L-amino acid oxidase for the preparation of α -keto acid. In: **Venoms**, Buckley, E. E.; Porges, N. (Eds.): Washington D.C.: Amer. Ass. Adv. Sci 259-302.
- MELO, J. C. P. e CORTEZ, D. A. G. (1997) Taninos e Lignanas: características químicas, farmacológicas e de manipulação. **I Encontro Racine de fitoterapia e fitocosmética - III Jornada Paulista de plantas medicinais**
- MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C. do; MORS, W. B. and SUAREZ-KURTZ, S. (1994) Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** **32**(5), 595-603.
- MOLLAY, C. and KREIL, G. (1974) Enhancement of bee venom phospholipase A₂ activity by melittin, direct lytic factor cobra venom and polymyxin B. **Fedn. Eur. Biochem. Socs Lett.** **46**, 141-144.

- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. (1987) Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrogenase activity isolated from *Crotalus ruber ruber* venom. **Arch. Biochem. Biophys** **253**, 108-112.
- MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; DA SILVA, M. H.; MELO, P. A. and SUAREZ-KURTZ, G. (1989) Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (asteraceae). **Toxicon** **27**, 1003-1009.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G. and THEAKSTON, R.D.G. (1991) Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** **29(6)**, 713-723.
- MOURA CAMPOS, M. (1976) Espectroscopia no ultravioleta e no infravermelho In **Química Orgânica**. São Paulo Edgar Blucher, Ed. da Univer. São Paulo.
- NAKASHIMA, K.; OGAWA, T.; ODA, N.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; KIHARA, H. and OHNO, M. (1993) Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A₂ isozymes. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA** **90**, 5694-5968.
- NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; OVADIA, M.; MOUSSATCHÉ and DOMONT, D. B. (1997) Inhibitory properties of the antiothropic complex from the South American Opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon** **35(6)**, 849-863.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H. and TU, A. T. (1984) Isolation and Biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.** **231**, 309-311.
- OHSAKA, A. (1979) Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. **Hand. Exp. Pharmac.** **52**, 480-546.
- OLIVEIRA, F. O. (1997) **Purificação e caracterização química parciais de uma enzima proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni* (Caissaca)**. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de Uberlândia-MG), 91.

- OUYANG, C.; TENG, C. M. and HUANG, T. F. (1992) Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon** **30**, 945-966.
- OUYANG, C.; TENG, C. M. and CHEN, Y. C. (1979) Properties of fibrinogen degradation products produced by α - and β -fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon** **17**, 121-126.
- OWNBY, C. L.; POWELL, J. R.; JIANG, M. S. and FLETCHER, J. E. (1997) Melittin and phospholipase A₂ from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon** **35**(1), 67-80.
- OWNBY, C. L. (1990) Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: **Handbook of Toxinology**, 602-654.
- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R. and ODELL, G. V. (1986) In vivo ability of antimyotoxin a serum plus polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon** **24**, 197-200.
- OWNBY, C. L.; WOODS, W. M. and ODELL, G. V. (1979) Antiserum to myotoxin from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon** **17**, 373-380.
- PACHECO, S.; SILVA, N F. and FRANCO, P. F. (1995) Atividade antibotrópica do chá de quiabo, *Hibiscus esculentus*. **Rev. Bras. Farm.** **76**, 61-62.
- PAINE, M.; DEMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. G. and CRAMPTON, J. M. (1992) Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.** **267**, 22869-22876.
- PARIKH, J. R.; GREENSTEIN, J. P.; WINITZ, M. and BIRNBAUM, S. M. (1958) The use of amino acid oxidase for small-scale preparation of the optical isomers of amino acids. **J. Amer. Chem. Soc.** **80**, 953-958.
- PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. and DOMONT, G. B. (1994) Isolation and partial characterization of an antibotrophic complex from serum of South American *Didelphidae*. **Toxicon** **32**, 1237-1249.

- PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. (1992) Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III- Atividade antiedematogênica. **Rev. Bras. Farm.** **73**, 85-86.
- PEREIRA, N. A.; PEREIRA, B. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P. and MORS, W. B. (1994) Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Med.** **60**, 99-100.
- PEREIRA, N. A.; RUPPELT, B. M.; do NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P. and MORS, W. B. (1991) An update on plants against snake bite. **2. Simpósio Brasileiro-Alemão de Produtos Naturais**, Hannover, F.R.G 28 July-10 August.
- PESSATTI, M. L.; FONTANA, J. D.; FURTADO, M. F. D.; GUIMARAES, M. F.; ZANETTE, L. R. S.; COSTA, W. T. and BARON, M. (1995) Screening of *Bothrops Snake venoms* for L-Amino Acid Oxidase Activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology** **51/52**, 197-210.
- PIRKLE, H. and STOCKER, K. (1991) Thrombin-Like Enzymes From Snake Venoms: An Inventory. **Thromb. Haemost** **65**, 444-450.
- RAMPART, M. (1994) Neutrophil-endothelial cell interactions. In: **Handbook of Immunopharmacology, Immunopharmacology of the Microcirculation**, (BRAIN, S. D.; Ed.) London: Academic Press., 77-107.
- RIBEIRO, L. A.; PIRES DE CAMPOS, V. A. F. ; ALBUQUERQUE, M. DE J.; TAKAOKA, N. Y. (1993). Acidente ofídico no estado de São Paulo. **Rev. Ass. Med. Brasil** **39**(1), 7-10.
- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B.; PEREIRA, N. A. (1988) Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente veneno de cobra. **Rev. Bras. Farm.** **69**, 82-86.
- RODRIGUES, M.; CARVALHO, J. C. T.; LUCIA, M.; MESQUITA, J. M. O. and SARTI, S. J. (1997) Avaliação da atividade antiofídica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Swartz sobre modelos animais estimulados com o veneno de *Bothrops alternatus*. **III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**: 110-111

- RODRIGUES, V. M.; (1996) **Isolamento e Caracterização Química Parciais de duas miotoxinas do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada)**. Dissertação de Mestrado(Universidade Federal de Uberlândia-MG), 96.
- ROSENBERG, P. (1990) Phospholipases. In: **Handbook of Toxinology**, 67-277. New York: marcel Dekker.
- ROSENFELD, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in south America. In: **Venomous Animals and their venoms**. Vol II., 345-362 (Bucherl, W. and Buckley, e. E., eds.) New York: Academic Press.
- RUCAVADO, A. and LOMONTE, B. (1996) Neutralization of myonecrosis, hemorrhage and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. **Toxicon** 34(5), 567-577.
- RUPPELT, B. M.; PEREIRA. E. F. R.; GONÇALVES, L. C. and PEREIRA, N. A. (1990) Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. I. Atividades analgésica e antiinflamatória. **Rev. Bras. Farm.** 71, 54-56.
- SANCHES, E. F.; MAGALHÃES, A. and DINIZ, C. R. (1987) Purification of hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of bushmaster snake, *Hesis muta muta*. **Toxicon** 25, 611-614.
- SANTORO, S. A; RAJPARA, S. M.; STAATZ, W. D. and WOODS, V. L. (1988) Isolation and characterization of a plateletsurface collagen binding complex to VLA-2. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 153, 217-223.
- SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J. W.; NAUGHTON, M. A.; PHILLIPS, D. R.; NANNIZZI, L.; ARFSTEN, A.; CAMBELL, A. M. and CHARO, I. F. (1993) Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit vipers venoms. **J. Biol. Chem.** 268, 1058-1065.
- SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P. and GIGLIO, J. R. (1990) Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** 28, 261-273.

- SELISTRE, H. S. and GIGLIO, J. R. (1987) Isolation and characterization of a thrombine-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon** **25**, 1135-1144.
- SHIBA, T. and CAHNMANN, H. J. (1962) Conversion of 3,4-Diiodotyrosine to thyroxine by rattlesnake venom. **Biochim. Biophys. Acta (Amst.)** **58**, 609-610.
- SOARES, A.M. (1997) **Caracterização Bioquímica Parcial das miotoxinas Básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: sequência aminoterminal, cristalografia e estudo da transição dos estados nativo e desenhado.** Dissertação de Mestrado (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo), 91.
- SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A. B.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. and GIGLIO, J. R. (1997) Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A₂ from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum. **Biochem. and Molecular Biology International** **43(5)**, 1091-1099.
- SOARES, A. M. (1994) **Caracterização das atividades enzimáticas presentes na peçonha de *Bothrops jararacussu* Lacerda, 1884 (Viperidae-crotalinae): purificação parcial de proteínas Biologicamente ativas.** Monografia (Universidade Federal de Uberlândia-MG), 70.
- SOUZA, G. H. B.; CARVALHO, J. C. T.; UJIKAWA, K. and NETO, J. J. (1997) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas utilizadas na medicina popular brasileira. **III Jornada Paulista de Plantas medicinais**: 92-93.
- STOCKER, K. and MEIER, J. (1988) Thrombin-like snake venom enzyme. In **Hemostasis and Animal Venoms** v.7 (Pirkle, H.; Markland, F. S.; Jr Edds). New York: Marcel Dekker.
- SUSUKI, T. and IWANAGA, S. (1970) Snake venoms. In: Erdos, E.G. (ed): Bradykinin, kallidin and Kallikrein. **Handbook of Experimental Pharmacology**, vol. 25, 193-212, Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

- TAN, N. H. and PONNUDURAI, G. (1990) A comparative study of the biological properties of venoms from snakes of the genus *Vipera* (true adders). **Comp. Biochem. Physiol.** 96B, 683-688.
- TREBIEN, H. A. and CALIXTO, J. B. (1989) Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions** 26, 292-300.
- TU, A. T. (1977) Blood coagulation. In: Venoms Chemistry and Molecular Biology, Jonh Wiley and Sais venoms. **Toxicon** 19, 535-538.
- VAN DEENEN, L. L. M. and DE HAAS, G. H. (1963) The substrate specificity of phospholipases A₂. **Biochem. Biophys. Acta** 70, 538-553.
- VOGT, W.; PATZOR, P.; LEGE, L.; OLDIGS, H. D. and WILLIE, G. (1970) Synergism between phospholipase A₂ and various peptides and SH-reagents in causing haemolysis. **Naunyn -Schimierdebergs Arch. Pharmak** 265, 442-447.
- WEIL, C. S. (1952) Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD₅₀ or ED₅₀) and instructions in their use. **Biometrics** 8, 249-263.
- WEISS, H. J.; TURITTO, V. T. and BSUMGSRTNER, H. R. (1986) Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIv-IIIa e Ib and storage α -granules. **Blood** 67, 322-330.
- YAN, Y.; JACKSON, S. P.; MITCHELL, C. A. and SALEM, H. H. (1993) Purification and characterization of snake venom phospholipase A₂; a potent inhibitor of platelet aggregation. **Thromb. Res.** 70(6), 471-481.
- ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G. M.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. and DE LIMA, M. E. (1996) Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon** 34(7), 807-819.
- ZHU, Z.; GONG. W.; ZHU, X; TENG, M. and NIU, L. (1997) Purification, characterization and conformational analysis of a haemorrhagin from the venom of *Agkistrodon acutus*. **Toxicon** 35(2), 283-292.