

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Genética e Bioquímica
Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Neutralização dos principais efeitos tóxicos da peçonha de
Bothrops neuwiedi pauloensis pelo extrato aquoso de
Casearia mariquitensis (Flacourtiaceae)

Luiz Fernando Moreira Izidoro

Uberlândia-MG
2001

SISBI/UFU



1000204217

Neutralização dos principais efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops
neuwiedii pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia maríquitensis*
(Flacourtiaceae)

Luiz Fernando Moreira Izidoro

Uberlândia-MG

2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Genética e Bioquímica
Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

MON
615.949:597.126
I77
TES/ME

**Neutralização dos principais efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops
neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia maríquitensis*
(Flacourtiaceae)**

Luiz Fernando Moreira Izidoro

Orientação: Prof^a Dr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia como
parte das exigências para a obtenção do
Título de Mestre em Genética e Bioquímica,
área de concentração-Bioquímica.

Uberlândia-MG
2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Genética e Bioquímica
Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1-TÍTULO:

Neutralização dos principais efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae)

2-ALUNO: Luiz Fernando Moreira Izidoro

3-ORIENTADOR: Prof^a Prof^a Dr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo

4-DATA: 28/09/2001

5-BANCA EXAMINADORA:

Titular: Prof^a Dr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo

Titular: Prof^a Dr^a Amélia Hamaguchi

Titular: Prof^a Dr^a Benvinda Rosalina dos Santos

Suplente Convidado: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei... cada um de nós constrói sua própria estória e cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz.

Renato Teixeira

DEDICATÓRIA

✓ Dedico este trabalho aos meus pais PAULO e JANDIRA, exemplos de honestidade e dignidade humana. Vocês me ensinaram o significado da palavra vida.

✓ Ao meu irmão ADRIANO, pessoa humana que muitas vezes erra na esperança de conseguir um dia melhor. Te amo meu irmão.

✓ À memória de meu irmão PAULO, que em um trágico 10 de março atendeu ao pedido de seu CRIADOR, nos deixando apenas com a presença de sua ausência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente às minhas amigas MÁRCIA HELENA e VERIDIANA; pessoas que ficam felizes com as conquistas de seus amigos, agradeço também pela nossa convivência e por tudo que vocês me ensinaram. Eu tenho o maior orgulho de saber de nossa amizade.

Agradeço minha irmã de coração ALESSANDRA CRISTINA, por sempre ouvir minhas lamentações.

Agradeço ao FÁBIO OLIVEIRA por sempre falar palavras certas nas horas certas.

À professora AMÉLIA HAMAGUCHI, pessoa amiga e sempre disposta a passar um pouco de seus conhecimentos.

À professora MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO por ter cedido a mim um espaço de seu laboratório e por ter corrigido de forma ativa o que eu havia rascunhado.

Agradeço aos amigos de laboratório; Luiz Carlos, Willian, Gilvan, Cynthia, Helen, Poliana, Júnia, Carla, Rone, Francislene,

Fábio Moroni, Neigmar, Ana Flávia e também à Tatiana ainda que em silêncio, eu tenho boas recordações da época em que conversávamos.

Ao Rodrigo Magrin, pessoa amiga e companheira que sempre me ouviu.

Agradeço à ELISÂNGELA, pessoa de grande sensibilidade e amiga.

À RENATA por ser amiga e extremamente preocupada com o bem estar de seus amigos.

À CRISTIANE BALDO (miss BALDO) por sempre estar disposta a ajudar.

Agradeço ao Pablo Marco Veras Peixoto pela sua boa vontade em servir seus companheiros de curso.

Agradeço ao professor Glein Monteiro de Araújo, pelo auxílio ao reconhecimento da *Casearia mariquitensis*.

A Pentapharm do Brasil, por ter doado os animais experimentais.

Agradeço especialmente a minha amiga ADRIANA SANTA CECÍLIA BORGES, pelo auxílio aos cálculos estatísticos.

Agradeço a todos os funcionários do instituto: Gerson, Marlene, Cida, Sr. Vilmar, Tianinha, Cleuber e D. Nenzinha; que de algum contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários JOSÉ FERREIRA, SANDRA, CRISTIANE e ao Laboratório de Análises Clínicas da FAEPU, pela ajuda indispensável.

À FAPEMIG e ao CNPq por terem financiado este trabalho.

Aos meus amigos do passado que estão muito bem guardados em meu coração.

Agradeço a todas aquelas pessoas que de algum modo colaboraram comigo.

A DEUS pelo dom da vida.

Sumário

I) Introdução geral.....	01-15
II) Referências bibliográficas.....	16-32
Capítulo I: Inibição dos efeitos biológicos causados pela peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>.....	33
Resumo.....	33
Abstract.....	34
1) Introdução.....	36
2) Objetivos.....	37
3) Materiais.....	37
3.1) Peçonha bruta.....	37
3.2) Folhas de <i>Casearia mariquitensis</i>	37
3.3) Animais.....	37
3.4) Reagentes.....	38
3.5) Equipamentos.....	38
4) Métodos.....	38
4.1) Preparação das amostras de peçonha.....	38
4.2) Dosagem de proteínas.....	38
4.3) Preparação do extrato vegetal.....	39
4.4) Inibição dos efeitos biológicos causados pela peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>	39
4.4.1) Atividade fosfolipásica A_2 (PLA ₂).....	39
4.4.2) Atividade coagulante.....	40
4.4.3) Incoagulabilidade sanguínea	41
4.4.4) Atividade hemorrágica.....	41
4.4.5) Atividade fibrinogenolítica.....	42
4.4.6) Dosagem de fibrinogênio plasmático.....	43

4.4.7) Produção de anticorpos.....	44
4.4.7.1) Hiperimunização dos camundongos.....	44
4.4.7.2) Imunodifusão.....	45
4.5) Análise estatística dos resultados.....	45
5) Resultados.....	46
5.1) Ensaio de inibição dos efeitos biológicos causados pela peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>.....	46
5.1.1) Atividade fosfolipásica A ₂ (PLA ₂).....	46
5.1.2) Atividade coagulante.....	48
5.1.3) Inibição da atividade hemorrágica.....	49
5.1.4) Incoagulabilidade sanguínea	51
5.1.5) Dosagem de fibrinogênio plasmático.....	53
5.1.6) Atividade fibrinogenolítica.....	54
5.1.7) Produção de anticorpos.....	55
5.1.7.1) Hiperimunização dos camundongos.....	55
5.1.7.2) Imunodifusão.....	55
6) Discussão.....	57
7) Referências bibliográficas.....	62
Capítulo II: Inibição da toxicidade e letalidade peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato aquoso de <i>Casearia mariquitensis</i>.....	67
Resumo.....	67
Abstract.....	68
1) Introdução.....	70
2) Objetivos.....	71
3) Materiais.....	71

3.1) Peçonha bruta.....	71
3.2 Folhas de <i>Casearia mariquitensis</i>	71
3.3) Animais.....	72
3.4) Reagentes.....	72
3.5) Equipamentos.....	72
4) Métodos	72
4.1) Preparação das amostras de peçonha.....	72
4.2) Dosagem de proteínas.....	73
4.3) Preparação do extrato vegetal.....	73
4.4) Alterações hematológicas.....	73
4.4.1) Alterações hematológicas induzidas pela peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>	74
4.4.2) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato aquoso de <i>Casearia mariquitensis</i> quando combinados antes da aplicação.....	74
4.4.3) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo pré-tratamento via intraperitoneal com extrato vegetal de <i>Casearia mariquitensis</i>	75
4.5) Ensaio de inibição de letalidade da peçonha.....	76
4.5.1) Após combinar peçonha bruta e extrato vegetal.....	76
4.5.2) Após pré-tratamento com extrato vegetal.....	76
4.5.2.1) Via oral.....	76
4.5.2.1) Via intraperitoneal.....	77
4.6) Determinação da toxicidade do extrato de <i>Casearia mariquitensis</i> por via intraperitoneal.....	77
A) Por aplicação de doses consecutivas.....	77
B) Por aplicação de uma única dose.....	78
4.7) Determinação da toxicidade do extrato vegetal por via oral.....	78
4.8) Análise estatística dos resultados.....	79
5) Resultados	80
5.1) Alterações hematológicas.....	80

5.1.1) Alterações hematológicas induzidas pela peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>	80
5.1.2) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo extrato aquoso de <i>Casearia mariquitensis</i> quando combinados antes da aplicação.....	81
5.1.3) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> pelo pré-tratamento via intraperitoneal com extrato vegetal de <i>Casearia mariquitensis</i>	82
5.2) Ensaio de inibição de letalidade da peçonha.....	84
5.2.1) Após combinar peçonha bruta e extrato vegetal.....	84
5.2.2) Após pré-tratamento com extrato vegetal.....	85
5.2.2.1) Via oral.....	85
5.2.2.2) Via intraperitoneal.....	87
5.3) Determinação da toxicidade do extrato de <i>Casearia mariquitensis</i> por via intraperitoneal.....	89
A) Por aplicação de doses consecutivas.....	89
B) Por aplicação de uma única dose.....	91
7.4) Determinação da toxicidade do extrato vegetal por via oral.....	93
6) Discussão.....	94
7) Referências bibliográficas.....	99

Lista de figuras do capítulo I

- Fig. 01:** Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.....47
- Fig. 02:** Inibição da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pela presença do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.....50
- Fig. 03:** Aumento do tempo de coagulação espontânea do sangue total de animais inoculados com peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pela presença do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.....52
- Fig. 04:** Inibição da atividade desfibrinogenante da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*.....53
- Fig. 05:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação da digestão do fibrinogênio bovino pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* combinada com extrato de *Casearia mariquitensis*.....54
- Fig. 06:** Imunodifusão da peçonha bruta com os respectivos anticorpos anti-peçonha bruta..... 56

Lista de figuras do capítulo II

- Fig. 01:** Aumento na expectativa de vida de camundongos após receberem 5 mg de PB/kg de animal combinadas com 50mg de EV/kg de animal.....85
- Fig. 02:** Inibição da letalidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo pré-tratamento via oral com extrato de *Casearia mariquitensis*.....86
- Fig. 03:** Inibição da letalidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo pré-tratamento via intraperitoneal com extrato de *Casearia mariquitensis*.....87
- Fig. 04:** Porcentagem de animais sobreviventes após pré-tratamento via intraperitoneal com extrato de *Casearia mariquitensis*.....88

Lista de tabelas do capítulo I

- Tab. 01:** Inibição da atividade coagulante sobre o plasma bovino da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pela presença do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.....48

Lista de tabelas do capítulo II

- Tab. 01:** Alterações hematológicas causadas pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em função do tempo.....80
- Tab. 02:** Inibição das alterações hematológicas de animais inoculados com peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.....82
- Tab. 03:** Hemogramas de animais pré-tratados durante 6 dias com extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* e inoculados com 0,6DL₅₀ da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.....83
- Tab. 04:** Hemogramas dos animais do grupo I que receberam via intraperitoneal 0,2 mg de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*/dia durante 5 dias.....89
- Tab. 05:** Hemogramas dos animais do grupo II que receberam via intraperitoneal 1,0 mg de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*/dia durante 5 dias.....90
- Tab. 06:** Principais efeitos tóxicos observados em camundongos após receberem uma única dose de extrato de *Casearia mariquitensis* pela via intraperitoneal92
- Tab. 07:** Hemogramas de animais inoculados via oral com 2,0 mg de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* durante 5 dias (2,0mg/animal/dia).....93

Lista de abreviaturas

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

DL₅₀: dose letal 50%.

DMC: dose mínima coagulante.

DMH: dose mínima hemorrágica.

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

EV: extrato vegetal.

i.p.: intraperitoneal.

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida.

PB: peçonha bruta.

PLA₂: Fosfolipase A₂ (E.C.3.1.1.4.).

SDS: dodecil sulfato de sódio.

TEMED: N, N, N', N', - tetrametil etilenodiamina.

TRIS: tris hidroximetilaminometano.

INTRODUÇÃO GERAL

As peçonhas de serpentes são provavelmente as mais complexas de todas as peçonhas animais. Cerca de 90 a 95 % de seu peso seco é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas, podendo exercer diferentes atividades farmacológicas (DALMORA et al., 1992).

As frações denominadas não protéicas são representadas por carboidratos, lipídeos, aminas e sais inorgânicos (FRANÇA & FAN, 1992).

Embora sejam consideradas instrumentos de defesa contra predadores, as peçonhas, principalmente as de serpente, apresentam uma série de proteínas tóxicas para os organismos vivos que podem atuar sozinhas ou de modo sinérgico, potencializando sua toxicidade.

As serpentes botrópicas encontram-se distribuídas em todo nosso território e são responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos (86,16%) (ROSENFELD, 1971; FERREIRA et al., 1992; RIBEIRO, 1993; BARRAVIERA, 1994); habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, locais de proliferação de roedores; possuem hábitos noturnos, são muito agressivas e se ameaçadas atacam em silêncio.

Os principais efeitos locais, após o envenenamento botrópico, se caracterizam pela perda de tecido, diminuição da capacidade motora na região afetada, mionecrose, abscesso (SABORIO et al., 1998) e isquemia (QUIROGA et al., 2000). Os mesmos autores também atribuem parte da infecção local à bactérias Gram positivas e Gram negativas encontradas na saliva da serpente.

Nas regiões Sul e Sudeste observa-se um declínio dos acidentes de maio a agosto, que coincide com o inverno; nesta época as serpentes se movimentam pouco e as atividades agrícolas são reduzidas (BARRAVIERA, 1994).

As peçonhas de serpentes são ricas em enzimas proteolíticas que atuam em uma grande variedade de substratos como a caseína, colágeno, fibrinogênio, elastina e outros (IWANAGA & SUZUKI, 1979). Algumas destas enzimas são toxinas hemorrágicas por degradarem proteínas da matriz extracelular (MATRISIAN, 1992); enquanto outras afetam a coagulação do sangue agindo como procoagulantes na conversão do fibrinogênio em fibrina (ação coagulante tipo trombina)

(MARKLAND, 1998; SMOLKA et al., 1998); ou como anticoagulantes por exercerem ação fibrinogenolítica e/ou fibrinolítica (KOMORI et al., 1986).

As enzimas proteolíticas responsáveis por induzir desequilíbrio hemostático, geralmente são agrupadas em duas classes distintas: as serinoproteases e as metaloproteases (SOUSA et al., 2001).

As serinoproteases, com algumas exceções, apresentam ambas atividades fibrinolítica e fibrinogenolítica e são chamadas de proteases “thrombin-like”. Estas enzimas administradas na corrente sanguínea causam desfibrinogenação, devido ao efeito proteolítico sobre as cadeias A α e B β , resultando na liberação de pequenos fragmentos denominados fibrinopeptídeos A e B, que posteriormente se polimerizam formando monômeros de fibrina (coágulo frouxo) que podem ser removidos rapidamente da circulação por fibrinólise ou via sistema retículo endotelial (MAHIR et al, 1987).

Estas serinoproteases (thrombin-like) não são capazes de ativar o fator XIII da cascata de coagulação, desta maneira não há formação de coágulo “denso” de fibrina, favorecendo a fibrinólise. Um outro efeito destas toxinas é induzir a agregação plaquetária (MARKLAND, 1998), ativar o fator X da cascata de coagulação do sangue na presença de fosfolipídeos, plaquetas e cálcio (ARAÚJO et al., 2001).

Investigações clínicas e laboratoriais em pacientes picados por serpentes botrópicas têm confirmado “in vivo” o efeito anticoagulante destas peçonhas (KAMIGUTI et al., 1986; MURUYAMA et al., 1990). A incoagulabilidade do sangue pode tornar-se mais acentuada quando a vítima for picada por uma serpente jovem, cujas enzimas “thrombin-like” presentes na peçonha encontram-se em maiores concentrações, ocasionando um consumo mais rápido de todo o fibrinogênio (SANO-MARTINS, 1990). RIBEIRO & JORGE (1989) também verificaram incoagulabilidade do sangue de vítimas picadas por serpentes jovens da espécie *jararaca*.

As enzimas “thrombin-like” têm aplicação terapêutica na prevenção e tratamento de desordens trombóticas, bem como na produção de cola de fibrina que

é um adesivo biológico utilizado para aumentar o poder de cicatrização em suturas (LEITE et al., 2000).

STOCKER & BARLOW (1976) purificaram uma enzima “thrombin-like” da peçonha de *Bothrops moojeni* denominada Batroxobina, que é usada na clínica médica como agente anticoagulante e antitrombótico. As “thrombin-like” quando administradas “in vivo” causam efeito desfibrinogenante, mas “in vitro” são procoagulantes.

A batroxobina causa redução na quantidade de fibrinogênio plasmático e por consequência, diminuição na viscosidade do sangue, afastando assim a possibilidade da formação de coágulos.

OYAMA & TAKAHASHI (2000) purificaram e caracterizaram uma enzima “thrombin-like” da peçonha de *Trimersurus elegans* chamada elagaxobin com capacidade de converter fibrinogênio em fibrina, clivando apenas a cadeia A α e liberando somente fibrinopeptídeo A.

As metaloproteases de peçonhas de serpentes são altamente tóxicas e na maioria das vezes apresentam atividade fibrinogenolítica (MARKLAND, 1998) e são responsáveis pelo quadro hemorrágico verificado após o envenenamento (MATRISIAN, 1992). As metaloproteases com ação fibrinogenolítica, assim como as serino-proteases levam a incoagulabilidade do sangue, podendo também ser aplicáveis na dissolução de trombos (MATSUI et al., 2000).

Estas enzimas denominadas fibrinogenases, podem ser classificadas em três grupos diferentes, de acordo com sua especificidade em hidrolisar as cadeias do fibrinogênio. As fibrinogenases do primeiro grupo, são aquelas com especificidade para clivar a cadeia A α do fibrinogênio, são zinco dependentes e apresentam peso molecular entre 20.000 e 26.000.

O segundo grupo das fibrinogenases são aquelas com especificidade pela cadeia B β do fibrinogênio e são classificadas como serino-proteases. O terceiro grupo de fibrinogenase é bastante raro e apresentam especificidade pela cadeia γ do fibrinogênio.

RODRIGUES et al. (2000) purificaram a neuwiedase, uma metaloproteinase da peçonha de *Bothrops neuwiedi*, com atividade fibrinogenolítica e fracamente hemorrágica que também mostrou atividade proteolítica sobre a fibrina e alguns componentes da matriz extracelular.

A lebetase isolada da peçonha da *Vipera lebetina* por SIIGUR et al. (1996) é uma metaloproteinase fibrinogenolítica com massa molecular de 23.700, que causa hidrólise total da cadeia alfa (α) e parcial da beta (β) do fibrinogênio. Esta enzima, na presença de EDTA, é inibida. Anticorpos anti-lebetase foram produzidos e uma reação cruzada foi observada com componentes de peçonhas de outras espécies de serpentes.

BJARNASON & FOX (1994) dividiram as metaloproteases hemorrágicas em 4 classes de acordo com suas massas moleculares. A classe I, são toxinas pequenas, com fraca atividade hemorrágica e massa variando entre 20 a 30 kDa; a classe II, possui tamanho médio e massas moleculares de 30 a 60 kDa; já a classe III, são toxinas maiores, extremamente hemorrágicas e massas moleculares de 60 a 80 kDa e a classe IV com massa molecular de 80 a 100 kDa.

As metaloproteases caracterizadas como toxinas hemorrágicas ou hemorraginas são responsáveis pelas hemorragias locais e sistêmicas após o envenenamento (PETRETSKI et al., 2000). São dependentes de íons cálcio ou zinco para a catálise (MARSH, 1994) e podem ser inibidas na presença de citrato, EDTA e 1,10 fenantrolina; agentes quelantes destes íons metálicos (ODELL et al., 1998). Segundo MANDELBAUM (1990), a hemorragia pode ser causada pela destruição enzimática da membrana basal, e conseqüentemente, perda da integridade vascular. O rompimento da membrana basal se dá a nível das junções entre as células endoteliais, formando aberturas (poros) por onde ocorre o escoamento do sangue.

Da peçonha de *Bothrops neuwiedi* já foram isolados dois fatores hemorrágicos denominados de NHFa e NHFb, são proteínas ácidas com pontos isoelétricos de 4.2 e 4.3, e massa molecular 46kDa e 58kDa, respectivamente. Estas

toxinas são altamente hemorrágicas com uma dose mínima hemorrágica (DMH) de 4.8 η g para NHFa e 0.2 η g para NHFb (ASSAKURA, 1988).

A ação tóxica das peçonhas também está relacionada com um outro grupo de enzimas, as fosfolipases A₂ (PLA₂). Enzimas fosfolipases são amplamente distribuídas na natureza; podendo ser encontradas nas formas extra ou intracelulares (BOSCH, 1980). As extracelulares são fosfolipases do tipo A₂, abundantes nas peçonhas de serpentes e artrópodes e no suco pancreático (SOARES et al., 1998).

Estas enzimas apresentam importantes papéis no catabolismo dos lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membrana; são enzimas hidrolíticas que clivam fosfolipídeos. Especificamente, as fosfolipases A₂ hidrolisam a ligação acil na posição sn 2 do fosfoglicerídeo (DANIELE et al., 1997) liberando como produto final o ácido graxo, que pode ser o araquidônico e lisofosfatídeos. As PLA₂ são todas enzimas de baixo peso molecular com uma estrutura terciária muito rígida devido à presença de 5 a 8 pontes dissulfeto (SCOTT et al., 1990). Isto confere a estas enzimas uma grande estabilidade tanto contra proteólise quanto resistência à desnaturação, mantendo sua atividade enzimática intacta nos fluidos extracelulares onde são encontradas.

Estas enzimas estão envolvidas em diversos processos celulares e no controle da síntese de uma grande variedade de lipídeos bioativos, incluindo eicosanóides e fator de agregação plaquetária, os quais são fatores regulatórios implicados em diversos estados patológicos e fisiológicos.

Vários efeitos locais proeminentes são observados pela ação das PLA₂: dor, edema e necrose do tecido muscular (PÉREZ et al., 1998). Segundo os mesmos autores, dentre as serpentes botrópicas podemos citar *Bothrops jararaca* e *jararacussu* como muito edematizante, enquanto *Bothrops neuwiedi diporus* e *B. alternatus* como medianamente edematizante.

Muitas PLA₂ encontram se envolvidas em outras ações tóxicas como neurotoxicidade, hemólise e atividade inflamatória ou citotóxica (DAVIDSON & DENNIS, 1991).

Assim, fosfolipases A_2 extraídas da peçonha bruta de *Bothrops insularis* fracionadas e purificadas demonstraram que interferem na transmissão de impulsos nervosos; bloqueando diretamente junções neuromusculares (ação pré sináptica); esta ação é dose dependente (COGO et al., 1998). Um grande número de PLA_2 tem sido purificado das peçonhas botrópicas, sendo que as ácidas e neutras geralmente não apresentam toxicidade. Da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* foram isoladas três fosfolipases ácidas, denominadas de SPI, SPII e SPIII que não apresentam atividade tóxica (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988), enquanto da peçonha de *Bothrops lanceolatus* também foi isolada uma mistura de várias isoformas de fosfolipases ácidas não tóxicas, onde duas delas consistiam de uma única cadeia polipeptídica com pesos moleculares de 14.500 e 15.000 respectivamente (ARAÚJO et al., 1994). DANIELE et al. (1997) também isolaram e purificaram duas isoformas de PLA_2 ácidas da peçonha de *Bothrops neuwiedi* (Yarará chica) que não apresentam nenhuma atividade letal utilizando doses acima de $5\mu\text{g/g}$ de animal.

As fosfolipases A_2 miotóxicas das peçonhas botrópicas podem ser divididas em duas classes principais: aquelas com atividade enzimática sobre substratos artificiais; as ASP_{49} , e aquelas com ausência de atividade catalítica, as LYS_{49} (MARANGONE et al., 1984; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995; ARNI & WARD, 1996).

A maioria das fosfolipases A_2 básicas já isoladas apresentam atividade miotóxica que é caracterizada pela ação direta da peçonha sobre o músculo esquelético, afetando somente fibras musculares.

ANGULO et al. (1997) isolaram também uma nova fosfolipase A_2 com atividade miotóxica da peçonha da serpente *Bothrops schlegelii* de hábito arbório. Esta toxina induz rápida mionecrose sobre fibras musculares, evidenciada por um aumento de creatina quinase plasmática.

SOARES et al. (2000) descreveram as características estrutural e funcional de uma miotoxina homóloga à PLA_2 , a Lys_{49} da peçonha de *Bothrops neuwiedi*

pauloensis que além de apresentar atividade bactericida, promoveu bloqueio de contrações neuromusculares e foi capaz de induzir edema.

Algumas das miotoxinas botrópicas ocorrem como dímeros, por exemplo, as miotoxinas II e III de *Bothrops asper* (LOMONTE et al., 1989), miotoxina de *Bothrops nummifer* (GUTIÉREZ et al., 1986), miotoxina de *Bothrops insularis* (SELISTRE et al., 1990), miotoxinas MV e MVI de *Bothrops moojeni* (SOARES, 1997).

Estudos cristalográficos têm sido feitos para elucidar a estrutura destas miotoxinas, além de definir sítios tóxicos ou catalíticos, facilitam o entendimento do mecanismo de ação destas proteínas (ARNI et al., 1995).

Da peçonha de *Bothrops moojeni* (caissaca), SOARES et al. (1998), isolaram e cristalizaram uma miotoxina II Lys₄₉ desprovida de atividades PLA₂, coagulante e hemorrágica, mas com capacidade de induzir mionecrose em músculo gastrocnêmio e edema na pata de camundongos.

Miotoxinas purificadas possibilitam a produção de anticorpos policlonais e monoclonais (BORGES, 1995; LOMONTE & KAHAN, 1988), que são utilizadas para neutralizar a peçonha bruta e para estudos de reação cruzada entre miotoxinas de diferentes peçonhas. BORGES (1995) produziu anticorpos policlonais contra as miotoxinas da peçonha bruta de *B. jararacussu* (Bth TX-I e Bth TX-II), e verificou a presença de reação cruzada entre as mesmas, podendo estar relacionada com alta homologia estrutural entre estas duas proteínas.

Vários distúrbios hematológicos são observados nos envenenamentos animais, principalmente aqueles causados por serpentes, e o hemograma em última análise, representa o meio mais direto e prático de se estudar os elementos figurados do sangue periférico (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas). Estes elementos celulares sofrem alterações, às vezes muito acentuadas, no decurso de praticamente todas as moléstias e por este motivo tornou-se um exame de rotina bastante usual. Efetivamente tais alterações quase sempre são inespecíficas, comuns a um grande número de doenças, impossibilitando pela análise do hemograma identificar especificamente que se trata desta ou daquela doença. Para uma correta

interpretação é importante de início, que se conheçam os valores hemantimétricos normais, seus desvios fisiológicos e individuais, além da função de cada um dos constituintes do sangue periférico (MOURA et al., 1994).

O glóbulo vermelho (hemácea) por meio de seu principal componente, a hemoglobina, têm como função vital transportar oxigênio para os tecidos sendo que sua diminuição ou deficiência se traduz como anemia. Habitualmente, a série vermelha é avaliada por três dados; o número de glóbulos vermelhos por mm^3 de sangue, a taxa de hemoglobina expressa em gramas por 100 ml de sangue e o volume globular chamado de hematócrito, que é o volume ocupado pelos glóbulos vermelhos em 100 ml de sangue total (VERRASTRO et al., 1998).

Para se caracterizar um indivíduo como portador de algum tipo de anemia é conveniente que se conheça o tamanho do eritrócito e a quantidade de hemoglobina contida em cada um, daí esta será classificada com base na morfologia e tamanho do eritrócito, pela quantidade de hemoglobina contida no mesmo e também pelo número de hemáceas circulantes.

É importante ressaltar que existem inúmeros fatores responsáveis pelo surgimento de algum tipo de anemia, como por exemplo deficiência de ferro no organismo; dependendo do tipo da anemia, a hemácea é produzida com tamanho e forma variadas (anisocitose e poiquilocitose respectivamente) (MOURA et al., 1994).

Os leucócitos (série branca) estão relacionados com diversas funções de reparação do organismo, apresentam importante papel na remoção de antígenos invasores, bem como na produção de anticorpos. Pelo fenômeno da fagocitose os neutrófilos englobam bactérias e partículas pequenas, enquanto os monócitos (macrófagos) apresentam capacidade de englobar não só bactérias, mas protozoários, grandes partículas, glóbulos vermelhos e restos celulares. Neste processo os macrófagos emitem pseudópodos citoplasmáticos, envolvendo a partícula em questão como um todo, originando assim o fagossomo.

O primeiro leucócito a aparecer no local de uma inflamação é o neutrófilo, simultaneamente a este aparecimento é detectado no sangue periférico um aumento

destes elementos celulares, traduzido por leucocitose; ao contrário, existem casos de infecções como rubéola, gripe, febre tifóide, malária e outras que estão associadas à neutropenia (MOURA et al., 1994).

As plaquetas constituem elementos anucleados oriundos da fragmentação citoplasmática do megacariócito (precursor de plaquetas), que também estão relacionadas com a hemostasia; processo pelo qual o organismo é capaz de estancar um sangramento ao mesmo tempo que mantém o sangue fluído dentro do compartimento vascular (MOURA et al., 1994). Após a ruptura de um vaso, as plaquetas migram para o local da lesão e aderem ao mesmo; de modo concomitante está ocorrendo uma série de reações que culminam com a liberação de substâncias ativas, originando assim um tampão plaquetário de caráter irreversível capaz de bloquear a hemorragia de modo temporário.

ROSENFELD et al. (1960) & KELEN et al. (1960) verificaram que as peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* causavam hemólise “*in vitro*” em hemáceas animais e humanas. AZEVEDO-MARQUES et al. (1990) elucidou a cor extremamente avermelhada da urina de pacientes picados por serpentes do gênero *Crotalus*, cujo pensamento inicial postulado era que havia excreção de hemoglobina, e não de mioglobina como realmente acontece. Segundo os mesmos autores o diagnóstico laboratorial destes pacientes relata altos níveis de enzimas creatina quinase, desidrogenase láctica e aspartato aminotransferase. Estes efeitos podem ocorrer devido à presença das miotoxinas contidas na peçonha.

COSTA et al. (1989), estudaram o hemograma de ratos Wistar inoculados com peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* e observaram leucopenia 30 minutos após a inoculação da peçonha, seguida de uma intensa leucocitose com predomínio de neutrófilos. Os mesmos autores concluíram que a leucopenia observada inicialmente, deve ter ocorrido por efeito da peçonha no organismo do animal, e a leucocitose por reação do próprio organismo.

AZEVEDO-MARQUES et al. (1990), em uma recente visão sobre as características clínicas e laboratoriais do envenenamento, descrevem que o

hemograma no acidente crotálico apresenta leucocitose acompanhada de neutrofilia com desvio à esquerda (presença de bastonetes).

Estas observações permitem especular, com base em alterações clínicas (presença de febre), laboratoriais (leucocitose, neutrofilia, monocitose e etc) e na literatura imunológica, que tudo se passaria como se as peçonhas atuassem no organismo de maneira semelhante a um trauma agudo (BARRAVIERA, 1994).

Peçonhas de serpentes do gênero *Echis* apresentam um grande número de componentes que atuam sobre o sistema hemostático: ativando a protrombina, inibindo a agregação plaquetária e outros. Clinicamente, os indivíduos picados por estas serpentes têm seu tempo de coagulação do sangue muito alterado, e uma queda de hemoglobina acentuada observada ao longo do tratamento (14.3 g/dl para 6.9 g/dl após o oitavo dia do acidente) (GILLISSEN et al., 1994).

Atualmente, a soroterapia tem sido o caminho mais usado para combater o ofidismo, entretanto a eficiência desta terapia está relacionada, além de outros fatores, diretamente com o tempo decorrido entre o acidente, o início do tratamento e a quantidade de peçonha inoculada (FRANÇA, 1998). Em alguns casos onde estes fatores de riscos foram excedidos, os efeitos locais não serão mais revertidos pela soroterapia. A falta ou escassez de anticorpos específicos para toxinas de ação local, ou ainda, a rápida ação destas representam os principais motivos pelos quais nem sempre se é capaz de reverter o quadro clínico do paciente (OWNBY et al., 1986; GUTIÉRREZ et al., 1987).

Para uma produção eficiente de anticorpos é necessário que o antígeno em questão (peçonha) seja colocado em contato direto com um adjuvante. Os adjuvantes são caracterizados por atenuarem a toxicidade do antígeno, mantendo-o mais tempo no organismo. Podemos citar os adjuvantes oriundos de sais de alumínio e adjuvante completo de Freund que consiste do *Mycobacterium tuberculosis* inativado, emulsificado em uma suspensão oleosa.

Os adjuvantes de um modo geral potencializam sobremaneira a produção de anticorpos, concentrando os antígenos em locais adequados ou induzindo a produção de citocinas (regulam a função dos linfócitos). Esses antígenos aí

capturados são liberados gradativamente, originando assim a resposta imunológica (ROITT et al., 1999).

Historicamente, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudos de uma área denominada farmacognosia, termo idealizado por Seydler, em 1815, para designar um dos ramos da farmacologia que se ocupa dos estudos voltados para examinar e caracterizar drogas ou bases medicamentosas de origem natural (DI STASI, 1996). Dentro desta área estão incluídos os aspectos referentes aos estudos de plantas medicinais.

Na tentativa de encontrar outra maneira que não anticorpos, para neutralizar a ação das peçonhas, muitos pesquisadores estão investindo intensamente na busca dos potenciais de nossa flora medicinal e que tem sido usada pela população leiga (etnofarmacologia).

A composição química das espécies vegetais, especialmente de plantas encontradas nas florestas tropicais, ainda está longe de ser descrita em sua totalidade, pois grande parte de seus constituintes ainda não foram isolados. Os componentes químicos encontrados em vegetais são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas que compõem o metabolismo geral das plantas. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência de espécies vegetais, tais como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, e seus polímeros derivados fazem parte do metabolismo primário da planta, enquanto os compostos sintetizados por outras vias e que não são úteis para a sobrevivência da planta, são designados como compostos secundários que fazem parte do metabolismo secundário da planta (DI STASI, 1996).

Geralmente, os princípios ativos extraídos de plantas são produtos metabólicos secundários utilizados para sua nutrição, desenvolvimento ou em sua economia direta; estas substâncias são produzidas pela planta para melhorar suas condições de sobrevivência. Assim, solos pobres, alterações climáticas frequentes, predadores, dentre outros, fazem com que estas substâncias sejam produzidas pelo vegetal (BRITO, 1996). Suas concentrações podem variar de acordo com a época

do ano e condições do solo, chegando a apresentar variações dentro da mesma espécie.

Grande parte dos medicamentos sintéticos apresentam substâncias derivadas de plantas; como anti maláricos (quininos), anti amebianos (ipeca), analgésicos (morfina), e anticoagulantes (dicumarol).

Além disso, estes metabólitos apresentam estrutura química complexa e a maioria deles não tem uma função conhecida no organismo onde se encontra (GEISSMAN & GROUT, 1969). Dentre esse metabólitos já encontrados em plantas podemos citar os taninos, os alcalóides, os terpenos, as lignanas e os flavanóides.

Taninos, são substâncias fenólicas solúveis em água e com peso molecular entre 500 e 3.000, são muito tóxicos, necessitando cuidados especiais quanto à dosagem. São bastante usados no controle biológico de insetos, fungos, bactérias, e também na indústria de processamento do couro. Na farmacologia, são utilizados como antiinflamatórios, previnem placa dentária e são antidiarréicos (MELO & CORTEZ, 1997).

As lignanas também são bastante usadas no combate a tumores, bactérias e fungos (MELO & CORTEZ, 1997), enquanto os alcalóides são encontrados em menor quantidade, mas apresentam propriedades farmacológicas de uso terapêutico importantíssimo como morfina, cocaína, nicotina, quinina, etc. São drogas com ação sobre o Sistema Nervoso Central, mas se usadas em doses corretas não apresentam efeitos colaterais. A morfina, por exemplo, é utilizada como analgésico em pacientes com câncer terminal.

Terpenos são substâncias voláteis que exalam sua fragrância podendo ser obtidos por destilação a partir do caule e folhas de vegetal.

Os flavanóides compreendem uma série de compostos secundários que ocorrem exclusivamente em plantas superiores, sendo responsáveis na planta, pela coloração das flores e denominados pigmentos.

O extrato alcoólico obtido da planta *Eclipta prostrata* (Asteraceae), conhecida como erva botão, neutralizou 4 DL₅₀ do peçonha de *Crotalus durissus terrificus* quando este foi incubado por 30 minutos com o extrato antes de sua aplicação em

camundongos. Desta planta foram isolados três constituintes: wedelolactona, stigmasterol e sitosterol que também apresentaram proteção contra doses letais desta peçonha (MARTZ, 1992). MELO et al. (1994) também testaram este mesmo extrato e seus constituintes em venenos crotálicos e observaram inibição das atividades miotóxica e hemorrágica.

PACHECO et al. (1995) verificaram a eficiência terapêutica do extrato aquoso obtido de sementes secas e frescas de quiabo (*Hibiscus esculentus*) na inibição de duas DL₅₀ da peçonha de *Bothrops jararaca*. O extrato foi obtido por maceração a frio ou a quente e ingerido pelos animais experimentais uma ou duas horas antes da injeção da peçonha. A dosagem foi de 2 g/kg de animal (sementes frescas) e 1 g/kg de animal (sementes secas).

CHERDCHU et al. (1978) & FERREIRA et al. (1992) verificaram a eficácia do açafrão (*Curcuma longa*) sobre uma neurotoxina extraída da peçonha de *Naja naja siamesis*, e também uma hemorragina da peçonha de *Bothrops jararaca* foi inibida frente ao mesmo extrato. A dose letal da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* também foi inibida em 66 % quando se misturou 12,5µg da peçonha com 700 µg de ar-tumerone que é uma fração isolada do açafrão.

PEREIRA et al. (1992) verificaram a inibição do edema de pata provocado pela peçonha de *Bothrops jararaca* utilizando extrato aquoso das folhas de manacá (*Brunfelsia uniflora*) via oral, chegando a uma inibição de 72 % do edema.

ALAM et al. (1998) isolaram e purificaram, por cromatografia de coluna em sílica gel, um ácido orgânico proveniente do extrato de raízes da planta indiana Sarsaparilla (*Hemidesmus indicus*) que recebeu o nome de Herbal. As análises espectrais confirmaram a presença de um anel benzênico, grupamentos metoxi e hidroxila. Este composto inibiu significativamente a letalidade, atividades hemorrágica, coagulante e anticoagulante de peçonhas de serpentes.

Posteriormente, o Herbal exibiu seu efeito adjuvante diminuindo a toxicidade de algumas peçonhas e potencializando a produção de anticorpos (ALAM et al., 1998).

Dentre várias plantas com poderes antiofídicos citadas pela crença popular, encontramos o gênero *Casearia*, mais especificamente a *Casearia sylvestris*. RUPPELT et al. (1991), observaram que este gênero apresenta potencial antiofídico e antiinflamatório.

Posteriormente, BORGES et. al. (2000) trabalhando com *Casearia sylvestris* ratificou o potencial antiofídico quanto à inibição de peçonhas brutas e miotoxinas de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu*, respectivamente. Foram realizados experimentos de atividade fosfolipásica (PLA₂), letalidade e formação de edema. Os testes de inibição sempre foram realizados com peçonhas brutas e/ou miotoxinas mais extrato incubados por 30 à 37°C, em proporções que variaram de 1/1 até 1/10; peçonha/extrato.

Da *Casearia mariquitensis*, KASHIWABUCHI (1999) obteve inibição das atividades PLA₂ e coagulante sobre o plasma bovino das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* na ordem de 70% quando extrato mais peçonha eram previamente incubados por 1 hora à 37°C, na proporção de 1/5. Com relação à atividade coagulante a inibição chegou até 100%. Com base nisto, estudos mais aprofundados sobre esta capacidade de neutralizar as ações das peçonhas poderão futuramente estarem favorecendo o surgimento de uma nova droga com ação antiofídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M. I.; AUDDY, B.; GOMES, A. (1994). Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the indian medicinal plant Sarsaparilla (*hemidesmus indicus* R. Br.). **Toxicon** **32**, 1551-1557.
- ALAM, M. I.; GOMES, A. (1998). Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (Herbal) compound 2-hydroxy-4-benzoic isolated from the root extract of the indian medicinal plant "Sarsaparila" (*hemidesmus indicus* R. Br.). **Toxicon** **36**, 1423-1431.
- ANGULO, Y.; CHAVES, E.; ALAPE, A. ; RUCAVADO, A. GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. (1997). Isolation and characterization of a myotoxic Phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schegellii* from Costa Rica. **Arch. Biochem. Biophys.** **399**, 260-266.
- ANGULO, Y.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. (1997). Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. **Toxicon** **36**, 81-90.
- ARAÚJO, A. L.; RADVANY, F.; BOM, C. (1994). Purification of na acid phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom: Molecular enzymatic properties. **Toxicon** **32**, 1069-1081.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. (1996). Phospholipase A₂ - A structural review. **Toxicon** **34**, 827-841.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; TULINSKY, A. (1995). Crystal structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. **Acta Crystallographica** **51** 311-307.

ASSAKURA, M. T. ; REICHL, A. P. ; MANDELBAUM, F. R. (1986). Comparison 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.; (1985). Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon** 23, 691-706.

ASSAKURA, M. T. FURTADO, M. F. MANDELBAUM, F. R. (1992). Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*) **Comp. Biochem. Physiol.** 102, 727-732.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; AMARAL, C. F. S.; HERING, S. E. (1990). Rattlesnake bites. Clinical features and complementary tests. **Mem. Inst. Butantan** 52, 27-30.

BARRAVIERA, B.(1994). Venenos Animais: Uma visão integrada 1^a ed. RJ. Ed. De Publicações Científicas.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmac. Ther.** 62, 325-372.

BONILA, 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. (1995). **Isolamento e produção de anticorpos policlonais das miotoxinas da peçonha de *Bothrops jararacussu***. Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia. 71p..

BORGES, M. H.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1998). Ação anti-peçonha do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*. **Biotec. Ciên. Desenv.** 4, 28-30.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacouetiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol.** 127, 21-30.

BORKOW, G.; GUTÉRREZ, J.M.;OVADIA, M. (1993). Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon** 31, 1137-1150.

BOSCH, H. (1980). Intracelular Phospholipase A₂. **Biochim. Biophys. Acta** 604, 191-246.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (1998). Fundação Nacional de saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Brasilia** 131p. .

BRITES, V. L. C.; BAUAB, F. A. (1989) Fauna ofidiana do município de Uberlândia-MG-Brasil. Ocorrência na área urbana. **R. Cient. Ci. Biomd. Universidade Federal de Uberlândia** 4, 3-7.

BRITO, A. R. M. S. (1996). Plantas medicinais: Arte e Ciência. **Farmacologia de plantas medicinais 1ª ed.**, 87-97.

BRITO, A. S. (1994). **Manual de ensaios toxicológicos "in vivo"**. Campinas: editora Unicamp 121p.

CALIXTO, J. B.; TREBIEN, H. A. (1989) Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions** **26**, 292-300.

CAMPBELL, D. H.; GARVEY, J. S. CREMER, N. E.; SUSSDORF, D. H. (1970) In: **Methods in immunology**, **260** (DENJAMIN, W. A. ED.) 2 ED., Inc.Publisher.

CHERDCHU, E.; SRIDUKAVAT, K.; RATANABANANGKON, K. (1978). Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae). **J. Med. Ass. Thailand** **61**, 544.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J. R.; CORRADO, A. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. (1998). An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. **Toxicon** **36**, 1323-1332.

CONDREA, E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. (1981). Lack correlation between the anticoagulant activity and phospholipase hydrolysis by snake venom phospholipase A₂. **Thromb. Hemostasis** **45**, 82-89.

- COSTA, P.I.; GARCIA DE LIMA, E.; LAURE, C. J. (1989). Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.** **39**, 359-373.
- DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; SAMPEDRO, A. M.; PEREIRA, J. E. S. (1992). Dosagem biológica do antiveneno botropico. **Mem. Inst. Butantan** **54**, 21-30.
- DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C. (1997) . A new phospholipase A₂ isofom isolated from *Bothrops neuwiedi* (Iarará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon** **35**, 1205-1215.
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M. (1968). Purification and properties of phospholipase A₂ from pocine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta** **159**, 103-117.
- DI STASI, L. C. (1996). Plantas medicinais: Arte e Ciência. 1^a ed. 230p..
- ESTRADA, R.; ROBLES, A.; ALVARADO, J.; ROJAS, E.; GONZÁLES, N.; SEGURA, E.; GUTIÉRREZ, J. M. (1991). Development of antibody response and clinical and hematological alterations in horses immunized with snake venoms for product of antivenom in Costa Rica. **Mem. Inst. Butantan** **53**, 181-190.
- FARSKY, S. H. P.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURRY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. (1997). Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon** **35**, 185-193.
- FERREIRA, M. L.; MOURA DA SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L.; MOTA, I. (1992). Toxic activities of venoms from nine

Bothrops species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon** **30**, 1603-1608.

FRANÇA, F. O. S., FAN, H. W. (1992). In: Plantas venenosas e animais peçonhentos 2^a ed., 110-118.

FRANÇA, F. O. S.; (1998). Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **31**, 187-190.

FURTADO, M. F. D.; COLLETO, G. M. D. D.; SILVA, W. D. (1991). Controle de qualidade dos venenos animais e dos componentes antivenenos. **Mem. Inst. Butantan** **53**, 149-159.

GEISSMAN, T.; CROUT, D. H. G. (1969). General aspects of alkaloid biosynthesis. Alkaloides derived from ornithine, lysine and nicotinic acid. In: **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism** **1**, 428-463.

GILLISSEN, A.; DAVID, R.; THEAKSTON, G.; BARTH, J.; MAY, B.; KRIEG, M.; WARRELL, A. (1994). Neurotoxicity, haemostatic disturbances and haemolytic anaemia after a bite by Tunisian saw-sacled or carpet viper (*Echis "Pyramidum"* complex): Failure of antivenom treatment. **Toxicon** **32**, 937-944.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. (1995). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** **33**, 1405-1474.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. (1986). Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the *Bothrops nummifer*. **Toxicon** 24, 885-894.

GUTIÉRREZ, J. M.; ARCE, V.; BRENES, F.; CHAVES, F. (1990). Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom the snake *Bothrops asper*. **Exp. Molec. Path.** 52, 25-36.

HILL, R. E.; MACKESSY, S. P. (2000). Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. **Toxicon** 38, 1663-1687.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1987). Fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu*: caracterização química parcial de componentes ativos e estudo dos efeitos farmacológicos e anatomopatológico da Bothropstoxina. **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** 132 p. (tese de doutorado).

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** 26, 615-627.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. (1964). A microbiuret method for stimating proteins. **Anal. Biochem.** 9, 401.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. (1979). Enzymes in snake venoms. In: **Handbook of Exper. Pharmacol.** 52, 61-158.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G. (1986). Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinase. **Toxicon** 34, 627-642.

KASHIWABUSHI, F. K. (1999). **Estudo da neutralização das fosfolipase A₂ e coagulante das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizando o extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae)**. Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, 31p..

KELEN, E. M. A; ROSENFELD, G.; NUDEL, F. (1960). Hemolytic activity of animals venoms: Variation in relation to eritrocyte species. **Mem. Inst. Butantan** 30, 133-142.

KINI, R. M., EVANS, H. J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon** 27, 613-635.

KINI, R. M., EVANS, H. J. (1992). Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (desintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon** 30, 265.

KLEMMER, K. (1963). Liste der rezenten Giftschlangen. Elapidae, Hydrophidae, Viperidae and Crotalidae. In: Die Giftschlangen der Erde. Wirkung and Antigenität der Gifte. Therapie von Giftschlangenbissen. **Berlin: Berlingwerk-Mitteilungen** 255p..

KOMORI, Y.; HAGIHARA, S.; TU, A.T.(1985). Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox* (Western diamondback rattlesnake) venom. **Biochim. Biophys. Acta** 829, 127-130.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. (1960). Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. **Jap. J. Med. Sci. Biol.** 13, 43-51.

LEITE, C. V.S; NARESE, L. E.; ARANTES, H. L.; LOPES, A. F. THOMAZINI-SANTOS, I. A. GIANNINI, M. J. S.; MERCADANTE, M. C.; BARRAVIERA, B.; KOBAYASI, S. (2000). An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. **J. Venom Anim. Toxins** 6, 130-141.

LOBO DE ARAÚJO, A. L.; KAMIGUTI, A.; BON, C. (2001). Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon** 39, 371-375.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** 27, 725-733.

LOMONTE, B.; KAHAN, L. (1988). Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. **Toxicon** 26, 675-689.

MAHIR, M. S.; HYND, J.; W.; FLUTE, P. T.; DORMANDY, J. A. (1987). Effects of defibrinogenation on the early potency rate do experimental small calibre arterial grafts. **Br. J. Surg.** 749, 508-510.

MANDELBAUM, F. R. (1990). Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan 52**, 35-36.

MANDELBAUM, F. R. ;ASSAKURA, M. T.; REICHL, A . P. (1984). Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon 22**, 193-196.

MARANGONE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J.; 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. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon 36**, 1749-1800.

MARSH, N. (1994). Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan 52**, 35-40.

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

MATRISIAN, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays 14**, 455-463.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y., TITANI, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta 1477**, 146-156.

MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, S. (1994). Inhibition of the myotoxic and haemorrhagic activity of crotalidae

venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** 32, 595-603.

MELO, J. C. P.; 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.**

MOURA, R. A.; WADA, S. C.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. (1994). Técnicas de laboratório. 3^a ed., 551p..

NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; OVADIA, M.; DUMOND, D. B. (1997) Inhibitory properties of the antithroptic complex from the South American Opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon** 35, 849-863.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin form the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys** 231, 309-311.

NISHIOKA, S. A.; JORGE, M. T.; SILVEIRA, P.V. P.; RIBEIRO, L. A. (2000). South american rattlesnake bite and soft tissue infection: report of a case. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 33, 186-190.

ODELL, G. V.; FERRY, P. C.; VICK, L. M.; FENTON, A. W.; DECKER, L. S.; COWELL, R. L.; OWNBY, C.L. GUTIÉRREZ, J. M. (1998). Citrate inhibiting of snake venom proteases. **Toxicon** 36, 1801-1806.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1999). Purification and characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (caissaca). **Biochem. and molec. Biol. International** 47, 1069-1077.

- OUYANG, C., YANG, F. Y. (1974). Purification and properties of the thrombin-like enzyme from *Trimeresurus gramineus* venom. **Biochem. Biophys. Acta.** **351**, 354.
- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R. (1986). Ability of polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize local myonecrosis induced by *Crotulus atrox* venom. **Toxicon** **24**, 201-203.
- OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. (2000). Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon** **38**, 1087-1100.
- PACHECO, S.; SILVA, N. F.; FRANCO, P.F. (1995) Atividade antibotrópica do chá de quiabo (*Hibiscus esculentus*). **Rev. Bras. Farm.** **76**, 61-62.
- PAULINO, F. E. C., MAGALHÃES, M. R.; SILVA, N. J. (1991). Atualização da distribuição geográfica de serpentes do grupo Bothrops nos estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal. (Resumo do XVIII Congresso Brasileiro de Zoologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia).
- 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.; 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.

PÉREZ, O. C. A.; KOSCINCZUK, P.; TEILBLER, P.; NEGRETE, M. S.; RUIZ, R.; MURANAK, S.; BOGARIN, G. (1998). Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almofadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. **Toxicon** 36, 1165-1172.

PETERS, J.; OREJAS-MIRANDAS, B. (1970). Catalogue of the neotropical Squamata. Part 1. Snakes. **V. S. Natl. Mus. Bul.** 197, 1.

PETRETSKI, J. H.; HANASHIRO, M. M.; RODRIGUES, F. R.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L. T.; KIPNIS, T. L. (2000). Edema induction by the desintegrin-like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagins. **Biochem. Biophys. Resear. Commun.** 276, 29-34.

PUERTO, G., SALOMÃO, M. G., LAPORTA-FERREIRA, I. L. (1996). The quantity of venom produced and injected by juvenile and adult *Bothrops jararaca* (Viperidae, crotalinae). **The snake, Yabuzuka Honmachi** 27, 140-144.

QUIROGA, M.; AVILA-AGUERO, M. L.; FIANGEZICHT, I. (2000). Abscess secondary to facial snakebite. **J. Venom Anim. Toxins** 6 200-207.

RIBEIRO, L. A. ; JORGE, M. T. (1997). Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 30, 01-10.

RIBEIRO, L. A. (1990). Epidemiology of ophidic accidents. **Mem. Inst. Butantan** 52, 15-16.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. (1989). Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo** 44, 143-145.

RIBEIRO, L. A.; PIRES DE CAMPOS, V. A. F.; ALBUQUERQUE, M. J.; TAKAOKA, N. Y. (1993). Acidente ofídico no Estado de São Paulo. **Rev. Ass. Med. Brasil** 39, 7-10.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. (2000). Structural and functional characterization of neuwiedase, a non hemorrhagic fibri(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** 381, 213-224.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (1998). Imunologia. **Imunidade às bactérias e aos fungos** 4, 1-13.

ROSENFELD, G BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous and their venoms** 2, 345-403.

ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A.; NUDEL, F. (1960). Hemolytic activity of animal venom: Classification in diferent types and activities. **Mem. Inst. Butantan** 30, 103-116.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. (1990). Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. Atividades analgésica e antiinflamatória. **Rev. Bras. Farm.** 71, 54-56.

SABORÍO, P.; GONZÁLES, M.; CAMBRONERO, M. (1998). Accidente ofídico en niños en Costa Rica: epidemiología y detección de factores de riesgo en el desarrollo de absceso y necrosis. **Toxicon** 36, 359-366.

SANO-MARTINS, I. S. (1990). Hematological disturbances induced by *Bothrops* venom. **Mem. Inst. Butantan** 52, 39-40.

SCHMIDT, M. E.; ABDELKBAKI, Y. Z.; TU, A. T. (1976). Nephrotoxic action of rattlesnake and Sea snake venoms: an electron-microscopic study. **J. Path** 118, 49-53.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science** 250, 1541-1546.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; SOUZA, G. E. P.; 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.

SIIGUR, J.; TÕNISMAGI, K. TU, A. T.; SIIGUR, E. (1996). Cross reactivities of polyclonal antibodies against lebetese, fibrinolytic enzyme of of levantine viper (*Vipera lebetina*) venom. **Toxicon** 34, 608-613.

SMOLKA, M. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. (1998). Purification and partial characterization of a "thrombin-like" enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** 36, 1059-1063.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. (2000). Structural and functional characterization of Bn SP-7, a Lys 49 myotoxic Phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis*. **Arch. Biochem. Biophys.** **378**, 201-209.

SOARES, A.M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. (1998). A rapid procedure for the isolation of the Lys₄₉ myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon** **36**, 503-514.

SOUSA, J. R. F.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R.B. (2001) Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon** **39**, 787-792.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. (1976). The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: **Methods in Enzymology** **45**, 214.

TUN-PE.; LWIN, N. N.; MYINT, A. A.; HTWE, K. K.; CHO, K. A. (1995). Biochemical and biological properties of the venom from russell's viper (*Daboia russelli siamensis*) of varying ages. **Toxicon** **33**, 817-821.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; NETO, S. W. (1998). Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. **1ª ed.**, 303p..

CAPÍTULO I:

Ensaio de inibição dos efeitos biológicos causados pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

RESUMO:

Peçonhas de serpentes são uma complexa mistura de proteínas tóxicas com capacidade de provocar na vítima efeitos locais como edema, necrose, hemorragias e efeitos sistêmicos caracterizados principalmente por distúrbios no equilíbrio hemostático. O objetivo deste trabalho foi verificar a inibição de alguns efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (PB) pelo extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* (EV) (Flacourtiaceae). Folhas do vegetal foram coletadas nos meses de março e setembro, lavadas, trituradas com água desionizada e filtrada. Em seguida a parte líquida foi centrifugada por 20 minutos, o sobrenadante retirado e liofilizado o extrato obtido foi armazenado a -20°C . A atividade fosfolipásica (PLA_2) ensaiada com gema de ovo como substrato foi testada com EV dos meses de março e setembro combinados com peçonha na proporção de 1/10 e imediatamente analisados ou incubados por uma hora. Em todas as condições experimentais a porcentagem de inibição foi de aproximadamente 40%. Todos os experimentos seguintes foram realizados com extrato de março, onde peçonha e extrato combinados foram imediatamente ensaiados. A inibição da atividade coagulante foi estatisticamente significativa (teste t) somente quando realizada na proporção de 1/10 (PB/EV). A inibição da atividade hemorrágica também foi visível, pela diminuição do halo hemorrágico, quando peçonha e extrato foram combinados na proporção de 1/3. A coagulabilidade do sangue dos animais tratados com peçonha mais extrato (grupo teste) e apenas com peçonha (controle positivo) foi bastante afetada em relação à dos animais que receberam salina ou extrato (controle negativo). Estatisticamente os resultados obtidos para o grupo teste, controles positivo e negativo são diferentes ($p < 0,05$). Quando o fibrinogênio plasmático destes animais cujo tempo de coagulação estava alterado foi dosado, observamos diminuição em sua concentração; mas quando combinamos peçonha e extrato em diferentes proporções (1/2,5, 1/5,0 e 1/10) essa concentração aumentou de

acordo com esta relação. Na atividade fibrinogenolítica; houve hidrólise total das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio incubado com peçonha. Quando peçonha mais extrato foram misturados nas proporções de (1/2,5, 1/5,0 e 1/10), houve diminuição da hidrólise das cadeias do fibrinogênio. A produção de anticorpos na presença ou ausência de extrato foi a mesma quando analisada por imunodifusão. O extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* foi capaz de inibir os efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, sendo que durante o processo de imunização esta peçonha foi parcialmente inativada sem perder a capacidade de induzir a produção eficiente de anticorpos.

ABSTRACT:

Snake venoms are a complex mixture of toxic proteins with capacity to cause in a victim local effects such as oedema, necrosis, haemorrhage and systemic effects characterised mainly by disturbances in hemostatic balance. The purpose of this work was to verify the inhibition of some toxic effects of the venom from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (PB) by the vegetal extract from *Casearia mariquitensis* (EV) (Flacourtiaceae). Leaves from the vegetal were collected in the months of march and september, washed, crushed with water and filtered. After that the liquid part was centrifuged for 20 minutes, the floating was removed, lyophilized and the extract obtained was stored at -20°C . The essays of inhibition were made in different proportions of PB/EV (m/m). The phospholipase activity (PLA₂) essayed with the yolk of eggs as a substrate was tested with EV from months of march and september combined with the venom in the proportion of 1/10 and immediately analysed or incubated for an hour. In every experimental condition the percentage of inhibition was approximately 40%. All the following experiments were made with the extract from march where venom and extract combined were immediately essayed. The inhibition of the coagulating activity was statistically important (test t) only when made in the proportion of 1/10 (PB/EV). The inhibition of hemorrhagic activity was also visible by the decrease of the hemorrhagic halo, when venom and extract were combined in the proportion of 1/3. The blood coagulation from animals

ministered with venom and extract (group test) and only with venom (positive control) was very affected in relation to the animals which received salt/or extract (negative control). Statistically the results obtained for group test, positive and negative control are different ($p < 0,05$). When the fibrinogen plasmatic from these animals, whose time of coagulation time were altered, was dosed it was observed a decreased in its concentration; but when venom and extract were combined in different proportions (1/2,5, 1/5 and 1/10) this concentration increased according to this relation. In fibrinogenolytic activity, was break of chains $A\alpha$ and $B\beta$ of fibrinogen incubated with venom. When venom and extract were mixtured in proportions of (1/2,5, 1/5 and 1/10), was decrease in break of chains of fibrinogen. A production of antibody in presence or ausence of extract was the same w3hen analised for imunofifusion. The extract aqueous of *Casearia mariquitensis* was capable of inhibitor the effects toxics of venom of *Bothrops neuwiedi pauloensis* and during the process of imunization this venom was partiality inactivated without damage the capacity of the production efficiency of antibody.

1) INTRODUÇÃO

As peçonhas de serpentes são ricas em enzimas proteolíticas que atuam em uma grande variedade de substratos naturais como a caseína, colágeno, fibrinogênio, elastina e outros (IWANAGA & SUZUKI, 1979). Esta ação proteolítica pode desencadear um processo hemorrágico local ou sistêmico (PETRETSKI et al., 2000) pela degradação das proteínas da matriz extracelular, fazendo com que surjam poros na parede das células, por onde acontece o extravazamento do sangue (MANDELBAUM, 1990; MATRISIAM, 1992). Outras enzimas proteolíticas interferem diretamente em diferentes pontos da cascata de coagulação sanguínea, estas são serino-proteases e designadas como coagulantes. Na peçonhas das serpentes brasileiras destaca-se a ação “thrombin-like” (conversão do fibrinogênio em fibrina) (MARKLAND, 1998; SMOLKA et al., 1998), que apresentam atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica (SOUSA et al., 2001) levando à incoagulabilidade do sangue, devido ao consumo de todo o estoque de fibrinogênio plasmático. Ainda nesta mesma classe, temos as metaloproteases que não são hemorrágicas ou coagulantes, mas que agem sobre o fibrinogênio ou sobre a fibrina (MATSUI et al., 2000), levando também à incoagulabilidade do sangue. A ação tóxica das peçonhas de serpentes também está associada com um outro grupo de enzimas, as fosfolipases A_2 (PLA_2). Enzimas fosfolipases estão amplamente distribuídas na natureza (BOSCH, 1980) e hidrolisam especificamente a ligação acil na posição sn2 do fosfolípcido, liberando como produto final o ácido graxo, que pode ser o araquidônico e lisofosfatídeos (DANIELLE et al., 1997).

Após um acidente ofídico, vários efeitos locais provocados pelas fosfolipases A_2 como dor, edema, necrose e perda de tecido muscular são manifestados na vítima (PÉREZ et al., 1998).

Neste trabalho, o extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* (limãozinho) foi usado como inibidor dos efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada).

2) OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos avaliar a capacidade que o extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* tem de inibir ou neutralizar os principais efeitos biológicos causados pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada).

3) MATERIAIS

3.1) Peçonha bruta:

A peçonha bruta da serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizada neste trabalho foi adquirida junto à Pentapharm do Brasil, dessecada a vácuo à temperatura ambiente e posteriormente estocada a - 20° C.

3.2) Folhas de *Casearia mariquitensis*:

As folhas de *Casearia mariquitensis* utilizadas foram coletadas às margens do Rio Araguari na região de Uberlândia-MG, onde a espécie se desenvolve de forma espontânea. Nestas condições a planta não recebe nenhum cuidado especial no que se refere ao suprimento de nutrientes. A coleta foi realizada pela tarde em período não chuvoso. A identificação taxonômica da planta foi feita pelo professor Glein Monteiro Araújo (Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia), utilizando-se o método clássico de observação dos seus caracteres morfológicos.

3.3) Animais:

Para os testes "in vivo" foram utilizados camundongos machos pesando 25-32 g, da raça Swiss, fornecidos pela Pentapharm do Brasil, e mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais com água, luz e alimento à vontade.

3.4) Reagentes:

Fibrinogênio bovino, β mercaptoetanol, Tris-HCl, glicerol, azul de bromofenol, glicina EDTA, acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, coomassie brilliant blue R-250, trizma, fucsina básica, persulfato de amônio e agarose, todos da Sigma Chem. Co. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.5) Equipamentos:

Centrifuga, banho-maria, liofilizador, balança, agitador magnético, espectrofotômetro, pHmetro, cuba para eletroforese e multiprocessador.

4) MÉTODOS

4.1) Preparação da amostra de peçonha.

As amostras de peçonha foram preparadas momentos antes do uso, evitando assim perdas de atividade. Aproximadamente 5 mg de peçonha bruta foram pesadas e dissolvidas em 250 μ l de NaCl 0,9%, centrifugados a 10.000 rpm por 7 minutos em centrífuga refrigerada eppendorf, e o sobrenadante separado. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, adicionando sempre o sobrenadante obtido à aquele primeiro.

4.2) Dosagem de proteínas (Itzhaki & Gill, 1964).

Para a quantificação das proteínas presentes nas amostras obtidas, soluções contendo 0.1 a 2.0 mg 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 um volume de 1.0 ml com água desionizada, aos quais se acrescentou 500 μ l de R₁ ou R₂, em seguida a leitura foi

realizada em espectrofotômetro (SPEKOL) a 310 nm contra um branco sem proteína. Os reagentes R₁ e R₂ são constituídos respectivamente por 0.21% de CuSO₄.5 H₂O dissolvido em NaOH 30.4%, enquanto R₂ é formado por uma solução de NaOH 30%.

4.3) Preparo dos extratos vegetais (BORGES, 1998).

As folhas foram lavadas e trituradas com H₂O desionizada em multiprocessador por 15 minutos, filtradas em filtro comum. O filtrado foi centrifugado à 30.000g por 20 minutos em centrífuga Himac CR₂₁, o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C. No momento do experimento o extrato era pesado e dissolvido em NaCl 0,9%.

4.4) Ensaio de inibição dos efeitos biológicos causados pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Todos os ensaios realizados neste item para se estudar a inibição da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (VB) pelo extrato vegetal aquoso (EV) de *Casearia mariquitensis*, seguiram o mesmo protocolo experimental onde cada atividade foi ensaiada contendo:

- 1) Somente com a peçonha (PB) – controle positivo.
- 2) Apenas com extrato vegetal (EV) – controle negativo.
- 3) Imediatamente após misturar PB mais EV em proporções pré-determinadas.

4.4.1) Atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) (DE HAAS et al., 1968).

Foram usadas três soluções estoque:

1) Uma suspensão contendo 1 gema de ovo homogeneizada com 50 ml de H₂O (solução estoque, que pode ser armazenada a 4°C por aproximadamente 3 dias).

2) Solução de desoxicolato de sódio a 0,03 M.

3) Solução de cloreto de cálcio 0,6 M

As soluções 2 e 3 podem ser armazenadas a 4°C por aproximadamente 2 meses. Antes de cada experimento era preparada uma solução de trabalho contendo 15 ml da solução 1, 10 ml da solução 2 e 1 ml da solução 3; em seguida o volume desta mistura era completado para 100 ml com H₂O desionizada e o pH aferido para 8,0 com NaOH 0,6 M.

Cada ensaio era realizado com 10 ml desta solução de trabalho, 10µg de peçonha bruta e/ou 100µg de extrato vegetal.

A liberação enzimática dos ácidos graxos pela fosfolipase A₂ a partir dos fosfolípidos do substrato (gema de ovo) foi medida por titulação potenciométrica dos ácidos graxos liberados com NaOH 0,1208N. O tempo de reação foi durante 3 minutos à temperatura ambiente.

4.4.2) Atividade coagulante (ASSAKURA et al., 1992).

Este teste foi realizado tendo com substrato 200 µl de plasma bovino citratado sob temperatura de 37°C, em presença de 20µg de peçonha dosadas. Imediatamente ao início da reação um cronômetro era disparado e o tempo em segundos para a formação de um coágulo de fibrina visível era cronometrado em segundos.

Dividimos os ensaios em 4 grupos:

- GI-controle positivo, contendo 20µg de PB.
- GII-controle negativo, contendo 200µg de EV.
- GIII-teste de inibição contendo 20µg de PB mais 60µg de EV, ou seja, PB:EV (1:3; m/m respectivamente).

- GIV-teste de inibição contendo 20µg de PB mais 200µg de EV, ou seja, PB:EV (1:10 m/m respectivamente).

4.4.3) Ensaios de incoagulabilidade sanguínea.

Para estes ensaios, animais pesando 32 g cada, foram divididos em 4 grupos (n=5). Amostras contendo 0,6 DL₅₀ (1 mg/kg) da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram aplicadas pela via intraperitoneal, e após 6 horas os animais eram anestesiados com éter de petróleo, o sangue coletado por punção cardíaca, na ausência de anticoagulante, depositado imediatamente em tubo de ensaio de vidro e o tempo gasto para formar coágulo de fibrina visível cronometrado.

Para os testes de inibição foram utilizados mistura de VB + EV na proporção de 1/10 (m/m) respectivamente. Cada grupo recebeu o seguinte tratamento:

- GI-amostras contendo 100µl de solução salina 0,9%.
- GII-amostras contendo 100µl de EV (10 mg/kg de animal).
- GIII-amostras contendo 100µl de PB+EV (1:10 mg/kg de animal respectivamente).
- GIV-amostras contendo 100µl de PB (1 mg/kg de animal).

4.4.4) Atividade hemorrágica (NIKAI et al., 1984).

Os animais pesando 30 g cada foram divididos em 3 grupos (n=3):

- GI-50µl de amostra contendo 25 µg de PB.
- GII-50µl de amostra contendo 75µg de EB.
- GIII-50µl de amostra contendo 75µg de PB +EV 1:3 (25µg de PB e 75µg de EV).

Os animais receberam injeções intradérmicas dorsais contendo 3 DMH da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e/ou extrato vegetal dissolvidos em NaCl 0.9%. Após 3 horas os animais previamente anestesiados com éter de petróleo, eram

escalpelados e a presença ou ausência de halos hemorrágicos foram observadas macroscopicamente.

4.4.5) Atividade fibrinogenolítica (OLIVEIRA, 1999).

Previamente foi preparada uma solução estoque contendo 1,5mg de fibrinogênio dissolvido em 1,0 ml de solução salina 0,9%; em 4 tubos de ensaio contendo 50 μ l cada desta solução, foram adicionados:

- 1) 5 μ g de PB (1parte).
- 2) Mistura contendo PB + EV (1:2,5, respectivamente).
- 3) Mistura contendo PB + EV (1:5,0, respectivamente).
- 4) Mistura contendo PB + EV (1:10,0, respectivamente).

A hidrólise enzimática ocorreu durante 2 horas de incubação à 37°C, após os quais a reação foi interrompida por adição de 25 μ l de solução STOP (Solução de Tris-HCl 0.06M, pH 6.8, glicerol a 10% e azul de bromofenol a 0.1%) e 5 μ l de β -mercaptoetanol.

Em seguida, as amostras contendo solução STOP e β -mercaptoetanol foram aquecidas a 100°C em banho-maria por 3 minutos sendo que 10 μ l de cada amostra foram utilizados para analisar a atividade fibrinogenolítica através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes, conforme descrito abaixo:

4.4.5.1) PAGE SDS.

Solução estoque	Gel de separação-14% (μ l)	Gel de empilhamento-5%(μ l)
Tris-HCl pH 8,8	1175	-
Tris-HCl pH 6,8	-	168
H ₂ O	2015	1990
Bis-Acrilamida	2920	435
EDTA	62,5	27
TEMED	7,5	2,5
PSA	37,5	18

O tampão dos eletrodos foi composto por Tris-HCl 0.1M pH 8.3, EDTA 7.8mM, glicina 0.77 M e SDS 0.3%. A corrida eletroforética foi feita à uma corrente constante de 20mA por aproximadamente uma hora e trinta minutos ou até o corante atingir a porção final da placa.

Posteriormente, o gel foi corado em Coomassie Brilliant 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 o gel foi colocado em solução fixadora formada por ácido acético a 7% e seco em papel celofane.

4.4.6) Dosagem de fibrinogênio plasmático.

Para estes ensaios camundongos machos com 30 g de peso foram reunidos em 6 grupos (n=5) como descrito abaixo:

- GA – Solução salina 0,9%.
- GB – Solução de extrato vegetal (10mg/kg de animal).
- GC – Solução de peçonha (1 mg/kg de animal).
- GD – Solução contendo PB + EV (1:2,5).

- GE – Solução contendo PB + EV (1:5,0).
- GF – Solução contendo PB + EV (1:10).

Todos os animais foram inoculados com 200µl de amostra via IP. Após 2 horas os animais eram anestesiados com éter de petróleo, o sangue coletado por punção cardíaca na presença de anticoagulante (EDTA), centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. Do plasma obtido de cada animal foi feito um “pool” e o fibrinogênio dosado por automação no aparelho Thrombolyzer Compact, do Laboratório de Análises Clínicas da FAEPU.

4.4.7) Produção de anticorpos.

4.4.7.1) Hiperimunização de camundongos.

Para este experimento 2 grupos de animais (n=05,30g de peso) foram utilizados. Os animais receberam 3 doses subcutâneas de uma mistura contendo peçonha e adjuvante completo de Freund (FCA) v/v ou extrato vegetal na proporção de 1/10 com intervalo de uma semana cada. Os grupos foram divididos conforme descrito abaixo:

- GI - 0,6DL₅₀ de PB (1mg/kg de animal) mais FCA v/v durante 3 semanas (1 dose por semana).
- GII - 0,6DL₅₀ de PB (1mg/kg de animal) mais FCA v/v mais extrato vegetal (10 mg/kg de animal) durante 3 semanas (1 dose por semana).

Nas três semanas seguintes, GI e GII receberam apenas PB e EV nas mesmas quantidades com dose de reforço.

Na sétima semana os animais de GI e GII foram sacrificados o sangue coletado na presença, de EDTA por punção cardíaca, centrifugado a 2500 rpm e o plasma obtido submetido a imunodifusão.

4.4.7.2) Imunodifusão.

Foram realizados testes de imunodifusão segundo a metodologia descrita por CAMPBELL et al. (1970). Lâminas de microscopia foram recobertas com uma película de ágar a 2,5% e em seguida, adicionou-se 3 ml de ágar a 1,25% formando uma camada de 2 a 4mm de espessura. Após a polimerização, o ágar foi perfurado na forma de roseta com auxílio de canudo plástico. Os anticorpos presentes no plasma dos camundongos imunizados foram diluídos com salina 0,9% até 1/32 e 10 μ l de cada título acrescentado nos poços laterais. Em seguida 10 μ l do antígeno (peçonha bruta) a uma concentração de 4 mg/ml foi colocado no poço central.

As lâminas foram colocadas em câmara úmida, a temperatura variando entre 4 a 8°C, durante 48 horas para o desenvolvimento dos arcos de precipitação. Após este período as lâminas foram lavadas com H₂O desionizada e coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,1%.

4.5) Análise estatística dos resultados.

Os resultados apresentados foram submetidos aos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov (K-S), Kruskal-Wallis (H) e testes de significância da diferença entre duas médias de amostragens pequenas (Teste t de Student).

5) RESULTADOS

5.1) Ensaios de inibição dos efeitos biológicos causados pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

5.1.1) Atividade fosfolipásica A_2 (PLA₂).

O efeito neutralizador da atividade PLA₂ da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi o primeiro ensaio a ser realizado com o extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*. Nestes ensaios iniciais, o efeito dos extratos (EV) obtidos foi analisado tanto imediatamente após ser misturado com a peçonha, como 1 hora depois de misturado com a peçonha.

Os resultados mostrados na figura 01 evidenciam que a inibição da atividade PLA₂ pelos extratos vegetais na proporção de 1/10, (m/m) foi praticamente a mesma; aproximadamente 44% e 39% para extrato de março e setembro respectivamente; e o critério de incubar por uma hora peçonha e extrato antes da inoculação não aumentou o percentual de inibição.

A partir daí, todos os demais experimentos de inibição foram realizados com extrato do mês de março misturados com a peçonha em proporções pré determinadas e imediatamente analisados.

A atividade PLA₂ específica para os grupos GIII, GIV, GV e GVI são estatisticamente iguais entre si, mas em relação ao grupo GI (controle positivo), observa-se uma diferença altamente significativa ($p < 0,01$).

Os valores médios de atividade PLA₂ \pm SD (desvios padrões) para controles positivo, negativo e testes foram respectivamente $82,3 \pm 0,99$ U/mg/min., $0,0 \pm 0,0$ U/mg/min., $46,6 \pm 0,22$ U/mg/min., $45,6 \pm 0,57$ U/mg/min., $50,8 \pm 0,66$ U/mg/min. e $49,4 \pm 0,72$ U/mg/min.

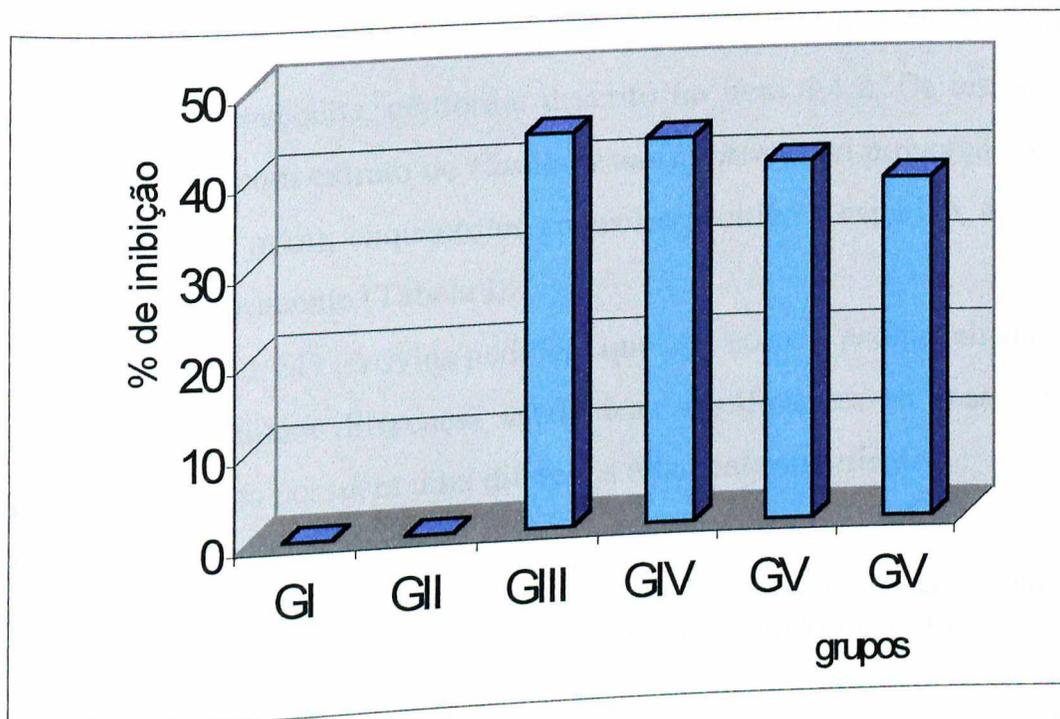


Fig. 01: Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

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 potenciométricamente com NaOH padrão 0.1208N, durante 3 minutos de reação à temperatura ambiente.

I – Controle positivo, peçonha bruta-PB (10 μ g).

II – Controle negativo, extrato vegetal-EV (100 μ g).

III – PB + EV preparado com folhas do mês de março (10 μ g de peçonha para 100 μ g de extrato).

IV – PB + EV preparado com folhas do mês de março e pré-incubados por uma hora (10 μ g de peçonha para 100 μ g de extrato).

V – PB + EV preparado com folhas do mês de setembro (10 μ g de peçonha para 100 μ g de extrato).

VI – PB + EV preparado com folhas do mês de setembro e pré-incubados por uma hora (10 μ g de peçonha para 100 μ g de extrato).

Os valores representam a média \pm SD (n=3).

5.1.2) Atividade coagulante.

A atividade coagulante foi realizada com 200µl de plasma bovino citratado à 37°C e 20µg de peçonha, conforme descrito no item 4.4.2. Os testes de inibição foram realizados com extrato de *Casearia mariquitensis* na proporção de 1:3 e 1:10 (peçonha/extrato; m/m), enquanto os controles positivo e negativo, apenas peçonha e extrato respectivamente (Tabela I).

As médias \pm SD (desvios padrões) que aparecerem acompanhadas com letras iguais não apresentam diferenças estatísticas significantes, ao passo que, aquelas com letras distintas possuem uma diferença altamente significativa.

Tab. I: Inibição da atividade coagulante sobre o plasma bovino da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pela presença do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

Ensaio	Tempo médio de coagulação (Segundos)
I	40 \pm 0.93 (a)
II	***
III	46 \pm 0.83 (a)
IV	57 \pm 0.60 (b)

I – controle positivo, (20µg de PB).

II – Controle negativo, (200µg de EV).

III – PB +EV sem incubar (20µg de PB para 60µg de EV) (1/3).

IV- PB + EV sem incubar (20µg de PB para 200µg de EV) (1/10).

*** Ausência de formação de coágulo em até 4 minutos de reação.

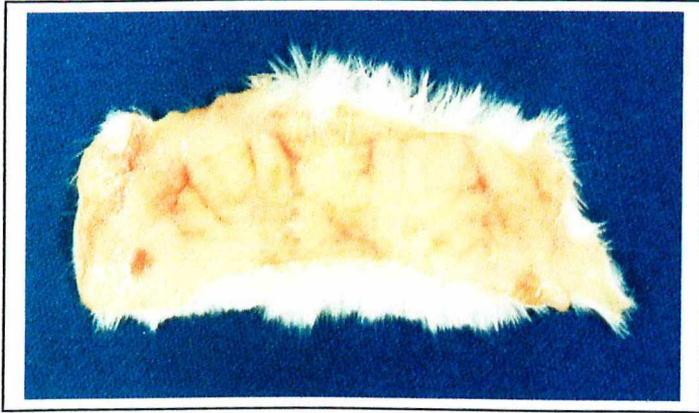
Os valores representam a média \pm SD (n=5).

5.1.3) Inibição da atividade hemorrágica.

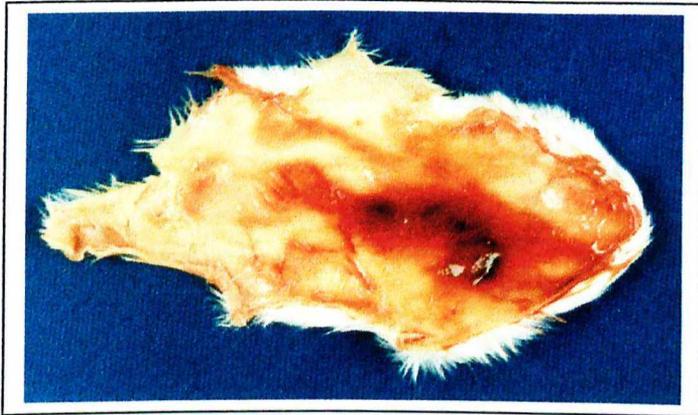
A figura 02 evidencia as lesões provocadas por injeções intradérmicas no dorso de camundongos pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A inibição da atividade foi realizada utilizando-se 3DMH da peçonha e extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* na proporção de 1:3 (m:m). A DMH (dose mínima hemorrágica) da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* é de 8.13µg. As doses aplicadas tiveram um volume final completado com salina para 50µl.

As amostras contendo extrato vegetal mais peçonha apresentaram uma razoável inibição da atividade hemorrágica, em comparação com aquela contendo apenas peçonha. Foram realizados controles negativos (extrato vegetal ressuspendido em salina) e como se pode observar o extrato sozinho não foi capaz de induzir nenhum tipo de hemorragia.

A



B



C

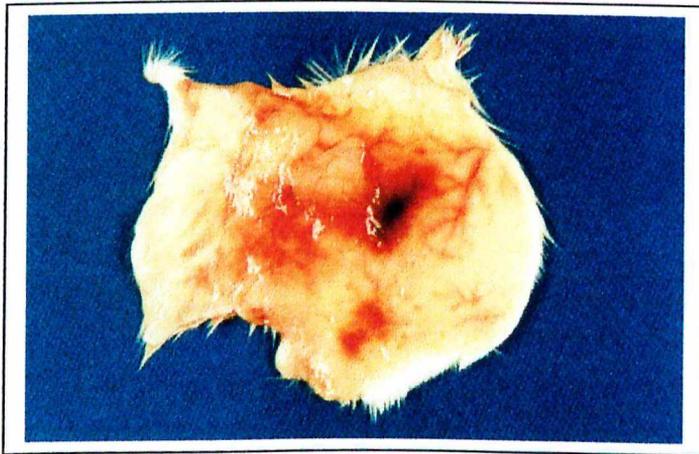


Fig. 02: Inibição da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pela presença de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

A) Controle positivo, 25 μ g de PB.

B) Controle negativo, 75 μ g de EV ressuscitado em 50 μ l de salina.

C) PB + EV 1:3 sem incubar (25 μ g de peçonha para 75 μ g de extrato vegetal).

5.1.4) Incoagulabilidade sanguínea.

A coagulabilidade do sangue dos animais inoculados com peçonha mais extrato (GIII) e apenas com peçonha (GIV) foi bastante afetada em relação à dos animais que receberam salina e/ou extrato de *Casearia mariquitensis* (GI e GII). Estes resultados estão mostrados na figura 03.

Os tempos médios \pm SD (desvios padrões) de coagulação do sangue (em segundos) dos grupos foram respectivamente 63 \pm 0,50, 65 \pm 0,12, 120 \pm 0,21, 148 \pm 0,40.

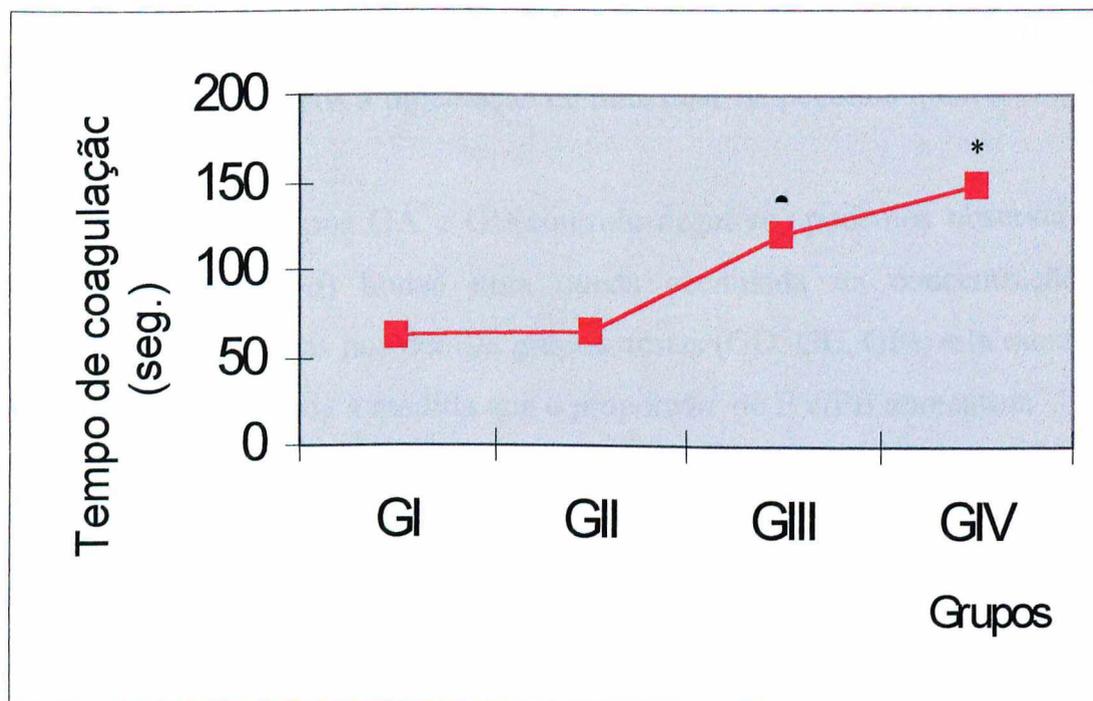


Fig. 03: Aumento do tempo de coagulação espontânea do sangue total de animais inoculados com peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pela presença do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

GI – Animais inoculados via intraperitoneal apenas com NaCl 0,9% (100µl de salina).

GII – Animais inoculados via intraperitoneal EV ressuspenso em NaCl 0,9%.

GIII – Animais inoculados via intraperitoneal com PB e EV 1:10 (1 parte de PB para 10 partes de EV).

GIV – Animais inoculados via intraperitoneal apenas com PB (0,6DL₅₀ de PB).

Grupos (n=5 camundongos).

* Aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação a GI e GII.

• Diferença estatisticamente significativa em relação a GI, GII e GIV.

5.1.5) Dosagem de fibrinogênio plasmático:

A figura 04 mostra as quantidades de fibrinogênio dosadas a partir do plasma de camundongos 2 horas após a inoculação de uma dose de peçonha igual à 1mg/kg de animal (0,6DL₅₀).

Em relação aos grupos GA e GB (controle negativo) podemos observar que em GC (controle positivo) houve uma queda acentuada na concentração de fibrinogênio plasmático, mas nos demais grupos testes (GD, GE, GF), esta queda foi se tornando menos acentuada à medida que a proporção de EV/PB aumentou.

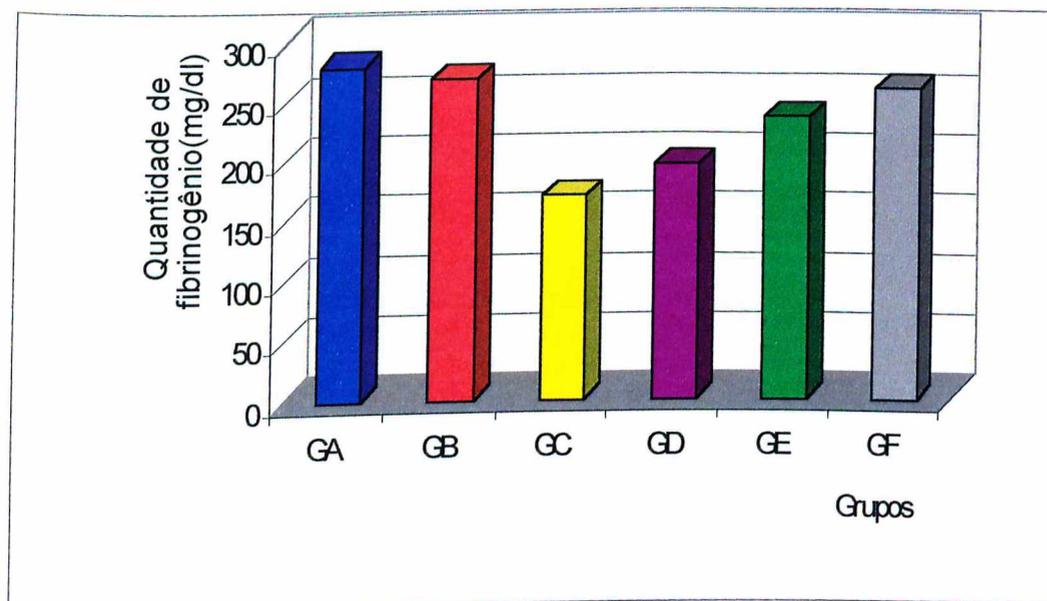


Fig. 04: Inibição da atividade desfibrinogenante da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*.

GA: NaCl 0,9%

GB: Extrato Vegetal (10 mg/kg)

GC: Peçonha (1 mg/kg)

GD: Peçonha + Extrato Vegetal (1:2,5)

GE: Peçonha + Extrato Vegetal (1:5)

GF: Peçonha + Extrato Vegetal (1:10)

Grupos (n=05 camundongos)

5.1.6) Atividade fibrinogenolítica.

A fig. 05 mostra o resultado do teste de degradação do fibrinogênio bovino pela peçonha na presença ou ausência de extrato vegetal.

Na linha B onde a peçonha e o fibrinogênio foram previamente incubados por duas horas a 37°C, observamos hidrólise das cadeias A α e B β do fibrinogênio. Quando fibrinogênio, peçonha e extrato em diferentes proporções foram previamente incubados (linhas C, D e E), uma diminuição na degradação da cadeia B β foi notada, cuja proteção é mais eficiente à medida em que se aumenta a proporção de EV em relação ao VB.

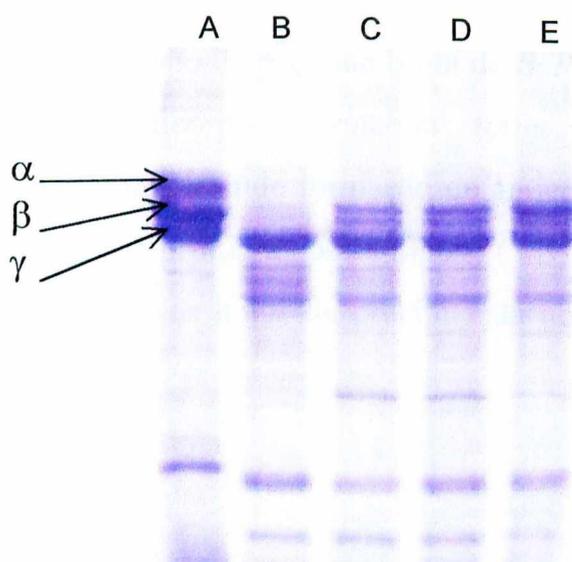


Fig. 05: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação da digestão do fibrinogênio bovino pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* combinada com extrato de *Casearia mariquitensis*.

- A – Fibrinogênio bovino.
- B – Fibrinogênio bovino + PB (5 μ g).
- C – Fibrinogênio bovino + PB + EV (1/2,5).
- D – Fibrinogênio bovino + PB + EV (1/5,0).
- E – Fibrinogênio bovino + PB + EV (1/10).

5.1.7) Produção de anticorpos.

5.1.7.1) Hiperimunização dos camundongos.

Durante a imunização dos camundongos do grupo GI (VB + FCA) e grupo GII (VB +EV +FCA) conforme descrito em material e métodos no item 4.4.7.1. Observamos que nos animais de GI, houve acentuada queda dos pêlos dorsais nos locais da aplicação da mistura, enquanto em GII observamos que nada aconteceu (resultados apenas comentados).

5.1.7.2) Imunodifusão

Os teste de imunodifusão da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* com seus respectivos anticorpos formaram fortes linhas de precipitação demonstrando que houve uma grande formação de anticorpos após o período de 6 semanas da administração da primeira dose antígeno (VB) aos camundongos.

A figura 06 apresenta os halos de precipitação nos títulos de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32.

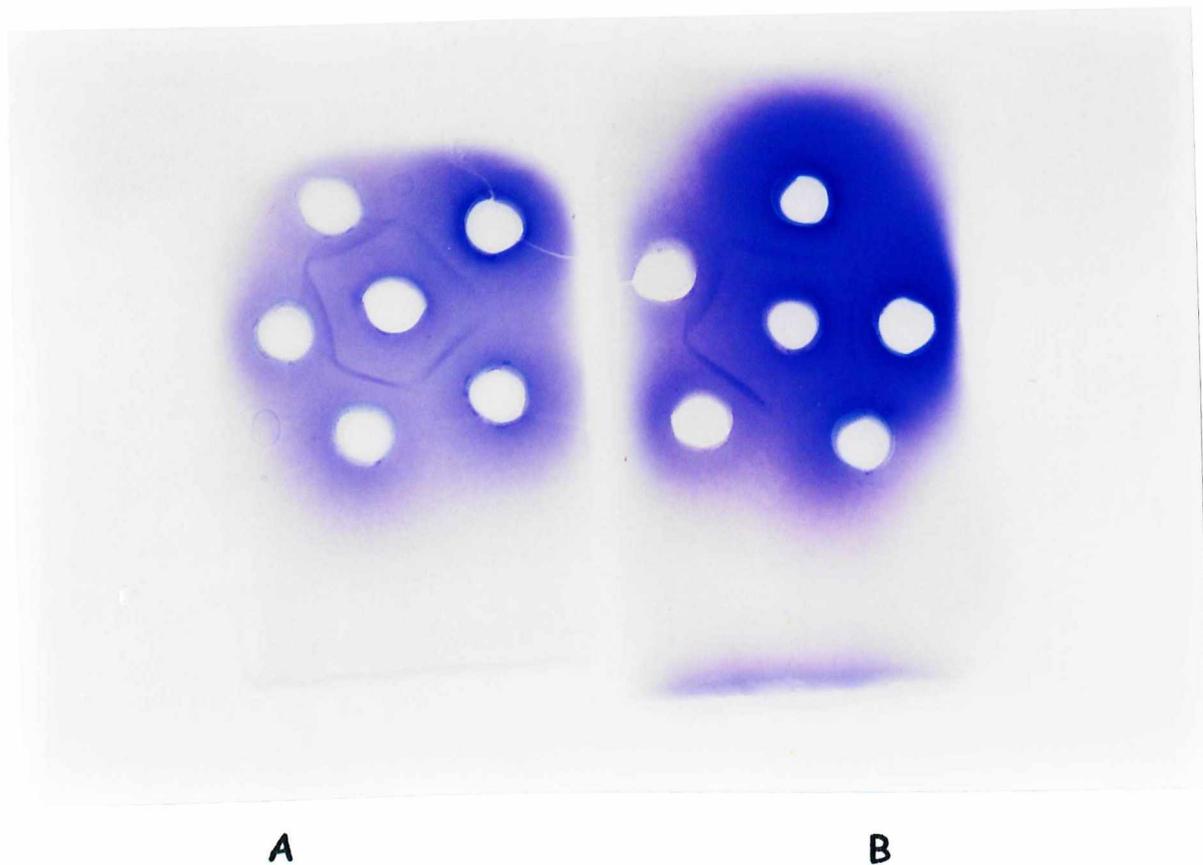


Fig.06: Imunodifusão da peçonha bruta com os anticorpos anti-peçonha bruta. A imunodifusão foi realizada em câmara úmida, temperatura de 2°C-8°C por 48 horas para o desenvolvimento dos arcos de precipitação.

A) Poço central: 10µl de PB (4mg/ml); poços laterais: anticorpos produzidos com adjuvante, peçonha mais extrato e titulados na ordem de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32.

B) Poço central: 10µl de PB (4mg/ml); poços laterais: anticorpos produzidos com peçonha mais adjuvante e titulados na ordem de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32.

6) DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi testar a eficiência inibitória do extrato de *Casearia mariquitensis* frente algumas atividades biológicas e enzimáticas relevantes da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Um dos principais componentes das peçonhas de serpentes são as enzimas fosfolipases A_2 (PLA₂), que podem induzir diversos efeitos deletérios como miotoxicidade, cardiotoxicidade, atuar sobre a agregação plaquetária, hemólise e induzir edema (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

Este trabalho iniciou-se testando a atividade fosfolipase A_2 (PLA₂) da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* na presença do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* usando-se folhas jovens e senescêntes, incubadas ou não por uma hora com peçonha (Fig. 01).

A *Casearia mariquitensis* é um arbusto cujo tamanho varia entre 3 e 5 metros de altura sendo que suas folhas caem no outono e brotam novamente com a chegada das chuvas e primavera. Desta forma podemos afirmar que as folhas coletadas em setembro eram jovens, enquanto que as coletadas em março eram senescentes. A inibição da atividade fosfolipase A_2 realizada com folhas jovens e senescentes foi de 44% e 39% respectivamente. Incubar ou não o EV com a peçonha por uma hora antes de realizar os experimentos, não apresentou diferenças significativas. Desta forma para todos os ensaios posteriores não se fez mais distinção quanto à idade das folhas e eliminou-se o tempo de incubação. KASHIABUCHI (1999) trabalhando com a mesma peçonha e extrato preparado com folhas coletadas nos meses de novembro e dezembro, portanto adultas, obteve aproximadamente 80% de inibição da atividade fosfolipase A_2 . Estes resultados discrepantes podem estar relacionados com a época em que a coleta das folhas foi realizada.

Segundo MARTINS et al., 1998, a concentração de princípios ativos ou fármacos contidos em um vegetal varia muito por influência do meio ambiente ou de maneira natural devido à genética da planta. Às vezes, têm-se uma menor ou maior expressão do gene responsável pela síntese de um determinado princípio

ativo. Uma vez que a planta apresenta “competência” para sintetizar algum tipo de fármaco, a concentração de substâncias ativas pode ser alterada por fatores climáticos, edáficos, exposições à microorganismos, insetos, outros herbívoros e poluentes. Excesso ou deficiência destes estímulos externos podem prejudicar a síntese de algum princípio ativo do vegetal.

Um exemplo são os alcalóides, cuja concentração pode variar muito durante o ano, podendo em certas épocas, estar restritos somente a determinados órgãos como folhas, raiz e caule.

Nossos resultados indicam que o princípio ativo relacionado com a inibição de fosfolipases A2 pode ser algum tipo de alcalóide (o qual confere pH alcalino à planta pela presença de nitrogênio amínico), pelo fato de o pH do extrato de *Casearia mariquitensis* preparado com solução salina ser ligeiramente alcalino (pH 7.8).

Outro efeito muito evidente no envencenamento botrópico é a interferência das diferentes toxinas contidas na peçonha sobre o equilíbrio hemostático, que é um fenômeno fisiológico e dinâmico que procura manter o sangue fluido no interior dos vasos, bem como impedir sua saída para os tecidos vizinhos (VERRASTRO et al., 1998).

As peçonhas botrópicas são ricas em enzimas serino-proteases designadas “thrombin-like”, que apresentam potente efeito coagulante “in vitro” e anticoagulante “in vivo”, conforme descrito na introdução.

Nossos ensaios “in vitro” mostraram que o extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* na proporção de 1/10 (peçonha /extrato) foi significativamente eficiente na inibição das “thrombin-like”, mas na proporção de 1/3 não. Em ambos os ensaios notamos o surgimento do coágulo de fibrina como o evento final da coagulação, mas com diferentes consistências.

A malha do coágulo de fibrina obtida com a proporção de 1/3 era mais grossa (coágulo mais rígido), enquanto aquela obtida na proporção de 1/10 era menos densa. Deste modo, imaginamos que à medida que aumenta a proporção do EV o tempo para surgimento do coágulo de fibrina será também aumentado.

O extrato de *Casearia mariquitensis* de alguma maneira atuou sobre as "thrombin-like" inibindo-as parcialmente e impedindo a rápida conversão do fibrinogênio do plasma bovino em fibrina.

Por outro lado, BORGES (1998) não conseguiu inibir significativamente a atividade coagulante da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* com extrato de *Casearia sylvestris* folhas e caule, na proporção de 1/3 respectivamente.

Os distúrbios na cascata de coagulação sangüínea provocados por peçonhas de serpentes podem ser avaliados por meio de vários testes laboratoriais, dentre eles, o tempo de coagulação espontânea do sangue total, que torna-se aumentado quando algum fator responsável pela coagulação está em deficiência.

A incoagulabilidade sangüínea "in vivo" testada em camundongos inoculados com salina (GI), extrato vegetal (GII), extrato vegetal mais peçonha (GIII) e peçonha (GIV) foi inibida significativamente ($p < 0.05$) no grupo teste (GIII - peçonha mais extrato combinados na proporção de 1/10). Os tempos de coagulação entre grupos tratados com salina e com extrato foram praticamente iguais, indicando que extrato puro não altera o equilíbrio hemostático; enquanto a incoagulabilidade do sangue daqueles animais inoculados apenas com peçonha foi significativamente modificada (Fig. 03).

O evento central da coagulação é a conversão do fibrinogênio solúvel, um a glicoproteína plasmática (340 kda) formada por três distintos pares de cadeias polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$ e γ)₂ em fibrina insolúvel.

É sabido que a principal causa do aumento no tempo de coagulação espontânea do sangue após o acidente botrópico é devido ao consumo exagerado de fibrinogênio plasmático. SANO-MARTINS et al. (1994), numa avaliação de 69 pacientes vítimas de picadas por serpentes do gênero *Bothrops*, principalmente *B. jararaca*, demonstraram que a incoagulabilidade do sangue total observada apresentava uma alta associação com baixas concentrações sanguíneas de fibrinogênio.

Nossos resultados (Fig. 04) mostram claramente que a atividade desfibrinogenante da peçonha (GC) foi praticamente inibida em 100% quando se

aumentou proporcionalmente o extrato de *Casearia mariquitensis*. Para se dosar o fibrinogênio circulante, antes foi necessário formar um "pool" com o plasma de todos os animais do mesmo grupo, o que impossibilitou a aplicação de tratamento estatístico dos resultados obtidos.

Muito recentemente, OLIVEIRA (2001) demonstrou que uma enzima serinoprotease com atividade semelhante à trombina, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* e designada por BthTI, é capaz de tornar o sangue incoagulável, por depletar totalmente o estoque de fibrinogênio plasmático; durante 48 horas, quando injetada via intraperitoneal em doses de 5µg.

A ação proteolítica das peçonhas botrópicas, é também muito evidente. Em nossos experimentos o efeito proteolítico da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre o fibrinogênio bovino foi analisado por eletroforese em gel de SDS e mostrou desaparecimento total das cadeias α e β do fibrinogênio, com formação de grande quantidade de produtos de degradação (Fig. 05, linha C). O efeito inibidor do extrato de *Casearia mariquitensis* mostrou eficiente na proteção das cadeias β e γ do fibrinogênio à medida que se aumentou a proporção de EV (1/2,5, 1/5,0, 1/10, linhas C, D e E). A observação das bandas correspondentes aos produtos de degradação formados evidencia muito bem este efeito protetor. No entanto o extrato não foi capaz de proteger a degradação da cadeia α do fibrinogênio.

BORGES (1998) trabalhando com o extrato de caule e folhas de *Casearia sylvestris* também não conseguiu inibir a degradação das cadeias α e β do fibrinogênio pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*

As fibrinogenases de peçonhas de serpentes podem ser classificadas em 3 distintos grupos de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio, conforme descrito na introdução. Recentemente, RODRIGUES et al. (2000), isolou e caracterizou a neuwiedase, uma fibrinogenase com preferência pela cadeia α do fibrinogênio. A neuwiedase atua sobre as cadeias α e β do fibrinogênio em pH neutro e sobre a cadeia α em pH alcalino, sendo inativada à temperaturas entre 75°C e 100°C. Portanto a neuwiedase é uma protease termolábil.

As metaloproteases fibrinogenolíticas e hemorrágicas são as responsáveis pelo quadro hemorrágico observado em pacientes picados por serpentes, tornando-se mais intenso devido a ação indireta da fibrinólise (MURUYAMA et al., 1993), pela inibição da agregação plaquetária (desintegrinas) e também pela indução à trombocitopenia (KAMIGUTI et al., 1996).

As hemorragias locais são muito comuns em envenenamentos botrópicos, devido à ação sobre as paredes dos vasos sanguíneos, que perdem sua integridade, resultando em hemorragia local.

A liberação do sangue através endotélio pode ser facilmente experimentada por injeções intradérmicas no dorso de camundongos (KONDO et al., 1960). Esta ação denominada hemorrágica foi ensaiada na presença do extrato de *Casearia mariquitensis*, que se mostrou bastante efetivo na proteção contra a hemorragia intradérmica (Fig. 03).

BORGES et al. (1998) verificaram que o extrato de *Casearia sylvestris* também mostrou grande eficiência protetora da atividade hemorrágica de peçonhas botrópicas. Outros pesquisadores (MELO et al., 1994) mostraram que o extrato bruto de *Eclipta prostata* e sua fração, wedelolactona inibiram significativamente a hemorragia provocada pela peçonha de *Bothrops jararaca*.

Talvez o extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* apresente substâncias quelantes de íons metálicos, já que metaloproteases são dependentes destes íons para dar início ao processo de hidrólise (BJARNASON & FOX, 1994).

Neste caso com as fosfolipases A₂ da peçonha de serpentes são cálcio dependentes, sua inibição poderia se dar pelo mesmo mecanismo, pois estas enzimas são dependentes de íons cálcio para se tornarem ativas.

O extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* se mostrou bastante eficiente ao neutralizar parcialmente os princípios tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, viabilizando também a produção de anticorpos, já que os efeitos locais provocados pela peçonha durante o processo de imunização na presença do extrato desapareceram.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAKURA, M. T. FURTADO, M. F. MANDELBAUM, F. R. (1992). Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*) **Comp. Biochem. Physiol.** **102**, 727-732.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; AMARAL, C. F. S.; HERING, S. E. (1990). Rattlesnake bites. Clinical features and complementary tests. **Mem. Inst. Butantan** **52**, 27-30.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmac. Ther.** **62**, 325-372.
- BORGES, M. H.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1998). Ação antipeçonha do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*. **Biotec. Ciên. Desenv.** **4**, 28-30.
- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacouetiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol.** **127**, 21-30.
- BOSCH, H. (1980). Intracelular Phospholipase A₂. **Biochim. Biophys. Acta** **604**, 191-246.

- DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; SAMPEDRO, A. M.; PEREIRA, J. E. S. (1992). Dosagem biológica do antiveneno botropico. **Mem. Inst. Butantan** **54**, 21-30.
- DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C. (1997) . A new phospholipase A₂ isofom isolated from *Bothrops neuwiedi* (Iarará chica) venom with novel kinitic and chromatographic properties. **Toxicon** **35**, 1205-1215.
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M. (1968). Purification and properties of phospholipase A₂ from pocine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta** **159**, 103-117.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. (1995). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** **33**, 1405-1474.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. (1964). A microbiuret method for stimating proteins. **Anal. Biochem.** **9**, 401.
- KAMIGUTI, A . S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G. (1986). Insights into the mechanism of hemorrhage causad by snake venom metalloproteinase. **Toxicon** **34**, 627-642.
- KASHIWABUSHI, F. K. (1999). **Estudo da neutralização das fosfolipase A₂ e coagulante das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizando o extrato vegetal aquoso de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae)**. Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, 31p..

- KOMORI, Y.; HAGIHARA, S.; TU, A.T.(1985). Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox* (Western diamondback rattlesnake) venom. **Biochim. Biophys. Acta** **829**, 127-130.
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. (1960). Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. **Jap. J. Med. Sci. Biol.** **13**, 43-51.
- LOBO DE ARAÚJO, A. L.; KAMIGUTI, A.; BON, C. (2001). Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon** **39**, 371-375.
- MAHIR, M. S.; HYND, J.; W.; FLUTE, P. T.; DORMANDY, J. A. (1987). Effects of defibrinogenation on the early patency rate of experimental small calibre arterial grafts. **Br. J. Surg.** **749**, 508-510.
- MANDELBAUM, F. R. (1990). Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan** **52**, 35-36.
- MARKLAND, F. S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon** **36**, 1749-1800.
- MARSH, N. (1994). Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan** **52**, 35-40.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. (1998). *Plantas medicinais*. v.3, 220p..
- MATRISIAN, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays** **14**, 455-463.

- MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, S. (1994). Inhibition of the myotoxic and haemorrhagic activity of crotalidae venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** **32**, 595-603.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys** **231**, 309-311.
- OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1999). Purification and characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (caissaca). **Biochem. and molec. Biol. International** **47**, 1069-1077.
- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R. (1986). Ability of polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize local myonecrosis induced by *Crotalus atrox* venom. **Toxicon** **24**, 201-203.
- OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. (2000). Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon** **38**, 1087-1100.
- PETRETSKI, J. H.; HANASHIRO, M. M.; RODRIGUES, F. R.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L. T.; KIPNIS, T. L. (2000). Edema induction by the desintegrin-like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagins. **Biochem. Biophys. Resear. Commun.** **276**, 29-34.
- RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. (2000). Structural and functional

characterization of neuwiedase, a non hemorrhagic fibri(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** **381**, 213-224.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (1998). *Imunologia. Imunidade às bactérias e aos fungos* **4**, 1-13.

SANO-MARTINS, I. S. (1990). Hematological disturbances induced by *Bothrops* venom. **Mem. Inst. Butantan** **52**, 39-40.

SOUSA, J. R. F.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R.B. (2001) Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon** **39**, 787-792.

CAPÍTULO II:

Inibição da toxicidade e letalidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*.

RESUMO:

As serpentes são responsáveis por aproximadamente 20000 acidentes anuais, com mais de 100 mortes, tornando um problema de saúde pública. Os objetivos deste trabalho foram determinar a toxicidade do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* e analisar o efeito deste sobre a toxicidade e letalidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A toxicidade do EV foi testada com diferentes doses pelas vias oral e intraperitoneal (ip.). Para a toxicidade (via ip.) foram testadas as doses (0,2 e 1,0 mg de /animal/dia), sendo que apenas a maior alterou significativamente os elementos figurados do sangue. Já a toxicidade via oral foi analisada apenas com uma dose igual a 2,0mg de EV/animal/dia e os elementos figurados do sangue não sofreram nenhuma alteração significativa. As plaquetas em nenhuma das condições se alterou. A toxicidade do EV também foi testada a partir da administração de uma única dose (50, 100 e 200 mg/kg de peso de animal); sendo que apenas a maior, (200 mg/kg de peso de animal), foi capaz de induzir sinais de toxicidade.

Inicialmente, foram aplicados nos camundongos (via ip.) $0,6DL_{50}$ de peçonha ($1DL_{50}$ é igual a 1,66mg/kg de peso de animal). Camundongos (n=5) foram distribuídos em grupos controle positivo (somente peçonha), somente salina (branco), controle negativo (somente extrato vegetal). O grupo teste recebeu PB + EV na proporção de 1/10 respectivamente. A mistura foi imediatamente administrada e as alterações hematológicas observadas por hemograma completo de cada animal 6 horas depois da inoculação. Em relação ao grupo controle positivo, observamos no grupo teste uma inibição significativa ($p < 0,05$) da toxicidade da peçonha, por análise dos

elementos figurados do sangue; exceção para as plaquetas. Em outro ensaio de toxicidade, os camundongos foram tratados (via ip.) com a mesma massa de extrato vegetal do experimento anterior durante 6 dias; em seguida foram envenenados com 0,6DL₅₀ de peçonha. Nestas condições, não houve inibição significativa dos efeitos tóxicos provocados pela peçonha. Na letalidade, houve inibição estatisticamente significativa quando peçonha e extrato foram combinados na proporção de 1/10 e imediatamente aplicados e também quando os camundongos foram pré-tratados via ip. com pequenas doses diárias de extrato durante 6 dias e a seguir envenenados. Para os ensaios em que o extrato vegetal foi administrado via oral, não houve inibição independentemente da dose utilizada. Nos experimentos de letalidade foram aplicados sempre 3 DL₅₀. Conclui-se que o extrato de *Casearia mariquitensis* é pouco tóxico e capaz de neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* nas condições ensaiadas.

ABSTRACT:

The snake are responsible by approximately 20000 accidents yerarly, with most of 100 death, make one problem of health public. The objectives these work were determine the toxicity of extract vegetable (EV) of *Casearia mariquitensis* and analyze the your effect on toxicity and letality of venom of *Bothrops neuwiedi pauloensis*. The toxicity of EV was tested with different dose for route oral and ip. For the toxicity (IP.) were tested doses (0,2 and 1,0mg/animal/day) and only the bigger change statistically the elementos of blood. The toxicity route oral was analysed with once dose equal 2,0mg of EV/animal/day not caused alteration significative. The platetas never undergo alterations. The toxicity of EV was tested too for administration of one sole dose (50, 100 and 200 mg/kg of weight of animal) and only the bigger was capable of induce indication of toxicity. Initiality, were application in mouses (route ip.) 0,6DL₅₀ of venom (1DL₅₀ = 1,66mg/ hg of animal). Mouses (n=5) were distribute in groups positive control (only venom), only saline (white) and negtive control (only EV). The group test receive PB + EV

in proportion of 1/10 respectively. The mixture was immediately administered and the alterations hematologic observed for hemogram complete of same animal 6 hour after of inoculation. Was observed in group test one inhibition significative of toxicity of venom ($p < 0,05$), when was compared with the positive control, except for platetas. In other essay of toxicity, the mice were treated (route ip) with the same mass of extract vegetable of experiment former during 6 days; following were intoxicated with $0,6DL_{50}$ of venom. With the conditions, not was inhibition significative of effects of venoms. In letality, was inhibition significative when venom and extract were combined in proportion of 1/10 and immediately applied, and too when mice were inoculated (route ip) with the short dose of extract for day during 6 days. For essays with extract applied route oral, never wasnt inhibition of letality. The experiments of letality were applied $3 DL_{50}$ of venom. The conclusion was the extract of *Casearia mariquitensis* is little toxic and capable of neutralized the effects toxics of venom of *Bothrops neuwiedi pauloensis* in conditions experimental.

1) INTRODUÇÃO

As peçonhas de serpentes são constituídas por uma grande quantidade de proteínas tóxicas, sendo que algumas delas são altamente letais (DALMORA et al., 1992) e ainda podem provocar distúrbios no sistema hematológico; e o hemograma em última análise representa o meio mais direto e prático de se estudar os elementos figurados do sangue periférico: as hemáceas, os leucócitos e as plaquetas (MOURA et al., 1994).

Investigações clínicas (presença de febre) e laboratoriais (neutrofilia, leucocitose, monocitose e etc) tem mostrado que cada gênero de serpente induz um típico quadro de envenenamento (ROSENFELD et al., 1960; KELEN et al., 1960; COSTA et al., 1989; AZEVEDO-MARQUES et al., 1990 e GILLISSEN et al., 1994).

Assim como existem envenenamentos típicos, existem também variações na letalidade das peçonhas, sendo que esta pode variar de acordo com o gênero e espécie da serpente (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987; FURTADO et al., 1991; BORGES, 1998 e RODRIGUES et al., 2000).

Os envenenamentos provenientes de picadas de serpentes, frequentemente são tratados por administração endovenosa de antisoros produzidos a partir de um processo de imunização em cavalos, portanto o sucesso desta terapia está relacionado com tempo em que a vítima tem acesso ao atendimento médico, já que as injúrias locais se instalam rapidamente após a picada e são de difícil reversão.

A cura para diversos males está relacionada com princípios farmacologicamente ativos de plantas ditas medicinais, e estes potenciais terapêuticos tem sido testados também no tratamento de acidentes ofídicos (MARTZ et al., 1992; MELO et al., 1994; PACHECO et al., 1995; BORGES et al., 2000).

Com base nas informações citadas anteriormente, este trabalho avalia o potencial antiofídico do extrato aquoso da *Casearia mariquitensis* (limãozinho) em relação à peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada).

2) OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* e sua capacidade de inibir ou neutralizar as alterações hematológicas e letalidade causados pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada).

3) MATERIAIS

3.1) Peçonha bruta:

A peçonha bruta da serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizada neste trabalho foi adquirida junto à Pentapharm do Brasil, dessecada a vácuo à temperatura ambiente e posteriormente estocada a - 20° C.

3.2) Folhas de *Casearia mariquitensis*:

As folhas de *Casearia mariquitensis* utilizadas foram coletadas às margens do Rio Araguari na região de Uberlândia – MG, onde a espécie se desenvolve de forma espontânea. Nestas regiões a planta não recebe nenhum cuidado especial no que se refere ao suprimento de nutrientes. As coletas eram realizadas pela tarde na ausência de chuvas. A identificação taxônomica da planta foi feita pelo Professor Glein Monteiro de Araújo do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando-se o método clássico de observação dos caracteres morfológicos em microscópio.

3.3) Animais:

Para os testes "in vivo" foram utilizados camundongos machos pesando (25-32g) da raça Swiss, fornecidos pela Pentapharm do Brasil e mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais com água e alimento à vontade.

3.4) Reagentes:

Fibrinogênio bovino, β mercaptoetanol, Tris-HCl, glicerol, azul de bromofenol, glicina EDTA, acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, coomassie brilliant blue R-250, trizma, fucsina básica, persulfato de amônio e agarose, todos da Sigma Chem. Co. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.5) Equipamentos:

Centrífuga, espectrofotômetro, banho-maria, pHmetro, liofilizador, cuba para eletroforese, multiprocessador, agitador magnético e balança de precisão.

4) MÉTODOS

4.1) Preparação da amostra de peçonha.

As amostras de peçonha foram preparadas momentos antes do uso, evitando assim perdas de atividade. Aproximadamente 5 mg de peçonha bruta eram pesadas e dissolvidas em 250 μ l de NaCl 0.9%, centrifugados a 10000 rpm durante 7 minutos, e o sobrenadante separado. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, adicionando sempre o sobrenadante obtido à aquele primeiro.

4.2) Dosagem de proteínas (Itzhaki & Gill, 1964).

Para a quantificação das proteínas presentes nas amostras obtidas, soluções contendo 0.1 a 2.0 mg 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 um volume de 1.0 ml com água desionizada, aos quais se acrescentou 500 µl de R₁ ou R₂. Em seguida a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SPEKOL) a 310 nm contra um branco sem proteína. Os reagentes R₁ e R₂ são constituídos respectivamente por 0.21% de CuSO₄.5 H₂O dissolvido em NaOH 30.4%, enquanto R₂ é formado por uma solução de NaOH 30%.

4.3) Preparo dos extratos vegetais (BORGES et al., 1998).

As folhas foram lavadas e trituradas com H₂O desionizada em multiprocessador por 15 minutos e filtradas em filtro comun. O filtrado foi centrifugado à 30000g por 20 minutos em centrífuga Himac CR₂₁, o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C. No momento do experimento o extrato era pesado e dissolvido em NaCl 0.9%.

4.4) Alterações hematológicas.

Nos ensaios de toxicidade a partir do sangue dos animais, a coleta foi feita pelo plexo ocular com capilar estéril contendo EDTA, ou por punção cardíaca com seringa de insulina umedecida com EDTA.

A seguir, o sangue de cada animal era homogeneizado durante 10 minutos e o hemograma lido no aparelho Coulter T – 890, do Laboratório de Análises Clínicas da FAEPU.

4.4.1) Alterações hematológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Para a realização deste experimento era necessário que os animais recebessem uma dose de peçonha que fosse tóxica, porém não letal.

Um único grupo de camundongos (n=5), parcialmente anestesiados com éter sulfúrico teve o sangue coletado na presença de anticoagulante (EDTA) pelo plexo ocular para a análise de hemograma completo como descrito acima. Após a coleta os olhos dos animais eram lavados com água boricada para tornar o ambiente asséptico.

O sangue de cada animal foi homogeneizado e os respectivos hemogramas realizados. 24 horas depois estes animais foram inoculados via ip. com 0.6 DL₅₀ da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*; a seguir nos intervalos de tempos iguais à 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação da peçonha bruta, o sangue de cada animal era coletado e o hemograma completo analisado, como citado acima.

O termo DL₅₀ significa a menor dose capaz de matar 50% dos animais experimentais. Segundo (BORGES, 1998) a DL₅₀ para a peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* é de 1.66 mg/ kg de animal.

4.4.2) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* quando combinados antes da aplicação.

Animais que receberam uma dose única contendo 100µl de amostra via ip., foram divididos em 4 grupos (n=5) como especificado abaixo:

- GI: 100µl de salina 0,9%.
- GII: 100µl de EV (10mg/kg de animal).
- GIII: 100µl de PB + EV (1mg/kg : 10mg/kg de animal).

- GIV: 100 μ l de PB (1mg/kg de animal).

Após 6 horas da administração, os animais eram anestesiados com éter de petróleo, o sangue coletado por punção cardíaca na presença de anticoagulante, homogeneizado e em seguida os hemogramas realizados conforme o ítem 4.4.

4.4.3) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo pré-tratamento via intraperitoneal com extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

Para este experimento os animais foram subdivididos em 3 grupos (n=5, 25g), previamente tratados com 6 doses 100 μ l de extrato vegetal e/ou salina 0,9% ip., em intervalos de tempo iguais a 24 horas para cada dose. 40 minutos após a aplicação da última dose, os animais dos grupos GII e GIII foram inoculados com 100 μ l de uma solução de peçonha bruta. O grupo GI recebeu apenas solução salina 0,9% (controle).

Cada grupo recebeu o pré-tratamento diário abaixo:

- GI: Solução salina 0,9%.
- GII: 0,2mg de EV.
- GIII: Solução salina 0,9%.

Após 6 horas os animais foram sacrificados, o sangue de cada animal foi retirado por punção cardíaca, homogeneizado e os hemogramas lidos seguindo o ítem 4.4.

4.5) Ensaios de inibição de letalidade da peçonha.

4.5.1) Após combinar peçonha bruta e extrato vegetal.

Estes experimentos foram realizados com 3 grupos de camundongos (n=5, 30g) como mostrado abaixo:

- GI – 3DL₅₀ de peçonha bruta = 1 parte (5mg/kg de peso de animal).
- GII – PB + EV na proporção de 1:10 (5mg : 50mg/kg de peso de animal).
- GIII – EV (50mg/kg de animal).

Em cada animal administrou-se 100µl de amostra (extrato e/ou peçonha) pela via ip. e o tempo de sobrevivência dos animais de cada grupo cronometrado. A seguir o tempo médio de sobrevivência de cada grupo era determinado e comparado. Os animais foram observados por um período de 24 horas.

4.5.2) Após pré-tratamento com extrato vegetal.

4.5.2.1) Via oral.

Para este experimento 5 grupos de animais (n=5, 30g) pré-tratados via oral com 100µl diferentes doses de extrato vegetal. Cada animal recebeu 6 vezes a mesma dose de extrato vegetal em intervalos de 24 horas; 40 minutos depois da última dose cada animal recebeu 3DL₅₀ de peçonha bruta via ip..Os grupos foram assim constituídos:

- GI: 6 doses de salina 0,9%, em intervalos de 24 horas cada e envenenados com 3DL₅₀ de peçonha 40', após a última dose.
- GII: 6 doses de EV (0,2mg) em intervalos de 24 horas cada e envenenados com 3DL₅₀ de peçonha 40' após a última dose.
- GIII: 6 doses de EV (0,5mg) em intervalos de 24 horas cada e envenenados com 3DL₅₀ de peçonha 40' após a última dose.

- GIV: 6 doses de EV (1,0mg) em intervalos de 24 horas cada e envenenados com 3DL₅₀ de peçonha 40' após a última dose.
- GV: 6 doses de EV (2,0mg) em intervalos de 24 horas cada e envenenados com 3DL₅₀ de peçonha 40' após a última dose.

A seguir o tempo médio de sobrevivência dos animais de cada grupo era determinado e comparado. Os animais foram observados por um período de 24 horas.

4.5.2.2) Via intraperitoneal.

Estes experimentos foram realizados exatamente com descrito no item 4.5.2, excetuando-se a via de inoculação do extrato vegetal, que neste caso foi intraperitoneal.

4.6) Determinação da toxicidade do extrato de *Casearia mariquitensis* por via intraperitoneal.

A determinação da toxicidade do extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* por via intraperitoneal foi investigada de duas formas:

A) Por aplicação de doses consecutivas:

Neste ensaio os animais foram divididos em dois grupos cada; um grupo (n = 12) recebia 0.2mg/animal/dia, o outro (n = 15) recebia 1mg/animal/dia de extrato vegetal, conforme descrito abaixo:

- GI: 0,2mg de EV/animal/dia.
- GII: 1,0 mg de EV/animal/dia.

Inicialmente, 2 animais de cada grupo eram sacrificados e o sangue coletado por punção cardíaca, homogeneizado e os hemogramas realizados; conforme descrito no item 4.4. Em seguida os demais animais restantes de cada grupo foram inoculados com extrato vegetal por via intraperitoneal, como especificado acima.

Após 24 horas mais dois animais eram sacrificados, o sangue coletado, homogeneizado e os hemogramas realizados; seguindo a mesma metodologia. Daí por diante os procedimentos foram os mesmos até se extinguirem os animais do grupo I e restarem 3 animais do grupo III.

B) Por aplicação de uma única dose:

Para este experimento os animais machos eram distribuídos em 3 grupos (n=12; 30g) que receberam 1,5, 3,0, 6,0 mg de extrato vegetal pela via intraperitoneal, respectivamente.

As alterações físicas, comportamentais e óbitos foram observados durante 14 dias.

4.7) Determinação da toxicidade do extrato vegetal por via oral.

Em um grupo de animais (n=12; 30g), foi administrado via oral 200µl de uma solução contendo extrato vegetal e salina 0,9%, conforme descrito abaixo:

- GI: Solução salina 0,9% + 2mg de EV/animal/dia.

Inicialmente, 2 animais eram anestesiados com éter de petróleo, o sangue coletado por punção cardíaca, homogeneizado e os hemogramas realizados; conforme descrito no item 4.4.

Aos 10 animais restantes administrou-se extrato vegetal, via oral. Após 24 horas, mais dois animais eram sacrificados, o sangue coletado, homogeneizado e os hemogramas realizados; seguindo a mesma metodologia. Daí por diante os procedimentos foram os mesmos até se extinguirem os animais do grupo.

4.8) Análise estatística dos resultados.

Os resultados apresentados foram submetidos aos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov (K-S), Kruskal-Wallis (H) e testes de significância da diferença entre duas médias de amostragens pequenas (Teste t de Student).

5) RESULTADOS

5.1) Alterações hematológicas.

5.1.1) Alterações hematológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

A tabela I apresenta as alterações hematológicas observadas após inoculação via intraperitoneal de 0,6DL₅₀ da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em diferentes intervalos de tempo.

Podemos observar que a toxicidade da peçonha sobre os principais elementos figurados do sangue foi mais evidente 6 horas após a sua inoculação.

Tab. I: Alterações hematológicas causadas pela peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em função do tempo.

Elementos do sangue	Tempo (horas)*				
	0	06	12	24	48
Leucócitos (10 ³ /mm ³ de sangue)	8.8±0.59	6.4±0.49	6.2±0.85	7.7±0.9	8.5±0.69
Hemáceas (10 ⁶ /mm ³ de sangue)	8.33±038	4.26±0.67	6.06±0.28	6.73±0.69	7.04±059
Hemoglobina (g/dl)	13.8±0.3	7.8±0.15	9.8±0.42	11.5±0.19	12.1±0.99
Hematócrito (%)	45±1.4	23.9±1.2	32±1.3	37.1±0.2	40±0.3
Plaquetas (10 ³ /mm ³ de sangue)	868±15	82±16	219±10	869±21	894±23

* Estes resultados se referem às médias e desvios padrões de 5 animais analisados.

5.1.2) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* quando combinados antes da aplicação.

A tabela II apresenta alterações hematológicas em camundongos após receberem salina 0,9% (GI), salina 0,9% mais extrato vegetal (GII), peçonha mais extrato vegetal na proporção de 1/10; m/m (GIII) e somente peçonha (GIV), conforme descrito em material e métodos no item 4.5.4.

Observamos que os índices hemantimétricos dos grupos GI e GII não diferiram. Já para o grupo GIV, notamos uma acentuada injúria nas hemáceas, hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Enquanto o grupo teste (GIII), poucas alterações hematológicas foram observadas, exceção para as plaquetas, cujo predomínio foi plaquetopenia. Em nenhum grupo (GI, GII, GIII e GIV) foi observado variação quantitativa nos leucócitos.

Estatisticamente, os valores absolutos de todos os elementos figurados do sangue dos animais dos grupos GI e GII (controles negativos) não diferem. Já para o grupo teste (GIII) e controle positivo (GIV) a diferença absoluta entre hemáceas, hemoglobina e hematócrito é significativa ($p < 0,05$). A variação na quantidade de plaquetas entre GIII e GIV não foi significativa.

Tab. II: Inibição das alterações hematológicas de animais inoculados com peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

Elementos do sangue	Grupos (n=5)			
	GI*	GII*	GIII*	GIV*
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$ de sangue)	8,1±0,46	7,3±1,0	9,2±0,98	7,8±0,15
Hemáceas ($10^6/\text{mm}^3$ de sangue)	8,20±0,68	7,94±0,33	7,62±0,73	5,67±0,12
Hemoglobina (g/dl)	13,4±0,08	13,2±0,56	13,0±0,53	9,62±0,80
Hematócrito (%)	44,8±0,16	41,9±0,72	40,3±0,50	30,8±1,02
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$ de sangue)	1013±24	1002±14	280±23	156±8

* Médias de três ensaios e seus respectivos desvios padrões.

Tab. II: Inibição das alterações hematológicas de animais inoculados com peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

GI – Animais inoculados via intraperitoneal com 100µl de salina.

GII – Animais inoculados via intraperitoneal com EV.

GIII – Animais inoculados via intraperitoneal com PB + EV 1:10.

GIV – Animais inoculados via intraperitoneal com PB (0.6 DL₅₀).

• Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$), relação aos demais grupos.

5.1.3) Inibição das alterações hematológicas induzidas peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo pré-tratamento via intraperitoneal com extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*.

A tabela III apresenta os resultados dos hemogramas de camundongos submetidos a pré-tratamento diário durante 6 dias via intraperitoneal com salina 0,9% (GI – controle negativo), com 0,2mg de EV/animal/dia (GII – grupo teste) e com salina 0,9% (GIII – controle positivo), conforme descrito na metodologia.

Em relação aos grupos controle (GI e GIII) observamos que houve uma discreta proteção em hemáceas, hemoglobina, e hematócrito; os leucócitos mantiveram-se inalterados.

As plaquetas dos grupos GII e GIII em relação a GI sofreram acentuada plaquetopenia.

Tab. III: Hemogramas de animais pré – tratados durante 6 dias com extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* de inoculados via intraperitoneal respectivamente com 0,6 DL₅₀ da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Elementos do sangue	Grupos (n=5)		
	GI*	GII*	GIII*
Leucócitos ¹	8,1±0,76	6,9±0,89	8,5±0,71
Hemáceas ²	8,69±0,74	6,79±0,37	5,19±0,58
Hemoglobina ³	14,8±0,85	11,2±0,96	9,0±0,86
Hematócrito ⁴	47,4±0,56	34,0±0,91	28,3±0,75
Plaquetas ⁵	812±18	239±7	231±9

* Médias e desvios padrões referentes à 5 animais.

1 – Contagem expressa em 10³/mm³ de sangue.

2 – Contagem expressa em 10⁶/mm³ de sangue.

3 – Contagem expressa em g/dl.

4 – Contagem expressa em %.

5 – Contagem expressa em 10³/mm³ de sangue.

GI - Animais pré-tratados via intraperitoneal com 5 doses de salina 0,9% (100µl/animal/dia) e inoculados após 40' da última dose com 100µl de salina 0,9%.

GII - Animais pré-tratados via intraperitoneal com 5 doses de EV (0,2mg/animal/dia) e inoculados após 40' da última dose com 0,6DL₅₀ de PB.

GIII - Animais pré-tratados via intraperitoneal com 5 doses de salina 0,9% (100µl/animal/dia) e inoculados após 40' da última dose com 0,6DL₅₀ de PB.

Os resultados não foram estatisticamente significativos (teste t de Student) ($p > 0.05$).

5.2) Ensaios de inibição da letalidade da peçonha.

5.2.1) Após combinar peçonha bruta e extrato vegetal.

A inibição da letalidade foi baseada na DL₅₀ (dose letal 50%) da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* determinada como 1.66mg/kg de camundongo (resultados não apresentados).

A letalidade e o tempo médio de sobrevivência para os animais de cada grupo foram anotados e estão apresentados na figura 01. Foi observado que para o grupo GI (controle positivo – 5mg de peçonha/ kg de animal) houve 100% de letalidade, e o tempo médio de sobrevivência foi 151', enquanto para GIII (controle negativo – 50mg de extrato vegetal/kg de animal) foi observado 100% de sobreviventes. Já grupo teste GII (animais que receberam via intraperitoneal PB/EV na proporção 5mg/kg de animal para 50mg/kg de animal), houve 60% de letalidade, cujo tempo médio de sobrevivência foi de 687'.

A sobrevivência dos animais foi observada por um período de 24 horas. Cabe ainda ressaltar que os 40% de sobreviventes do grupo GII e os 100% de sobreviventes do grupo GIII foram mantidos no biotério recebendo água e alimentação a vontade durante 8 dias. Neste intervalo de tempo que antecedeu o sacrifício, os sobreviventes ganharam bastante peso e não manifestaram nenhum efeito colateral.

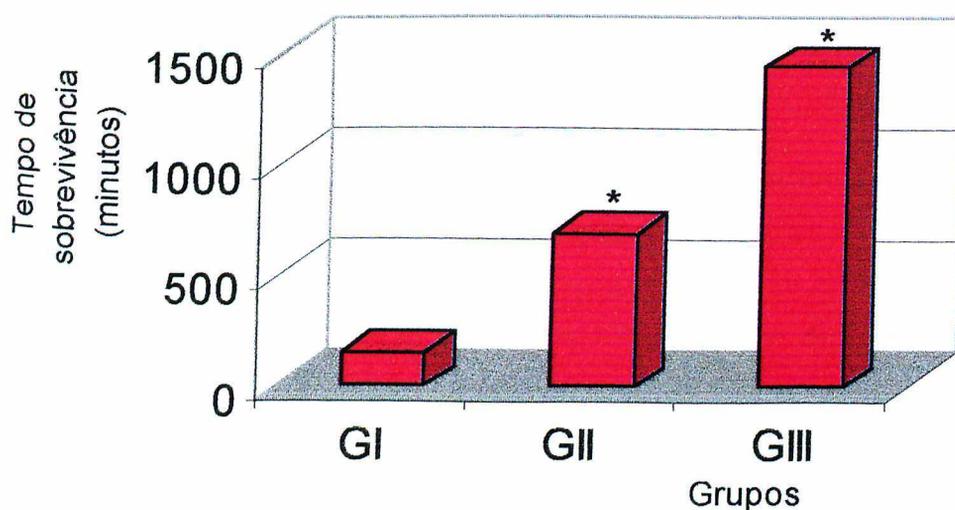


Fig. 01: Aumento na expectativa de vida de camundongos após receberem 5 mg de PB/kg de animal combinadas com 50 mg de EV/kg de animal.

GI – Animais inoculados com 3DL₅₀ de peçonha (controle positivo).

GI – Animais inoculados com PB + EV (1:10).

GIII – Animais inoculados com EV (controle negativo).

Grupos (n =5 camundongos).

*Aumento estatisticamente significativo em relação a GI (p<0,05).

5.2.2) Após pré-tratamento com extrato vegetal.

5.2.2.1) Via oral.

A figura 02 abaixo apresenta os tempos médios de sobrevivência dos animais de cada grupo após receberem via oral extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* por um período de 6 dias, seguido de envenenamento com 3DL₅₀ de peçonha conforme descrito no item 4.5.2.1.

Podemos observar que o pré-tratamento via oral não favoreceu aumento significativo no tempo médio de sobrevivência dos animais dos grupos GII, GIII, GIV e GV, em relação ao grupo GI (controle positivo).

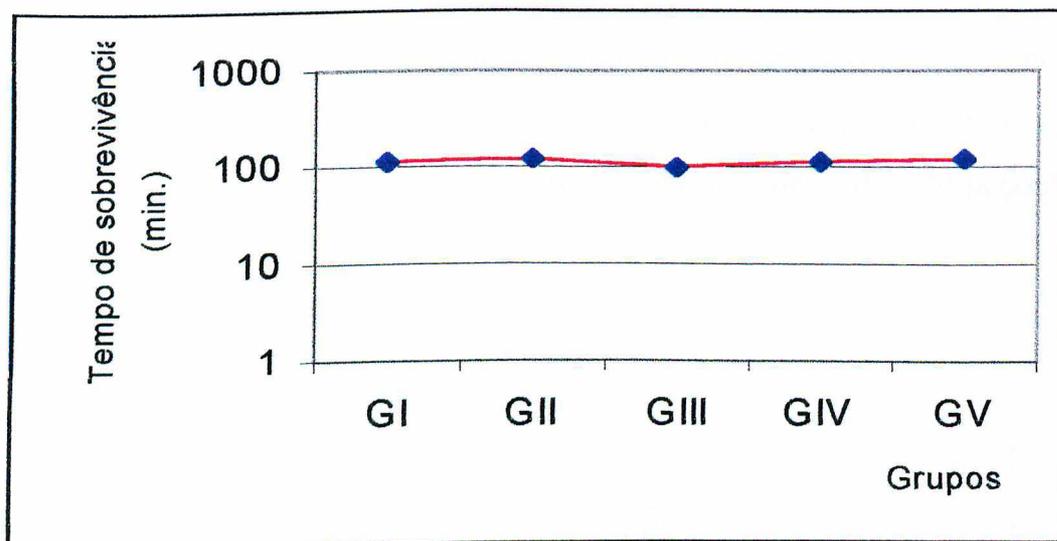


Fig. 02: Inibição da letalidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo pré-tratamento via oral com extrato de *Casearia mariquitensis*.

GI – Animais pré – tratados via oral com 6 doses de salina 0,9% em intervalos de 24 horas. Após 40' da última dose, foram inoculados via intraperitoneal com 3DL₅₀ de PB (controle positivo).

GII – Animais pré – tratados via oral com 6 doses de EV (0,2 mg/animal/dia) em intervalos de 24 horas. Após 40' da última dose, foram inoculados via intraperitoneal com 3DL₅₀ de PB (controle positivo).

GIII – Animais pré – tratados via oral durante 6 doses de EV (0,5 mg/animal/dia) em intervalos de 24 horas. Após 40' da última dose, foram inoculados via intraperitoneal com 3 DL₅₀ de PB.

GIV – Animais pré – tratados via oral durante 6 doses EV (1,0mg/animal/dia) em intervalos de 24 horas. Após 40' da última dose, foram e inoculados via intraperitoneal com 3 DL₅₀ de PB.

GV – Animais pré – tratados via oral durante 6 doses de EV (2,0mg/animal/dia) em intervalos de 24 horas. Após 40' da última dose, foram inoculados via intraperitoneal com 3 DL₅₀ de PB.

Grupos (n=5camundongos).

5.2.2.2) Via intraperitoneal.

A figura 03 abaixo apresenta tempos médios de sobrevivência dos camundongos de cada grupo após receberem pré-tratamento via intraperitoneal com doses diárias de extrato vegetal iguais a 0,2, 0,5 1,0, 2,0 mg/animal/dia conforme descrito em material métodos; item 4.5.2.2.

Observamos que somente o grupo de animais pré-tratados com a menor dose de extrato (0,2mg/animal/dia) apresentaram aumento satisfatório no tempo de sobrevivência. 20% destes animais resistiram à aplicação de 3DL₅₀ de peçonha por um período de uma semana.

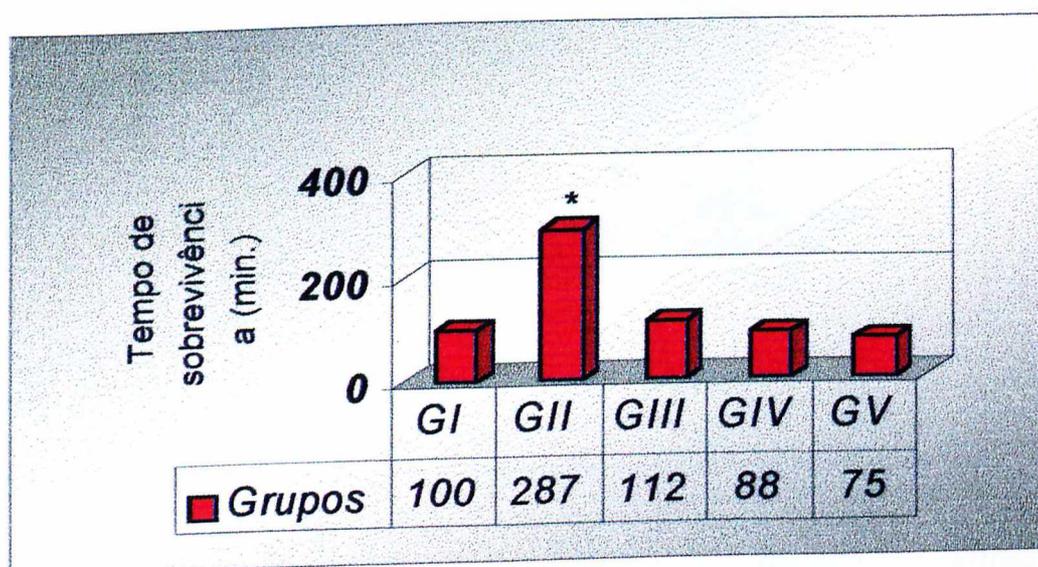


Fig. 03: Inibição da letalidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pelo pré-tratamento via intraperitoneal com extrato de *Casearia mariquitensis*.

GI – Animais pré – tratados durante 6 dias com 100µl de salina e inoculados via intraperitoneal, respectivamente com 3DL₅₀ de PB (controle positivo).

GII – Animais pré – tratados durante 6 dias com EV (0,2 mg/animal/dia) e inoculados via intraperitoneal respectivamente com 3 DL₅₀ de PB.

GIII – Animais pré – tratados durante 6 dias com EV(0,5 mg/animal/dia) e inoculados via intraperitoneal respectivamente com 3 DL₅₀ de PB.

GIV – Animais pré – tratados durante 6 dias com EV(1,0mg/animal/dia) e inoculados via intraperitoneal respectivamente com 3 DL₅₀ de PB.

GV – Animais pré – tratados durante 6 dias com EV(2,0mg/animal/dia) e inoculados via intraperitoneal respectivamente com 3 DL₅₀ de PB.

*Aumento estatisticamente significativo (p<0,05).

Em função dos ótimos resultados obtidos no experimento anterior, repetimos os ensaios apenas com os grupos GI (controle positivo) e GII (grupo teste) respeitando as mesmas condições.

A figura 04 mostra que novamente 20% dos animais sobreviveram durante o mesmo tempo de observação, confirmando os resultados já obtidos.

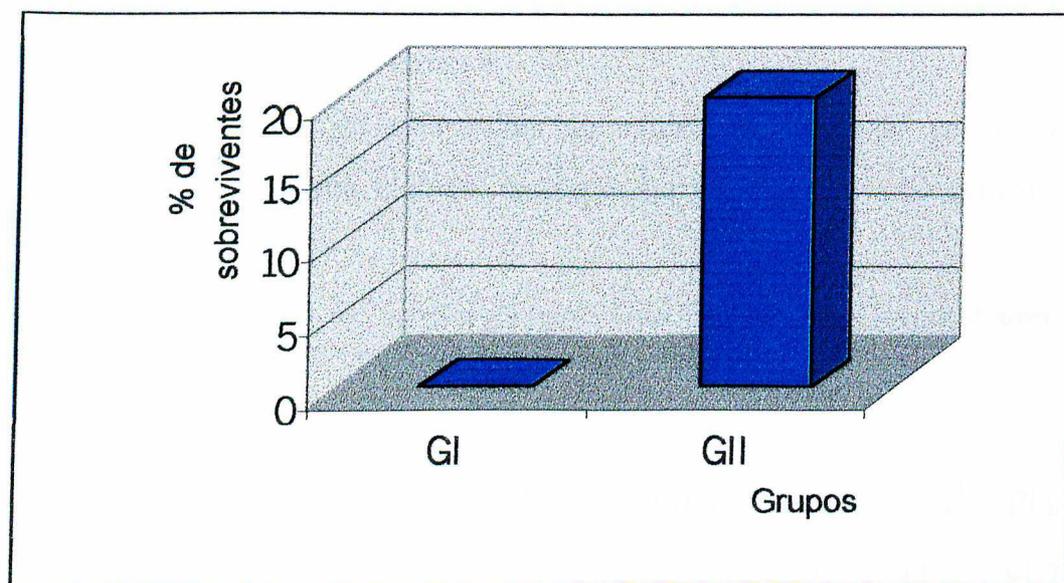


Fig. 04: Porcentagem de animais sobreviventes após pré-tratamento com extrato de *Casearia mariquitensis* e em seguida inoculados com peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

GI – Animais pré – tratados com salina e inoculados via intraperitoneal respectivamente com 3DL₅₀ da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (controle positivo).

GII – Animais pré – tratados com EV (0,2mg/animal/dia) e inoculados via intraperitoneal respectivamente com 3DL₅₀ de PB.

5.3) Determinação da toxicidade do extrato de *Casearia mariquitensis*

5.3.1) via intraperitoneal.

A) Por aplicação de doses consecutivas.

A tabela IV abaixo apresenta os resultados obtidos quando se analisou a toxicidade do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*, após inocular em 5 repetidas doses contendo 0,2 mg de EV/dia em cada animal do grupo I, como descrito em material e métodos (item 4.6 (A))

Podemos observar que esta baixa dose de extrato vegetal não causou maiores alterações hematológicas nos animais testados mesmo após a aplicação da última dose.

Tab. IV: Hemogramas dos animais do grupo I que receberam via intraperitoneal 0,2 mg de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis*/dia, durante 6 dias.

Tempo (horas)	Elementos do sangue*				
	Leucócitos ¹	Hemáceas ²	Hemoglobina ³	Hematócrito ⁴	Plaquetas ⁵
0	8,9±0,42	8,29±0,15	13,3±0,84	44,0± 0,41	907±10
24	8,5±0,28	8,83±0,16	13,0±0,70	46,0± 0,56	876±28
48	8,6±0,20	8,10±0,16	13,1±0,28	42,4± 0,29	826±14
72	7,6±0,28	8,31±0,76	13,6±0,70	44,0± 0,96	910±18
96	7,8±0,42	8,18±0,76	12,8±0,98	40,8± 0,68	816±13
120	7,9±0,50	8,07±0,83	12,9±0,97	39,1± 0,28	813±10

*Médias e desvios padrões referentes à 2 animais.

1 – Contagem expressa em $10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

2 – Contagem expressa em $10^6/\text{mm}^3$ de sangue.

3 – Contagem expressa em g/dl.

4 – Contagem expressa em %.

5 – Contagem expressa em $10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

Para os animais do grupo II que receberam doses de extrato iguais à 1,0mg/animal/dia como os do grupo anterior, estes resultados estão apresentados na tabela V a seguir.

Observamos que os índices analisados sofreram uma redução estatisticamente significativa (teste t) a partir de um determinado dia; conforme os resultados apresentados em cor azul (tabela V). A única exceção foi as plaquetas, que não sofreram alterações quantitativas. Após 120 horas foi realizado hemograma dos 3 animais restantes que tiveram a administração de extrato suspensa e uma reestabilização do sistema hematológico foi mostrada (Tab. V).

Tab. V: Hemogramas de animais inoculados via intraperitoneal com (1,0 mg/animal/dia) de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* durante 6 dias.

Tempo (horas)	Elementos do sangue*				
	Leucócitos ¹	Hemáceas ²	Hemoglobina ³	Hematócrito ⁴	Plaquetas ⁵
0	8,8±0,14	8,05±0,26	13,8±0,42	43,0±0,27	868±13
24	8,0±1,50	7,51±0,11	11,9±0,84	39,1±1,40	788±14
48	5,2±0,77	7,31±0,64	12,0±0,27	41,0±0,80	848±12
72	5,3±0,13	7,27±0,51	10,7±0,84	38,0±0,50	812±20
96	5,8±0,21	7,50±0,21	11,2±0,83	42,0±0,26	804±7
120	5,4±0,13	6,15±0,42	10,6±0,97	33,0±0,20	820±21
240	7,5±0,30	7,72±0,49	12,7±0,17	42,1±0,52	872±15

*Médias e desvios padrões referentes à 2 animais.

1 – Contagem expressa em $10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

2 – Contagem expressa em $10^6/\text{mm}^3$ de sangue.

3 – Contagem expressa em g/dl.

4 – Contagem expressa em %.

5 – Contagem expressa em $10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

➔ Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) (teste t).

B) Por aplicação de uma única dose.

A tabela VI contém os principais sintomas de intoxicação provocados em camundongos pela administração intraperitoneal de doses do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* iguais à 1,5, 3,0 e 6,0 mg respectivamente.

Os grupos que receberam doses iguais a 1,5 mg (50mg/kg de animal) e 3,0 mg (100 mg/kg de animal) não apresentaram nenhum sinal de intoxicação, enquanto aqueles que receberam a dose de 6,0 mg (200mg/kg de animal) demonstraram toxicidade.

Tab. 04: Principais efeitos tóxicos observados em camundongos após receberem uma única dose de extrato de *Casearia mariquitensis* pela via intraperitoneal

Grupos (n=12)	Efeitos tóxicos			
	Piloereção	Perda de apetite	Perda da capacidade motora	Morte (%)
GI	-	-	-	0
GII	-	-	-	0
GIII	+	+	+	25

GI - Animais inoculados via intraperitoneal com 1,5 mg de extrato vegetal.

GII - Animais inoculados via intraperitoneal com 3,0 mg de extrato vegetal.

GIII - Animais inoculados via intraperitoneal com 6,0 mg de extrato vegetal.

- Ausência de efeito tóxico visível.

+ Presença de efeito tóxico.

n = número de camundongos.

5.3.2) Via oral.

A tabela VII abaixo apresenta os resultados obtidos quando camundongos receberam via oral 5 repetidas doses de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* em intervalos de 24 horas cada (2,0mg/animal/dia), conforme descrito em material métodos.

Observamos que ao longo do experimento nenhum índice sofreu variação significativa, mesmo após à última dose de extrato.

Tab. VII: Hemogramas de animais inoculados via oral com 2,0 mg de extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* durante 6 dias (2,0 mg/animal/dia).

Tempo (horas)	Elementos do sangue*				
	Leucócitos ¹	Hemáceas ²	Hemoglobina ³	Hematócrito ⁴	Plaquetas ⁵
0	5,6±0,92	7,39±0,44	13,6±0,14	43,0±0,13	1040±15
24	5,5±0,36	7,08±0,36	12,3±0,06	39,0±0,53	1135±18
48	5,7±0,56	7,72±0,09	12,8±0,13	37,8±0,31	980±14
72	5,1±1,06	7,11±0,21	12,3±0,62	37,9±0,72	1126±16
96	4,5±0,41	7,55±0,14	12,7±0,12	41,0±0,51	1145±19
120	6,6±0,14	7,33±0,29	12,1±0,05	39,1±0,96	1013±10

*Médias e desvios padrões referentes à 2 animais.

1 – Contagem expressa em $10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

2 – Contagem expressa em $10^6/\text{mm}^3$ de sangue.

3 – Contagem expressa em g/dl.

4 – Contagem expressa em %.

5 – Contagem expressa em $10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

6) DISCUSSÕES

Um outro quadro clínico demonstrado em pacientes vítimas de acidentes ofídicos é a rápida instalação de uma anemia (queda numérica de hemáceas, hemoglobina e hematócrito) (GILLISSEN et al., 1994).

Esta anemia pode estar associada com a hemólise ou citotoxicidade provocada pelo envenenamento ofídico, devido à presença das enzimas fosfolipases A₂ (CONDREA et al., 1981), ou devido à ação das proteases que estariam atuando sobre as proteínas de membrana das hemáceas. Com a hemólise, ocorre liberação de hemoglobina para o meio externo e conseqüentemente diminuição do hematócrito; que são índices inter-relacionados. Em conseqüência à liberação da hemoglobina, tem-se menos pigmento para transporte de oxigênio, ocasionando maior dificuldade respiratória para a vítima. Em nossos experimentos, os camundongos após terem recebido uma dose sub-letal de peçonha (0,6DL₅₀) mostravam uma queda acentuada de hemáceas, hemoglobina e hematócrito e bastante dificuldade em respirar (Tab. I e II).

As plaquetas ou trombócitos também são alvos dos envenenamentos ofídicos, sofrendo depleção, principalmente devido ao surgimento de uma coagulação intravascular disseminada (CIVD) (VERRASTRO et al., 1998). Os nossos resultados estão em concordância com o citado anteriormente (Tab. I e II).

Outras toxinas que podem interferir na quantidade de plaquetas são aquelas com potencial pró-coagulante, que estimulam a formação de coágulos, e necessitam diretamente de plaquetas para melhorar sua aderência, induzindo assim a agregação plaquetária.

As hemorraginas também favorecem o consumo de plaquetas, quando rompem vasos capilares e expõem um de seus componentes, o colágeno. Com o rompimento dos vasos, e exposição do colágeno, as plaquetas migram para o local por diapedese e se ligam a ele, dando início à rolha plaquetária (trombo branco) (VERRASTRO et al., 1998).

Como as peçonhas de serpentes possuem enzimas fosfolipases e estas são consideradas precursoras de processos inflamatórios; após um acidente ofídico é

comum observar leucocitose. FARSKY et al. (1997), observaram um aumento significativo ($p < 0,05$) dos leucócitos totais em ratos que receberam injeções contendo 25 μ g da peçonha de *Bothrops jararaca*. ANGULO et al. (1997), também verificaram leucocitose em cavalos 24 horas após a inoculação de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, durante o processo de imunização.

Em nossos experimentos, a toxicidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi ensaiada após aplicação de 0,6 DL₅₀ de VB (via ip) e a tabela I evidencia que as alterações hematológicas significativas foram observadas 6 horas após a administração de peçonha.

Os resultados de inibição da toxicidade da peçonha (Tab. II) realizados a seguir, mostraram que o extrato de *Casearia mariquitensis* na proporção de 1/10 foi bastante efetivo ao neutralizar as ações tóxicas da peçonha. Não foi observado leucocitose nestes experimentos, fato que pode estar relacionado com o tempo para a observação ou com a dose de peçonha aplicada.

A queda anteriormente citada (Tab. II) de hemáceas, hemoglobina e hematócrito quando se administrava apenas peçonha bruta, praticamente desapareceu ao combinar peçonha mais extrato vegetal na proporção de 1/10, (Tab. II) seguidos de administração via intraperitoneal. Esta inibição dos efeitos tóxicos da peçonha não foi observada com relação às plaquetas. Pelo teste t para amostras pequenas, a proteção de hemáceas, hemoglobina e hematócrito pelo extrato de *Casearia mariquitensis* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Já o pré-tratamento com o extrato vegetal antes do envenenamento não inibiu os efeitos tóxicos da peçonha sobre os elementos figurados do sangue (Tab. III), fato este que pode estar relacionado com a falta de contato direto entre peçonha-extrato.

Houve aumento quantitativo de hemáceas, hemoglobina e hematócrito, os leucócitos, não se alteraram; já as plaquetas sofreram uma diminuição brusca.

Apesar do aumento nos valores absolutos de hemáceas, hemoglobina e hematócrito, a significância estatística ($p < 0,05$) não foi observada.

Para conseguirmos resultados estatisticamente significativos talvez fosse necessário trabalhar com frações específicas purificadas do extrato.

Quando se faz uma análise do resultado de hemogramas completos de animais envenenados com peçonha, pode-se imaginar que duas classes principais de toxinas estariam agindo sobre o equilíbrio hemostático do animal; as fosfolipases A₂ (ação citotóxica) e as proteases (proteólise).

Várias plantas estudadas até agora se mostraram eficientes na inibição da letalidade das peçonhas, como descrito na introdução.

O extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* quando testado quanto à sua capacidade de inibir a letalidade da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* se mostrou muito eficiente ao conseguir neutralizar 3 DL₅₀ desta peçonha. Foi observado um aumento significativo no tempo de sobrevivência ($p < 0.05$) (teste t) quando esta peçonha era misturada com o extrato de *Casearia mariquitensis* e em seguida administrada aos camundongos. Ao longo do experimento, 40% dos animais que receberam peçonha mais extrato sobreviveram por um período de 24 horas de observação, em relação ao controle positivo (apenas peçonha) que apresentou 100% de óbito. Em relação ainda ao mesmo experimento, quando se analisou o tempo médio de sobrevivência dos animais de cada grupo, nota-se que os animais que receberam peçonha e extrato misturados, viveram praticamente 4 vezes mais que aqueles inoculados apenas com peçonha. Portanto, de algum modo o extrato vegetal interage com a peçonha e diminui sua toxicidade (Fig. 01).

Quando camundongos foram administrados via oral com doses crescentes e diárias do extrato de *Casearia mariquitensis* e em seguida inoculados com 3 DL₅₀ de peçonha não foi observada inibição da letalidade (Fig.02). O tempo de sobrevivência dos animais de todos os grupos experimentais foram praticamente iguais. Os experimentos mostraram que o extrato de *Casearia mariquitensis* deve conter componentes com elevado potencial para neutralizar a letalidade das peçonhas de serpentes botrópicas.

Nossos resultados encontram-se em oposição aos de PEREIRA et al.(1991), que mostraram que o pré-tratamento via oral de ratos com extratos de *Casearia*

sylvestris e *Apoleia leiocarpa* conferiram 100% de proteção contra peçonha de *Bothrops jararaca*.

Estes resultados antagônicos podem estar associados ao modo de preparo do extrato, assim como a quantidade utilizada ou até mesmo a época da coleta das folhas utilizadas no preparo do extrato.

Quando a via de administração das mesmas doses do extrato vegetal de *Casearia mariquitensis* passou a ser intraperitoneal observamos uma inibição da letalidade significativa apenas para o grupo que recebeu a menor dose (0,2mg/animal/dia) enquanto aqueles grupos que receberam doses maiores tiveram óbito primeiro que o controle positivo (Fig. 03); sendo que 20% destes animais administrados com a dose igual a 0.2 mg/animal/dia sobreviveram (Fig. 04).

A toxicidade do extrato de *Casearia mariquitensis* também foi analisada, utilizando-se diferentes estratégias experimentais:

A) Após administração via ip. de 5 doses de EV, com intervalos regulares de 24 horas (Tabelas IV e V). Foi observado que somente a maior dose diária (1mg/animal/dia) causou diminuição de hemáceas, hemoglobina e hematócrito.

Provavelmente esta queda observada nestes índices está associada com hemólise, que pode ter sido provocada por algum constituinte hemolítico do extrato.

A queda dos elementos figurados do sangue desapareceu quando os animais não mais receberam extrato vegetal (Tab. V).

Por exemplo as saponinas apresentam características marcantes como: formar espumas quando em meio aquoso, tornarem as hemáceas hemolisadas se estiverem em altas concentrações sanguíneas e quando administradas por oral sua absorção torna-se reduzida, diminuindo assim as possibilidades de intoxicação (MARTINS et al., 1998). Outros indícios da presença de saponinas no extrato de *Casearia mariquitensis* é que este em solução aquosa forma espuma.

B) Após administração (via ip.) de uma única dose de EV. Os resultados obtidos (Tab. VI) mostraram que somente a maior dose (6,0 mg/animal) apresentaram toxicidade significativa com 25% de morte para os animais do grupo teste.

Altas doses diárias de extrato via intraperitoneal podem apresentar efeitos tóxicos e cumulativos principalmente no fígado (toxicidade crônica), dificultando sua eliminação, que obrigatoriamente teria que ser realizada por biotransformação, processo de conversão de uma droga em metabólitos inativos que posteriormente serão eliminados.

C) Após administração via oral de 5 doses de EV com intervalos regulares de 24 horas. Cada dose continha 2.0 mg de EV e mesmo depois da última administração não foi observado nenhuma alteração nos elementos figurados do sangue dos animais experimentais (Tab. VII).

Quando uma droga (extrato) é administrada via intraperitoneal, imediatamente ocorre sua absorção e aumento de sua concentração na circulação sistêmica, posteriormente acontece sua distribuição para os tecidos alvo; e a quantidade de droga inoculada em excesso será eliminada após biotransformação.

A toxicidade do extrato de *Casearia mariquitensis* administrado em uma única dose só foi observada para a maior dose testada, 6 mg/animal (200mg/kg de animal), indicando que este EV é muito pouco tóxico, já que doses acima de 5 mg/kg de animal são consideradas de baixa toxicidade (BRITO, 1994).

Quando o extrato de *Casearia mariquitensis* foi administrado em pequenas doses, mostrou efeito terapêutico; mas se usado em altas doses, é capaz de provocar efeitos colaterais.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGULO, Y.; CHAVES, E.; ALAPE, A. ; RUCAVADO, A. GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. (1997). Isolation and characterization of a myotoxic Phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schegelii* from Costa Rica. **Arch. Biochem. Biophys.** **399**, 260-266.
- ANGULO, Y.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. (1997). Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. **Toxicon** **36**, 81-90.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; AMARAL, C. F. S.; HERING, S. E. (1990). Rattlesnake bites. Clinical features and complementary tests. **Mem. Inst. Butantan** **52**, 27-30.
- BORGES, M. H.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1998). Ação antipeçonha do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*. **Biotec. Ciên. Desenv.** **4**, 28-30.
- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacouetiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol.** **127**, 21-30.
- BRITO, A. R. M. S. (1996). Plantas medicinais: Arte e Ciência. **Farmacologia de plantas medicinais 1ª ed.**, 87-97.

BRITO, A. S. (1994). **Manual de ensaios toxicológicos "in vivo"**. Campinas: editora Unicamp 121p.

CONDREA, E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. (1981). Lack correlation between the anticoagulant activity and phospholipase hydrolysis by snake venom phospholipase A₂. **Thromb. Hemostasis** 45, 82-89.

COSTA, P.I.; GARCIA DE LIMA, E.; LAURE, C. J. (1989). Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.** 39, 359-373.

FARSKY, S. H. P.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURRY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. (1997). Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon** 35, 185-193.

FURTADO, M. F. D.; COLLETO, G. M. D. D.; SILVA, W. D. (1991). Controle de qualidade dos venenos animais e dos componentes antivenenos. **Mem. Inst. Butantan** 53, 149-159.

GILLISSEN, A.; DAVID, R.; THEAKSTON, G.; BARTH, J.; MAY, B.; KRIEG, M.; WARRELL, A. (1994). Neurotoxicity, haemostatic disturbances and haemolytic anaemia after a bite by Tunisian saw-sacled or carpet viper (*Echis "Pyramidum" complex*): Failure of antivenom treatment. **Toxicon** 32, 937-944.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1987). Fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu*: caracterização química parcial de componentes ativos e estudo dos efeitos farmacológicos e anatomopatológico da Bothropstoxina. **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** 132 p. (tese de doutorado).

- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. (1964). A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.** **9**, 401.
- KELEN, E. M. A.; ROSENFELD, G.; NUDEL, F. (1960). Hemolytic activity of animals venoms: Variation in relation to eritrocyte species. **Mem. Inst. Butantan** **30**, 133-142.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. (1998). Plantas medicinais. v.3, 220p..
- MARTZ, W. (1992). Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon** **30**, 1131-1142.
- MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, S. (1994). Inhibition of the myotoxic and haemorrhagic activity of crotalidae venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** **32**, 595-603.
- MOURA, R. A.; WADA, S. C.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. (1994). Técnicas de laboratório. 3ª ed., 551p..
- PACHECO, S.; SILVA, N. F.; FRANCO, P.F. (1995) Atividade antibotrópica do chá de quiabo (*Hibiscus esculentus*). **Rev. Bras. Farm.** **76**, 61-62.
- RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. (2000). Structural and functional characterization of neuwiedase, a non hemorrhagic fibri(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** **381**, 213-224.

ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A.; NUDEL, F. (1960). Hemolytic activity of animal venom: Classification in different types and activities. **Mem. Inst. Butantan** 30, 103-116.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; NETO, S. W. (1998). Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. 1ª ed., 303p..

FU-00013186-9