

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Neutralização de atividades biológicas das peçonhas de serpentes botrópicas
pelo extrato aquoso e compostos isolados de *Schizolobium parahyba*
(FABACEAE)**

Aluno: Luis Henrique Ferreira do Vale

Orientador: Maria Inês Homsí Brandeburgo

UBERLÂNDIA-MG
2007

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Neutralização de atividades biológicas das peçonhas de serpentes botrópicas
pelo extrato aquoso e compostos isolados de *Schizolobium parahyba*
(FABACEAE)**

Aluno: Luis Henrique Ferreira do Vale

Orientador: Maria Inês Homsí Brandeburgo

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA-MG
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V149n Vale, Luis Henrique Ferreira do, 1981-

Neutralização de atividades biológicas das peçonhas de serpentes botrópicas pelo extrato aquoso e compostos isolados de *Schizolobium parahyba* / Luis Henrique Ferreira do Vale. - 2007.

57 f. : il.

Orientadora: Maria Inês Homsí Brandeburgo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Plantas medicinais - Teses.

I. Brandeburgo, Maria Inês Homsí. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.99:598.126

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Neutralização de atividades biológicas das peçonhas de serpentes botrópicas
pelo extrato aquoso e compostos isolados de *Schizolobium parahyba*
(FABACEAE)

Aluno: Luis Henrique Ferreira do Vale

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____(Orientador)

Examinadores:

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)

*E nossa história não estará pelo avesso assim sem final feliz
Teremos coisas bonitas pra contar
E até lá vamos viver
Temos muito ainda por fazer
Não olhe pra trás
Apenas começamos
O mundo começa agora
Apenas começamos*

(Legião Urbana em Metal Contra as Nuvens)

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha família a meus amigos e ao Laboratório de
Química de Proteínas e Produtos Naturais-INGEB-UFU*

Agradecimentos

- *A professora Maria Inês Homsí Brandeburgo pela orientação e ajuda em todos os momentos;*
- *As professoras Veridiana de Melo R. Ávila e Amélia Hamaguchi por me ajudarem quando sempre precisei;*
- *Aos professores Paulo Sérgio Pereira e Suzelei de Castro França da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto pela receptividade, empenho e ajuda em grande parte de meu trabalho;*
- *A professora e irmã Elaine Ferreira do Vale Borges e ao professor e cunhado Ben-Hur Viana Borges pelas correções dos textos em inglês e também pelos incentivos em minha caminhada;*
- *A CAPES e ao Instituto de Genética e Bioquímica;*
- *E aos amigos do laboratório.*

Sumário

Capítulo I.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Introdução.....	4
Materiais e métodos.....	5
Venenos e animais.....	5
Preparação do material vegetal:	
Preparação do extrato aquoso.....	6
Filtração do extrato aquoso em Sephadex LH-20.....	6
Estudos de inibição.....	6
Atividade hemorrágica.....	7
Letalidade.....	7
Incoagulabilidade sanguínea.....	7
Atividade fosfolipásica A ₂	8
Atividade coagulante sobre o plasma bovino.....	8
Atividade fibrinogenolítica.....	8
Interação entre o extrato aquoso de <i>S. parahyba</i> e proteínas.....	9
Análises estatísticas.....	9
Resultados.....	9
Inibição dos efeitos biológicos da peçonha.....	9
Inibição dos efeitos enzimáticos da peçonha.....	10
Interação entre Sp e proteínas.....	10
Discussão e conclusões.....	15
Referências bibliográficas.....	18

Capítulo II.....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Materiais e métodos.....	30
Preparação do veneno.....	30
Animais.....	30
Preparação do extrato da planta.....	31
Purificação e identificação dos compostos ativos.....	31
Testes de neutralização.....	31
Atividade Hemorrágica.....	32
Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio.....	32
Análises estatísticas.....	32
Resultados.....	33
Purificação e identificação dos compostos ativos.....	33
Inibição da atividade hemorrágica da peçonha bruta.....	33
Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha.....	34
Discussão e conclusões.....	39
Referências bibliográficas.....	43
Anexo.....	52

Lista de figuras do capítulo I

- Figura. 1.** Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e de *Bothrops alternatus* pelo extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*.....**12**
- Figura. 2.** Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pela fração F1 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*.....**13**
- Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino resultante da ação da peçonha de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* combinada com a fração F3 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*.....**14**
- Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (a 12,5% com agentes desnaturantes) do ensaio de interação extrato aquoso de *S. parahyba* (Sp)/proteínas.....**14**

Lista de tabelas do capítulo I

- Tabela. 1.** Inibição da letalidade, incoagulabilidade sanguínea e atividade hemorrágica das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pelo extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*.....**10**
- Tabela. 2.** Inibição da atividade PLA₂ das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pelo extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*.....**11**

Tabela 3 Inibição da atividade coagulante das peçonhas brutas de <i>Bothrops alternatus</i> e <i>Bothrops moojeni</i> pelo extrato aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	11
--	-----------

Lista de figuras do capítulo II

Figura. 01. Fluxograma de isolamento da isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina do extrato aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>	35
Figura. 02. Purificação da isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina do extrato aquoso de <i>S. parahyba</i>	36
Figura. 03. Estrutura molecular dos flavonóis e catecóis isolados do extrato aquoso das folhas de <i>Schizolobium parahyba</i>	38
Figura. 04. Inibição da atividade hemorrágica da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> por compostos ativos isolados do extrato aquoso de <i>Shizolobium parahyba</i>	38
Figura. 05. Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> por compostos ativos isolados do extrato aquoso de <i>Shizolobium parahyba</i>	39

Lista de tabelas do capítulo II

Tabela 01. Dados espectrais de RMN do ¹ H e ¹³ C de isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina.....	37
--	-----------

Lista de abreviaturas

Sp: Extrato aquosos de *Schizolobium parahyba*

CV: Peçonha bruta

Bal: Peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

Apresentação

O uso de plantas medicinais pelos seres humanos para tratamento de suas enfermidades é fato desde o início da domesticação de animais e cultivares. Pode se pensar que até mesmo muito antes do desenvolvimento de nossa racionalidade já se tinha uma estreita relação entre homens e plantas exatamente pelo fato de nunca termos sido estritamente carnívoros. Até mesmo animais predadores como cães selvagens e lobos muitas vezes ingerem gramíneas e folhas de determinadas ervas numa tentativa instintiva de controle de parasitas internos. Na natureza temos uma infinidade de relações como essas evidenciando a importância do reino vegetal para todos os animais, não só em nível alimentar, mas também medicinal.

Muitos dos compostos medicinais que estas plantas possuem geralmente surgem da necessidade destas de se protegerem da ação do meio ambiente como raios solares e ação de patógenos ou para atração de polinizadores e até mesmo da relação de uma planta com outra, num evento conhecido como alelopatia. Algumas dessas substâncias, conhecidas como metabólitos secundários, como os polifenóis, em animais desempenham muitos efeitos benéficos como sequestro de radicais livres, ação anticarcinogênica, antimicrobiana, vaso protetora e estimulante; por outro lado, outros compostos como alguns alcalóides podem ser tóxicos ou alucinógenos. Sócrates, por exemplo, grande filósofo da Grécia antiga foi executado pela ingestão de um alcalóide chamado coniina; já os índios brasileiros do Amazonas utilizam o extrato do curare que contém o alcalóide tubocurarina, extremamente letal, nas pontas das flechas para a caça e para a guerra.

O estudo dessas plantas e da relação que grupos étnicos ou sociais mantêm com elas e lhes dá utilidade é designado pela sociedade científica atual como Etnobotânica. Quando aplicada ao estudo das plantas medicinais trabalha em estreita parceria com a Etnofarmacologia, que consiste na exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados por determinado grupo humano. Dessa maneira iniciamos estudos bioquímicos após identificarmos que na região de Araguari-MG a planta

Schizolobium parahyba, já tinha sido muitas vezes utilizada por camponeses para tratamento de suas criações quando estas eram acometidas por ofidismo.

Parte destes estudos resultaram nesta dissertação de mestrado que é composta de dois capítulos. No primeiro capítulo fizemos testes preliminares do extrato bruto para observar seu potencial contra algumas atividades de peçonhas de duas serpentes botrópicas, analisamos seu efeito de precipitação de proteínas e fizemos um fracionamento inicial no qual conseguimos uma fração que inibe uma atividade enzimática de serpentes botrópicas e uma outra que precipita proteínas. Grande parte do segundo capítulo foi desenvolvido na Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) sob orientação do professor Paulo Sérgio Pereira, no qual partimos para uma purificação mais refinada utilizando técnicas avançadas de fracionamento e espectroscopia que resultou no isolamento e identificação molecular de quatro substâncias que demonstraram especificidade de inibição de algumas atividades da peçonha.

PALAVRAS CHAVE: Extrato vegetal, *Schizolobium parahyba*, inibição, peçonha

Capítulo I

Inibição de algumas atividades tóxicas dos venenos de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pelo extrato aquoso e frações de *Schizolobium parahyba* (FABACEAE)

Capítulo escrito de acordo com as normas da revista Journal Ethnopharmacology
(www.elsevier.com/locate/jethpharm)

Resumo:

O extrato aquoso preparado das folhas de *Schizolobium parahyba* (Sp), uma planta nativa da Mata Atlântica (Brasil), foi testado para avaliar sua habilidade de inibir algumas atividades biológicas e enzimáticas induzidas pelas peçonhas brutas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*. Cromatografia de Sp em coluna de Sephadex LH 20 resultou em 3 frações: F₁ (fração metanólica); F₂ (fração metanol : água, 1:1 v/v) e F₃ (fração aquosa). Estas frações foram analisadas quanto a capacidade de inibir a atividade Fibrinogenolítica das peçonhas. Sp inibiu em 100% a letalidade, a incoagulabilidade sanguínea, a atividade hemorrágica e hemolítica indireta na proporção de 1:10 (peçonha/extrato, m/m) e atividade coagulante na proporção de 1:5 (peçonha/extrato, m/m) induzidas pelas peçonhas. A atividade fibrinogenolítica das peçonhas também foi neutralizada por Sp na proporção de 1:10, resultando em proteção total da cadeia B β e parcial da A α do fibrinogênio. No entanto, proporções maiores de peçonha/extrato mostraram desaparecimento de todas as cadeias do fibrinogênio numa possível precipitação causada por Sp. Os testes de interação extrato/proteínas demonstraram que em determinadas proporções de extrato/proteínas Sp precipita proteínas inespecificamente, sugerindo a presença de taninos, os quais muito provavelmente são os responsáveis pelo excelente efeito inibidor das atividades ofídicas analisadas. Assim, com o intuito de separar estes componentes que mascaram os resultados obtidos, foi realizado o fracionamento de Sp. F₁ inibiu em 100% a atividade fibrinogenolítica das peçonhas e não apresentou efeito de precipitação de proteínas; F₂ demonstrou inibição parcial desta atividade das peçonhas e F₃ não inibiu a proteólise do fibrinogênio, mas apresentou forte ação precipitante de proteínas. Concluímos, assim que Sp, além de taninos, também contém outros compostos e que estes podem apresentar ação específica de inibição de toxinas de peçonhas de serpentes.

PALAVRAS CHAVE: Peçonhas, inibição, produtos naturais.

Abstract

The aqueous extract prepared from *Schizolobium parahyba* (Sp) leaves, a native plant from Mata Atlantica forest (Brazil), was tested to analyze its ability to inhibit some biological and enzymatic activities induced by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms. Sp chromatography in Sephadex LH 20 resulted in 3 fractions: F₁ (methanolic fraction); F₂ (methanol:water fraction, 1:1 v/v); and F₃ (aqueous fraction). These fractions were analyzed in terms of its capacity of inhibit the venoms fibrinogenolytic activity. Sp inhibited 100% of lethality, blood incoagulability, hemorrhagic and indirect hemolytic activities for a 1:10 ratio (venom/extract, w/w), and coagulant activity in a 1:5 ratio (venom/extract, w/w) induced by venoms. Venoms fibrinogenolytic activity were also neutralized by Sp in a 1:10 ratio, resulting in total protection of B β chain and partial protection for the fibrinogen A α chain. However, larger ratios of extract/proteins have caused a complete vanishing of all fibrinogen chains possibly caused by Sp precipitation. Interaction tests have demonstrated that for certain extract/proteins ratios Sp precipitates proteins non-specifically suggesting the presence of tannins, which are very likely responsible for the excellent inhibiting effects of the analyzed ophidian activities. Therefore, the fractioning of Sp was carried out aiming at separating these compounds that mask the obtained results. F₁ inhibited 100% the venom fibrinogenolytic activity without presenting protein precipitation effect; F₂ demonstrated only partial inhibition of these venoms activities. Finally, F₃ did not inhibit fibrinogen proteolysis, but presented strong protein precipitating action. We conclude that Sp, together with tannins, also contains other compounds which can present specific toxin inhibition action of snake venoms.

1. Introdução

Acidentes ofídicos constituem um relevante problema de saúde pública em muitas regiões do mundo, particularmente em países tropicais.(Chipaux, 1998). No Brasil, as serpentes da família Viperidae gênero *Bothrops*, são responsáveis por quase 90% dos acidentes ofídicos registrados. O envenenamento causado por estas serpentes é caracterizado por efeitos locais onde se destaca um proeminente dano tecidual e por efeitos sistêmicos que causam principalmente distúrbios na hemostasia, com variações nos parâmetros hematológicos e alterações na função plaquetária, na coagulação sanguínea e no sistema fibrinogenolítico. (Rosenfeld, 1971; Kamiguti & Cardoso, 1989).

As enzimas proteolíticas destas peçonhas são os principais constituintes responsáveis por estes efeitos e podem ser divididas em duas grandes classes estruturais: as metaloproteases (**S**nake**V**enoms **M**etalo**P**eptidases) (Bjarnasson e Fox, 1994) e as serinoproteases (**S**nake **V**enoms **S**erine**P**eptidases) (Meier & Stocker, 1995) ou em uma grande classe funcional: as fibrinogenases, segundo a especificidade de hidrólise pelas cadeias do fibrinogênio (Markland, 1998).

A medicina popular brasileira é muito rica na descrição e utilização de plantas para combater os vários efeitos provocados pelo envenenamento por serpentes peçonhentas. Na região amazônica, por exemplo, nativos utilizam o macerado da casca de *Pentaclethra macroloba* aplicado em forma de cataplasma no local da picada (da Silva, et al., 2005). Algumas destas plantas relatadas como antiofídicas na medicina folclórica tiveram a comprovação de seus efeitos farmacológicos reais após estudos etnofarmacológicos (Mors et al., 1991, 2000; Martz, 1992; Alam et al., 1994; Borges, et al, 2000, 2001; Asuzu & Harvey, 2003; Izidoro et al, 2003).

Camponeses do interior do país usam extratos da planta *Schizolobium parahyba* para tratar seus animais, quando estes são picados por serpentes. *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) é uma árvore nativa da Mata Atlântica conhecida popularmente como Guapuruvu ou Ficheira (Standley & Steyermark, 1946; Schery, 1951; Lewis, 1987); possui grande importância econômica devido a

sua madeira ser utilizada para fabricações de vários utensílios desde portas a objetos para aeromodelismo (Rizzini, 1978) e também utilizada como árvore de reflorestamento de áreas degradadas graças ao seu rápido crescimento (Lorenzi, 1992; Engel & Parrotta, 2001).

Este trabalho teve como objetivo os estudos de inibição do extrato bruto de *S. parahyba* frente a algumas atividades enzimáticas e biológicas de peçonhas de serpentes botrópicas. Analisamos também seu potencial precipitante de proteínas e realizamos um fracionamento inicial pelo qual conseguimos uma fração que inibe a proteólise do fibrinogênio bovino causada pela ação enzimática das peçonhas e uma outra que precipita proteínas.

2. Materiais e métodos

2.1. Venenos e animais

Os venenos de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* utilizados neste trabalho e os camundongos machos Swiss foram fornecidos pela Pentapharm do Brasil. Os venenos brutos liofilizados (CV) foram pesados, dissolvidos em tampão fosfato de sódio pH 7.2 (PBS) e centrifugados a 20,000×g por 10 minutos a – 4°C. Os sobrenadantes foram coletados, dosados pelo método do microbiureto (Itzhaki & Gill, 1964) e imediatamente utilizados nos experimentos. Os camundongos foram mantidos em condições padrão de luz (ciclo de 12h luz/12h escuro em temperatura ambiente), água, comida *ad libitum* e tiveram um tempo de sete dias para adaptação ao ambiente antes dos experimentos.

2.2. Preparação do material vegetal.

2.2.1. Preparação do extrato aquoso:

Folhas (30g) de *Schizolobium parahyba* coletadas no município de Uberlândia (Minas Gerais, Brasil) foram lavadas e trituradas com 1L de água desionizada em um liquidificador comum por 5 minutos e filtrado. O filtrado foi centrifugado a 30.000×g por 20 minutos e o sobrenadante liofilizado e armazenado a -20°C. No momento do experimento o extrato (Sp) era pesado e suspenso em PBS. A excicata foi identificada pelo Dr Jimi Naoki Nakajima e está depositado no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia sob o número 36818.

2.2.2. Filtração do extrato aquoso em Sephadex LH-20

O extrato Sp foi fracionado em uma coluna cromatográfica utilizando resina Sephadex LH-20. Foram ressuspensos 0,1 g do extrato em 3,0 ml de metanol (MeOH) e adicionados à coluna previamente equilibrada com MEOH. Foram feitas 3 trocas de eluentes: MeOH; MEOH/H₂O 1:1 (v/v) e H₂O, respectivamente. Frações foram coletadas em temperatura ambiente; rotoevaporadas, posteriormente liofilizadas e armazenadas a -20°C. No momento dos experimentos eram pesadas e ressuspensas em PBS.

2.4. Estudos de inibição

Para inibição das atividades das peçonhas o extrato de Sp era misturado com os CVs em diferentes razões antes dos testes (peçonha/extrato, m/m). Para a inibição da atividade fosfolipásica A2 e atividades biológicas foram utilizadas duas razões: 1:5 e 1:10 (peçonha/extrato, m/m). Na atividade fibrinogenolítica foram utilizadas as razões de 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, (peçonha/extrato, m/m) e para a atividade coagulante as razões de 1:1 e 1:5 (m/m).

2.4.1. Atividade hemorrágica

A dose mínima hemorrágica (DMH) foi calculada para os CVs segundo Nikai et al., (1984). A atividade foi avaliada por injeções intradérmicas dorsais de amostras contendo 2 DMH em camundongos machos Swiss (n = 6, 18-22 g) que eram sacrificados após 3 horas, e medido o diâmetro dos halos hemorrágicos locais na face interna da pele. A atividade hemorrágica foi expressa pela média dos halos hemorrágicos para cada grupo de animais; $\pm$ Desvio padrão (S.D.).

2.4.2. Letalidade

Doses que causam 50% de letalidade (LD_{50}) em camundongos machos Swiss (18-22 g) foram determinadas para os CVs. Para os testes de inibição, grupos de 10 camundongos foram injetados via intraperitonal com doses equivalentes a 3 DL_{50} . A inibição da letalidade foi medida por meio da média de tempo de sobrevivência dos animais de cada grupo até 48 horas após as injeções ($\pm$ S.D.).

2.4.3. Incoagulabilidade sanguínea

Amostras contendo 0,6 DL_{50} dos CVs foram aplicadas pela via intraperitonal em camundongos machos Swiss (n=10, 18-22 g). Após 6 horas os animais foram sacrificados, o sangue coletado por punção cardíaca na ausência de anticoagulante e depositado em tubo de ensaio de vidro. A medida da atividade foi avaliada pela média dos tempos de coagulação do sangue para cada grupo ($\pm$ S.D.) até um tempo máximo de 8 minutos para cada ensaio.

2.4.4. Atividade fosfolipásica A₂

A atividade hemolítica indireta foi testada em gel de agarose contendo clara de ovo e eritrócitos como substrato e a dose mínima hemolítica indireta (DMHi) foi calculada segundo Gutiérrez et al., (1997) e determinada como uma medida da atividade fosfolipase A₂ e definida como a quantidade de proteínas que produz um halo mínimo de 10 mm. Para este teste foram utilizadas 3 DMHi. A atividade enzimática foi expressa como porcentagem de inibição; 100% de inibição corresponde à ausência do halo hemolítico. Cada ensaio foi expresso pela média $\pm$ S.D. (n = 6).

2.4.5. Atividade coagulante sobre o plasma bovino

A dose mínima coagulante (DMC) foi calculada de acordo com Assakura et al., (1992). Foram utilizadas para os testes de inibição 2 DMC. Controle PBS, CVs, Sp, CaCl₂ e SP+ CaCl₂ foram usados. A atividade coagulante foi expressa pelo tempo médio de coagulação em segundos, de 100 μ l de plasma bovino previamente incubados a 37°C, induzida pelas peçonhas na presença e ausência de Sp utilizando aparelho coagulômetro Quick Timer (DRAKE LTDA) que determina o tempo de coagulação de uma amostra (150 μ l), até um tempo máximo de 120 s. O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi medido em segundos, sendo que a inibição da atividade foi observada de acordo com o aumento médio ($\pm$ S.D., n = 6) do tempo de coagulação em relação aos controles CVs .

2.4.6. Atividade fibrinogenolítica

Segundo a metodologia de Edgar & Prentice, (1973); soluções de 50 μ l de fibrinogênio (1,5 mg/ml de PBS) foram incubadas com 5 μ g de CV de *B. alternatus* a 37°C por duas horas. A reação foi interrompida após adição de 25 μ l de tampão Tris-HCl 0.5 M, pH 6.5 contendo 2% de SDS (w/v), 10% de β -mercaptoetanol (v/v) e

0.05% de azul de Bromofenol (w/v). Em seguida as amostras foram analisadas em eletroforese (PAGE SDS), segundo Laemmli (1970).

2.5. Interação entre Sp e proteínas

Para verificar o efeito de interação Sp/proteínas foram realizados testes com: a) fibrinogênio bovino; b) plasma bovino e c) CV de *B. moojeni*; misturados com concentrações crescentes de Sp especificadas em cada ensaio. O efeito do aumento da concentração de CV numa concentração fixa de Sp também foi realizado. Após a mistura cada amostra foi analisada em PAGE-SDS como descrito no item anterior.

2.6. Análises estatísticas

Os dados são representados como valores de média e desvio padrão (S.D.). Para a análise de significância estatística de diferença entre os grupos os dados foram submetidos ao teste T de student com valores de $p < 0.05$ considerados significantes.

3. Resultados

3.1. Inibição dos efeitos biológicos das peçonhas.

A Tabela 1 apresenta os valores de inibição da letalidade, incoagulabilidade sanguínea e hemorragia induzidas pelos CV de *B. alternatus* e *B. moojeni*. Os valores de LD₅₀ e DMH das peçonhas foram respectivamente: *Bothrops moojeni* (LD₅₀ = 6.4 mg/kg⁻¹, DMH = 4,67 µg;) e *Bothrops alternatus* (LD₅₀ = 7.1 mg/kg⁻¹, DMH = 7,44 µg). 3LD₅₀ do CV de *B. alternatus* causou 100% de letalidade por volta dos 48 minutos após a injeção, e para *B. moojeni* por volta de 58 min. Esse tempo médio de sobrevivência dos animais foi significativamente aumentado quando os venenos foram misturados com Sp na proporção de 1:5; sendo que 70% dos animais nos testes com

B. alternatus, e 80% com *B. moojeni*, sobreviveram após as 48h de observação. As inibições da incoagulabilidade sanguínea e hemorragia também foram significativas já na proporção de 1:5 (CV/Sp, m/m). Sp inibiu 100% das três atividades na proporção de 1:10 (CV/Sp, m/m).

Tabela. 1. Inibição da letalidade, incoagulabilidade sanguínea e atividade hemorrágica das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pelo extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*

Testes	Atividades dos venenos								
	Letalidade			Atividade de incoagulabilidade sanguínea			Atividade hemorrágica		
	Tempo médio de sobrevivência (n= 10)			Tempo médio de coagulação (n = 10)			Halo hemorrágico médio (cm) (n = 6)		
	Sem Sp	1:5 Sp (m/m)	1:10 Sp (m/m)	Sem Sp	1:5 Sp (m/m)	1:10 Sp (m/m)	Sem Sp	1:5 Sp (m/m)	1:10 Sp (m/m)
<i>B. alternatus</i>	48,3min ^a	38,3h ^{b*}	>48h ^{d*}	>8min	95,0s ± 2,1*	43,0s ± 2,6*	2,1cm ± 0,1	0,45cm ± 0,07*	0,00*
<i>B. moojeni</i>	58,9min ^a	41,3h ^{c*}	>48h ^{d*}	>8min	92,0s ± 1,8*	42,8s ± 1,9*	1,9cm ± 0,03	0,32cm ± 0,02*	0,00*
Sp	---	>48h ^{d*}	>48h ^{d*}	---	41,6s ± 2,0*	40,9s ± 2,0*	---	0,00*	0,00*
PBS	>48h ^{d*}	---	---	41.5s ± 2.5*	---	---	0.00*	---	---

^a 100% dos animais morreram ; ^b 70% dos animais sobreviveram; ^c 80% dos animais sobreviveram; ^d 100% dos animais sobreviveram.

Cada experimento é representado pela média ± S. D.

*Diferença estatística em relação ao controle positivo (p<0,05)

3.2. Inibição dos efeitos enzimáticos.

A inibição da atividade fosfolipásica indireta dos CVs está apresentada na tabela 2. A DMHi apresentou um valor aproximado de 5 µg para ambos os CV. A atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas foi totalmente inibida pelo Sp na proporção 1:10 CV/Sp (m/m), sendo que na proporção de 1:5 apresentou inibições acima de 70%.

A Tabela 3 mostra o efeito de Sp sobre a atividade coagulante dos CV. O valor da DMC foi de 10 µg para ambos os venenos. Sp inibiu 100% desta atividade nas

peçonhas na proporção de 1:5 (CV/Sp, m/m) quando se utilizou 2 DMCs (10 μ g) de cada peçonha. Sp não coagulou o plasma sanguíneo, e não alterou o tempo de coagulação sanguínea induzido por CaCl₂ (Tab. 3).

Tabela. 2. Inibição da atividade PLA₂ das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pelo extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*.

Testes	Halo PLA ₂ médio (cm)		
	Sem Sp	1:5 Sp (m/m)	1:10 Sp (m/m)
<i>B.alternatus</i>	3,07cm $\pm$ 0.02	0,95cm $\pm$ 0.03*	0,00*
<i>B. moojeni</i>	2,98cm $\pm$ 0.03	0,68cm $\pm$ 0.03*	0,00*
Sp	---	0,00*	0,00*
PBS	0,00*	---	---

Cada experimento é representado pela média $\pm$ S. D (n = 6)

*Diferença estatística em relação aos controles CVs (p<0,05)

Tabela. 3. Inibição da atividade coagulante das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* pelo extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*

Testes	Atividade coagulante (s)			
	Sem Sp	1:1 Sp (m/m)	1:5 Sp (m/m)	0,5 mg Sp
<i>B.alternatus</i>	37,4s $\pm$ 0,3	47,5s $\pm$ 0,3	119,1s $\pm$ 0,4*	---
<i>B. moojeni</i>	40,0s $\pm$ 0,1	51,5s $\pm$ 0,3	>120s*	---
PBS + CaCl ₂ 0,5M	68,1s $\pm$ 0,6	---	---	---
PBS + CaCl ₂ 0,5M	---	---	---	68,5s $\pm$ 0,3
Sp	---	>120s*	>120s*	---
PBS	>120s*	---	---	---

Cada experimento é representado pela média $\pm$ S. D (n = 6)

*Diferença estatística em relação ao controle positivo (p<0,05)

O efeito de Sp sobre a atividade fibrinogenolítica dos CV, é observado na Figura 1. A incubação do fibrinogênio com CV e Sp, em concentrações crescentes de Sp, resultou em aumento de proteção da cadeia B β do fibrinogênio até a proporção de 1:10. Em proporções superiores de Sp, o que se observou foi um desaparecimento das bandas protéicas tanto do substrato como de seus produtos de degradação, indicados pelas setas.

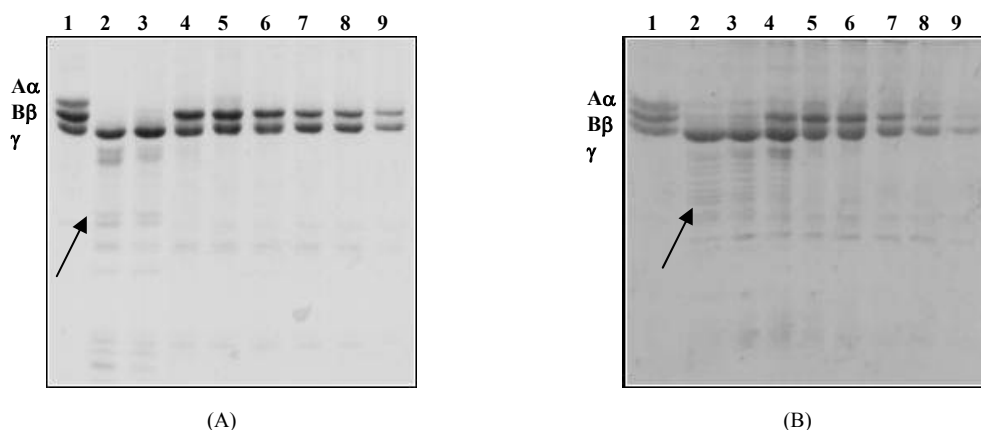


Fig. 1. Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (A) e de *Bothrops alternatus* (B) pelo extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*. FIB + CV/ Sp (m/m). Linhas:
 1. (75 µg) Fibrinogênio bovino (FIB).
 2. FIB + (5µg) CV
 3. FIB + CV/Sp 1:1
 4. FIB + CV/ Sp 1:5
 5. FIB + CV/ Sp 1:10
 6. FIB + CV/ Sp 1:15
 7. FIB + CV/ Sp 1:20
 8. FIB + CV/ Sp 1:30
 9. FIB + CV/ Sp 1:40

Com o fracionamento foram obtidas 3 frações: fração metanólica (F_1), fração MeOH/ H_2O , 1:1 (v/v) (F_2) e fração aquosa (F_3); as quais foram testadas na inibição da atividade fibrinogenolítica dos CVs.

A figura 2 mostra o efeito inibidor que a Fração 1 apresentou diante da atividade fibrinogenolítica dos CV de *Bothrops alternatus* (A) e *Bothrops moojeni* (B). Na linha 2 observa-se a hidrólise das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio causadas pelo CV e nas linhas 3, 4, 5 e 6 a crescente proteção de todas as cadeias à medida que se aumenta a concentração de F_1 . Para esta fração não é observado o desaparecimento das bandas equivalentes às proteínas do ensaio. Já a fração F_2 protegeu a hidrólise da cadeia $B\beta$ do fibrinogênio, mas não a da cadeia $A\alpha$ e também não causou desaparecimento das bandas protéicas (dados não mostrados). Os resultados obtidos com a fração F_3 são apresentados na Figura 3, onde se pode observar nas linhas 3 a 9 que não há praticamente proteção efetiva das cadeias do fibrinogênio e o surgimento novamente, como para o Sp, do efeito de precipitação desse substrato, visto pelo desaparecimento das cadeias do fibrinogênio e das bandas de degradação produzidas pela ação proteolítica dos CV.

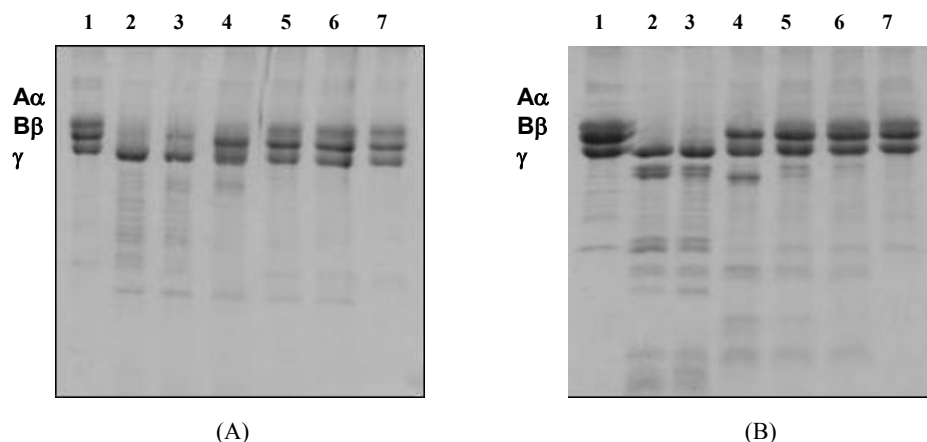


Fig. 2. Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* (A) e *Bothrops moojeni* (B) pela fração F1 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*. (CV/F1 m/m). Linhas:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. (75 µg) Fibrinogênio (FIB) Padrão. | 5. FIB + CV/F1 1:150 |
| 2. FIB + (5µg) CV | 6. FIB + CV/F1 1:250 |
| 3. FIB + CV/F1 1:5 | 7. FIB + 1,25 mg de F1 |
| 4. FIB + CV/F1 1:50 | |

3.3. Interação entre Sp e proteínas

O efeito de interação de Sp com proteínas foi visualizado por eletroforese em condições desnaturantes (Fig. 4). Em 4 (A) combinando somente fibrinogênio e Sp em concentrações crescentes de até 200 µg, observamos desaparecimento gradual de todas as bandas do fibrinogênio, sem o aparecimento concomitante dos produtos de degradação proteolítica do substrato. Da mesma maneira em 4 (B) pode ser observado o mesmo efeito quando Sp foi misturado em concentrações crescentes de CV e/ou plasma bovino (linhas 4, 5 e 7). Já em 4 (C) foi visível o efeito do aumento da solubilização protéica quando esta é aumentada numa amostra que estava precipitada pela presença de Sp (linha 3).

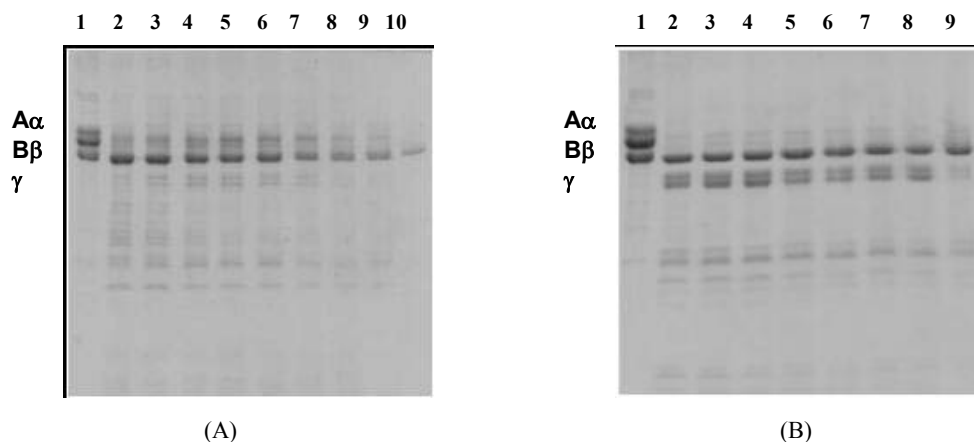


Fig. 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino resultante da ação da peçonha de *Bothrops alternatus* (A) e *Bothrops moojeni* (B) combinada com a fração F3 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*. (CV/F3 m/m). Linhas:

- | | |
|---------------------|------------------------|
| 1. 75 µg FIB | 6. FIB + CV/F3 1:15 |
| 2. FIB + (5µg) CV | 7. FIB + CV/F3 1:20 |
| 3. FIB + CV/F3 1:1 | 8. FIB + CV/F3 1:30 |
| 4. FIB + CV/F3 1:5 | 9. FIB + CV/F3 1:40 |
| 5. FIB + CV/F3 1:10 | 10. FIB + 0,2 mg de F3 |

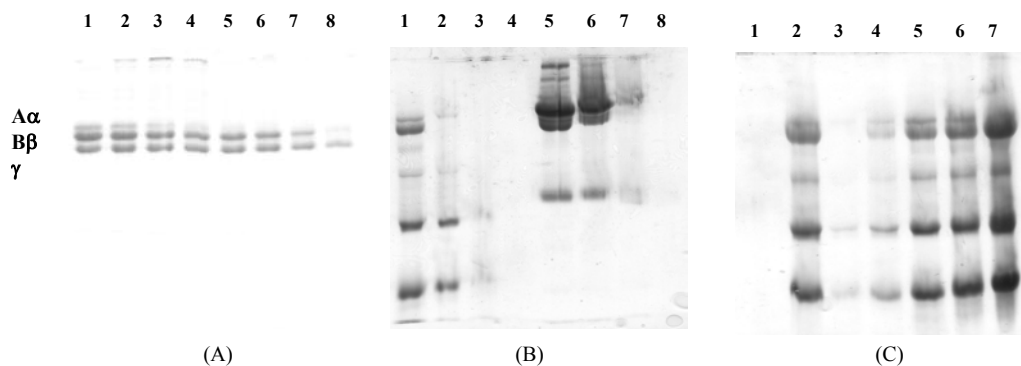


Fig. 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (a 12,5% com agentes desnaturantes) do ensaio de interação extrato aquoso de *S. parahyba* (Sp)/proteínas. (A) concentrações crescentes de Sp mais Fibrinogênio bovino (FIB); (B) concentrações crescentes de Sp mais peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (CV) e/ou plasma bovino (Pla); (C) Sp mais concentrações crescentes de CV. Linhas:

- | (A) | (B) | (C) |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1. 75 µg FIB; | 1. 75 µg CV | 1. 75 µg Sp |
| 2. FIB + 5 µg Sp | 2. CV/Sp 1: 5 | 2. 75 µg CV |
| 3. FIB + 25 µg Sp | 3. CV/Sp 1: 10 | 3. Sp/CV 1: 1 |
| 4. FIB + 50 µg Sp | 4. CV/Sp 1: 30 | 4. Sp/CV 1: 5 |
| 5. FIB + 75 µg Sp | 5. 100 µg Pla | 5. Sp/CV 1: 10 |
| 6. FIB + 100 µg Sp | 6. Pla/Sp 1: 5 | 6. Sp/CV 1: 15 |
| 7. FIB + 150 µg Sp | 7. Pla/Sp 1: 10 | 7. Sp/CV 1: 30 (m/m) |
| 8. FIB + 200 µg Sp (m/m) | 8. Pla/Sp 1: 30 (m/m) | |

4. Discussão e conclusões

Produtos naturais vegetais sempre foram usados pela humanidade para o tratamento de suas enfermidades, fato que se reflete na população mundial atual pela existência de muitas drogas comercializadas advirem ou serem sintetizadas a partir de precursores naturais (De Pasquale, 1984; Rates, 2000). O uso tradicional por populações regionais de espécies vegetais pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos, o que acaba consistindo num valioso atalho para a descoberta de novos fármacos pelos pesquisadores.

Em muitos países, inclusive no Brasil extratos de plantas são tradicionalmente utilizados no tratamento de acidentes ofídicos pelas populações rurais. Estudos como o nosso indicam a importância de uma avaliação científica básica desses extratos que podem confirmar os efeitos biológicos atribuídos popularmente.

Nossos resultados claramente evidenciam que *Schizolobium parahyba* contém substâncias que inibem as atividades biológicas e enzimáticas das peçonhas de *Bothrops alternatus* e *B. moojeni*. As atividades de letalidade, hemorragia, incoagulabilidade sanguínea, fosfolipase A₂ e coagulante foram todas inibidas em 100% em proporções que não passaram de 1:10 (CV/Sp, m/m). Muitos autores atribuem estes efeitos protetores, de extratos vegetais aquosos, a grupos de compostos do metabolismo secundário como esteróides, terpenóides, compostos fenólicos e alcalóides, que estariam se ligando covalentemente, ou não, as enzimas e proteínas tóxicas das peçonhas inativando-as ou agindo de forma indireta seqüestrando íons metálicos divalentes essenciais à catálise de enzimas como fosfolipases A₂ e metaloproteases (Borges et al., 2000, 2001; Biondo et al., 2003; Soares et al., 2004; Izidoro et al. 2003; da Silva et al., 2005; Maiorano et al., 2005; Oliveira et al., 2005). O efeito quelante de íons cálcio foi descartado para Sp quando o ensaio contendo cálcio na presença e ausência de Sp não alterou o tempo de coagulação do plasma bovino (Tab. 03). Borges et al., (2005) também descartaram este efeito após verificarem a inibição da atividade PLA₂, que é cálcio dependente, pelo extrato aquoso de *Musa paradisiacca* (MsE) na presença de grandes

quantidades de íons cálcio. Os mesmos autores também demonstraram que o efeito inibidor de MsE sobre a atividades das peçonhas era devido a associação dos componentes do extrato com as proteínas do veneno de forma não específica e atribuíram aos taninos tal evento.

O desaparecimento gradual das bandas protéicas nos géis e a presença de precipitado nas nossas amostras eletroforéticas quando se analisou a atividade fibrinogenolítica das peçonhas (Fig. 01) também é indicativo da presença de taninos. Desta forma, efetuamos testes com diferentes proteínas e nosso extrato vegetal, alterando as razões extrato/proteína ou proteína/extrato (Fig. 4) para verificar se Sp apresentava um efeito inespecífico de precipitação de proteínas; e se esse efeito dependia de uma determinada razão entre a concentração de taninos e proteínas em cada amostra. Os resultados obtidos indicaram que é necessária uma determinada razão proteína/extrato e que nossa amostra deve apresentar taninos. Outros autores também se referem a este fato indicando realmente a necessidade de uma razão ideal com as proteínas para o efeito precipitante dos taninos (Luck et al., 1994). Não descartamos, no entanto, a presença de outros polifenóis de baixo peso molecular que sempre acompanham taninos em extrações aquosas e hidroalcoólicas (Costa, 2002; Simões, 2003); e que a literatura é rica em descrever efeitos biológicos e terapêuticos para estes componentes (Robak & Gryglewski, 1988; Tzeng et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Ong & Khoo, 1997; Yesilada et al., 2000; Kang et al., 2002; Calixto et al., 2003; Morikawa et al., 2003; Dell'Agli et al., 2004; Vitor et al., 2004; Chiu & Lin, 2005; Fernandez et al., 2005; Kuo, 2005; Lee et al., 2005; Soobrattee et al., 2005; Ticli et al., 2005; Sutherland et al., 2006; Wang et al., 2006).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (Dufresne & Farnworth, 2001). Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês,

vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), 2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e 3) habilidade de complexar e precipitar outras moléculas tais como proteínas e polissacarídeos (Hagerman, 1998; Haslam, 1998).

Estes efeitos dos taninos, no entanto, são muito genéricos e o objetivo inicial deste trabalho era saber se o nosso extrato apresentava componentes com efeito específico de neutralização de determinadas atividades biológicas e enzimáticas das peçonhas; e caracterizar quimicamente os principais componentes do Sp. Análises químicas de RMN do ^1C e ^{13}C , Infravermelho e ultravioleta de Sp (resultados não mostrados) demonstraram realmente que Sp era grandemente constituído por compostos fenólicos com forte presença de açúcares, o que nos direcionou a escolha da metodologia do fracionamento de Sp em Sephadex LH 20 que possui a habilidade de separar componentes pelo tamanho e por adsorção (Manual do produto, Amersham Biosciences).

Assim, um importante ponto no nosso trabalho foi a obtenção de uma fração protetora da hidrólise do fibrinogênio sem efeito precipitante (F_1) e outra de ação precipitante e não protetora (F_3). Este fracionamento claramente separou compostos fenólicos simples e polifenóis de baixo peso molecular de outros polifenóis de alto peso molecular como os taninos condensados e hidrolisáveis. Polifenóis em geral estão sempre associados a atividades biológicas benéficas sendo que aqueles de baixo peso molecular não possuem a atividade de precipitar macromoléculas (Costa, 2002; Simões, 2003). O efeito de precipitação parece estar intimamente ligado à formação de polímeros polifenólicos constituídos por ligações de muitos polifenóis de baixo peso molecular. Daí o grande poder precipitante de proteínas dos taninos condensados que ainda hoje são utilizados para o curtimento de couros (Simões et al., 2003). Dessa maneira Sp muito provavelmente contém taninos, devido ao efeito de precipitação de proteínas observado; mas também contém outros metabólitos que são capazes de neutralizar os efeitos tóxicos dos venenos de serpentes e que, isolados estes últimos podem trazer novas perspectivas para o tratamento do envenenamento ofídico.

5. 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.

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.

Asuzu, I. U., Harvey, A. L., 2003. The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. *Toxicon* 42, 763-768.

Biondo, R., Pereira, A. M. S., Marcussi, S., Pereira, P. S. França, S. C., Soares, A. M., 2003. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apacynaceae) aqueous extract. *Biochimie* 85, 1017-1025.

Bjarnason, J. B., Fox, J. w., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62, 325-372.

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, J. R. Homs-Brandeburgo, M. I., 2000. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comparative of Biochemistry and Physiology* 127, 21-31.

Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Oliveira, F., Franshechi, A. M., Rucavo, A., Giglio, J. R., Homs-Brandeburgo, M. I., 2001. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39, 1863-1869.

Borges, M. H., Alves, D. L. F., Raslan, D. S., Piló-Veloso, D., Rodrigues, V. M., Homsí-Brandeburgo, M. I., de Lima, M. E., 2005. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 21-29.

Calixto, J. B., Otuki, M. F., Santos, A. R., 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. *Planta Med.* 69, 973-983.

Chippaux, J. P., 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull. WHO* 76, 515-524.

Chiu, F. L., Lin, J. K., 2005. HPLC analysis of naturally occurring methylated catechins, 3''- and 4''-methyl-epigallocatechin gallate, in various fresh tea leaves and commercial teas and their potent inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7035-7042.

Costa, A. F., 2002. *Farmacognosia vol. I*. Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa.

Costa, A. F., 2002. *Farmacognosia vol. II*. Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa.

Costa, A. F., 2002. *Farmacognosia vol. III*. Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa.

Da Silva, J. O., Coppede, J. S., Fernandes, V. C., Sant'Ana, C. D., Ticli, F. K., Mazzi, M. V., Giglio, J. R., Pereira, P. S., Soares, A. M., Sampaio, S. V., 2005. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 145-152.

Da Silva, J. O., Coppede, J. S., Fernandes, V. C., Sant'Ana, C. D., Ticli, F. K., Mazzi, M. V., Giglio, J. R., Pereira, P. S., Soares, A. M., Sampaio, S. V., 2005.

Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. Journal of Ethnopharmacology 100, 145-152.

De Pasquale, A., 1984. Pharmacognosy: the oldest modern science. Journal of Ethnopharmacology 11, 1-16.

Dell'Agli, M., Buscialà, A., Bosisio, E., 2004. Vascular effects of wine polyphenols. Cardiovascular Research 63, 593-602.

Dufresne, C. J., Farnworth, E. R., 2001. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. Journal of Nutritional Biochemistry 12, 404-421.

Edgar, W., Prentice, C. R. M., 1973. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. Tromb. Res. 2, 85-89.

ENGEL, V. L., PARROTTA, J. A., 2001. An evaluation of direct seeding for reforestation of degraded lands in central São Paulo state, Brazil Forest. Ecology and Management 152, 169-181.

Fernandez, J., Reyes, R., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M. R., Jankowski, C., Campos, M. G., 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D₄-induced contraction in guinea-pig airways. European Journal of Pharmacology 522, 108-115.

Ferreira, L. A. F., Henriques, O. B., Andreoni, A. A. S., Vitral, G. R. F., Campos, M. M. C., Habermehl, G. G., De Moraes, V. L. G., 1992. Antivenom and biological effects of Ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Toxicon 30, 1211-1218.

França, F. O. S., 1998. Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan,

SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 31, 187-190.

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B. 1997. Phospholipases A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. In: Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, function and mechanism. Kini, R. M. (Ed.) John Wiley and Sons, Chichester, 321-352.

Hagerman, A. E., 1998. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. Journal of Chemistry and Ecology 14, 453-461.

Haslam, E., 1998. Practical polyphenols – from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University.

Itzhaki, R. F., Gill, D. M., 1964. A microbiuret method for estimating proteins. Analytical Biochemistry 9, 401-410.

Izidoro, L. F. M., Rodrigues, V. M. Rodrigues, R. S., Ferro, E. V., Hamaguchi, A., Giglio, J. R., Homs-Brandeburgo, M. I. 2003. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). Biochimie 85, 669-675.

Kamiguti, A. S. & Cardoso J. L. C., 1989. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. Toxicon 27, 955-963.

Kang, H. W., Yu, K. W., Jun, W. J., Chang, I. S., Han, S. B., Kim, H. Y., Cho, H. Y., 2002. Isolation and characterization of alkyl peroxy radical scavenging compound from leaves of *Laurus nobilis*. Biol. Pharm. Bull. 25, 102-108.

Kuo, P. L., 2005. Myricetin inhibits the induction of anti-Fas IgM-, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β -mediated apoptosis by Fas pathway inhibition in human osteoblastic cell line MG-63. *Life Sciences* 77, 2964-2976.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, W. J., Shim, J. Y., Zhu, B. T., 2005. Mechanisms for the inhibition of dna methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* 68, 1018-1030.

Lewis, G. P., 1987. *Legumes of Bahia*. 1. ed. Inglaterra: Royal botanic Gardens.

Lorenzi, H. 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum, Nova Odessa.

Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimer, H. R., Warminski, E. E., Willianson, M. P., Lilley, T. H., Haslam, E., 1994. Polyphenols, astringency and proline rich proteins. *Phytochemistry*, 37, 357-371.

Maiorano, V. C., Marcussi, S., Daher, M. A. F., Oliveira, C. Z., Couto, L. B., Gomes, O. A., França, S. C., Soares, A. M., Pereira, P. S., 2005. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 364-370.

Markland, F. S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800

Martz, W., 1992. Plant with a reputation against snakebite. *Toxicon* 30, 1131-1142.

Meier, P. A., Stocker, K. F., 1995. Biology and distribution of venom snake of medicinal importance and the composition of snake venoms. In: Meier, J., White, J. (Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and poisons. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 367-412.

Morikawa, K., Nnaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., Morikawa, S., 2003. Inhibitory effect of quercitrin on carrageenan-induced inflammation in rats. Life Sci. 74, 709-721.

Moura-da-Silva, A. M., Desmond, H., Laing, G., Theakston, R. D. G., 1991. Isolation and comparison of myotoxins isolated venoms of different species of *Bothrops* snake. Toxicon 29, 713-723.

Mors, W. B., 1991. Plants active against snake bite. Economic and Medicinal Plant Research 5, 352-382.

Mors, W. B., Nascimento, M. C., Pereira, B. M., Pereira, N. A., 2000. Plant natural products active against snake-bite the molecular approach. Phytochemistry 55, 627-642.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H., Tu, A. T., 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. Archives of Biochemistry and Biophysics 231, 309-311.

Oliveira, C. Z., Maiorano, V. A., Marcussi, S., Sant'Ana, C. D., Januário, A. H., Lourenço, M. V., Sampaio, S. V., França, S. C., Pereira, P. S., Soares, A. M., 2005. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. Journal of Ethnopharmacology 98, 213-216.

Ong, K. C., Khoo, H. E., 1997. Biological effects of myricetin. Gen. Pharmac. 29, 121-126.

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

Ribeiro, L. A., Jorge, M. T., 1997. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 01-10.

RIZZINI, C. T., 1978. In: Plantas do Brasil: árvores e madeira úteis do Brasil, manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Edgard Blücher.

Robak, J., Gryglewski, R. J., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmac.* 37, 837-841.

Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in south America. In: *Venoms Animals and Their Venoms* 2, 345-403.

Schery, R. W., 1951. Leguminosae-Caesalpinioidea. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 38, 1-94.

Simões, C. M. O., 2003. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC.

Soares, A. M., Januário, A. H., Lourenço, M. V., Pereira, A. M. S., Pereira, P. S., 2004. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. *Drugs of the Future* 29, 1105-1117.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579, 200-213.

Standley, P. C., Steyermark, J. A., 1946. Leguminosae. *Fieldiana Bot.* 24, 1-425.

Sutherland, B. A., Rahman, R. M. A., Appleton, I., 2006. Mechanisms of action of green tea catechins with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 291-306.

Ticli, F. K., Hage, L. I. S., Cambraia, R. S., Pereira, P. S. Magro, A. J., Fontes, M. R. M., Stábeli, R. G., Giglio, J. R., França, S. C., Soares, A. M., Sampaio, S. V., 2005. Rosmaric acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 46, 318-327.

Tzeng, S. H., Ko, W. C., Ko, F. N., Teng, C. M., 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavanoids. *Thromb. Res.* 64, 91-100.

Vitor, R. F., Mota-Felipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. I., Teixeira, A., Paulo, A., 2004. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 363-370.

Wang, S., Noh, S. K., Koo, S. I., 2006. Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A₂ and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, article in press.

White, J., 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45, 951-967.

Yesilada, E., Tsuchiya, K., Takaishi, Y., Kawazoe, K., 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging flavanoid glycosides from the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 471-478.

Capítulo II

Inibição da atividade proteolítica da peçonha de *Bothrops alternatus* por flavonóides isolados do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* (FABACEAE)

Capítulo escrito de acordo com as normas da revista Journal Ethnopharmacology
(www.elsevier.com/locate/jethpharm)

Resumo:

Do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Schizolobium parahyba* foram isolados quatro compostos ativos, isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina, por cromatografia em Sephadex LH 20 seguido de HPLC semi-preparativo em coluna C-18 e identificados por RMN do ^1H e ^{13}C . Essa é a primeira vez que estas substâncias são relatadas nesta espécie assim como suas atividades antiofídicas. Após isolamento foram todas testadas frente a atividade hemorrágica e fibrinogenolítica da peçonha de *Bothrops alternatus* (Bal). Na proporção 1:30 (Peçonha/fração, m/m) a isoquercitrina inibiu parcialmente a atividade hemorrágica; a miricetina-3-O-glicosídeo e a catequina não foram capazes de inibir a hemorragia induzida pela Bal e a galocatequina, por sua vez, apresentou uma eficiente neutralização desta atividade da peçonha. Na proporção de 1:100 (Peçonha/fração, m/m) ficou evidenciado o efeito de inibição total da ação fibrinogenolítica da peçonha pela miricetina-3-O-glicosídeo; a isoquercitrina não protegeu a proteólise da cadeia $\text{A}\alpha$ do fibrinogênio e inibiu parcialmente a degradação da cadeia $\text{B}\beta$ enquanto a catequina e a galocatequina inibiram parcialmente a degradação da cadeia $\text{A}\alpha$ e totalmente a da cadeia $\text{B}\beta$. Dessa forma concluímos que a galocatequina e a miricetina-3-O-glicosídeo são excelentes inibidores de toxinas hemorrágicas e fibrinogenolíticas respectivamente. Estudos vindouros como o de modelagem molecular e cristalização de raio-X usando toxinas isoladas e estas substâncias poderão ser de grande importância para o desenho de novas drogas auxiliares do tratamento com soro antiofídico ou para melhor elucidação da relação estrutura-função das toxinas destes venenos.

PALAVRAS CHAVE: Isolamento, Identificação molecular, flavonóides, inibição, peçonha.

Abstract:

From a lyophilized aqueous extract of *Schizolobium parahyba* leaves four compounds (isoquercitrin, miricetin-3-O-glucoside, catechin and galocatechin) has been isolated by chromatography on Sephadex LH 20 followed by semi-preparative HPLC in C-18 column and identified by RMN of ^1H and ^{13}C . This is the first time these compounds are reported in *S. parahyba* species as well as their antiophidian properties. After being isolated, all these compounds were tested against the hemorrhagic and fibrinogenolytic activities of the *Bothrops alternatus* crude venom (Bal). Isoquercitrin could partially inhibit hemorrhagic activity for a 1:30 ratio (venom/fraction, w/w). Miricetin-3-O-glucoside and catechin did not inhibit the hemorrhage induced by the Bal. Galocatechin, by its turn, presented an efficient neutralization of this venom activity. In a 1:100 ratio (venom/fraction, w/w) miricetin-3-O-glucoside was able to inhibit 100% of venom fibrinogenolytic action; isoquercitrin did not protect the A α chain proteolysis of the fibrinogen and partially inhibited the B β chain degradation. On the other hand, catechin and galocatechin partially inhibited the degradation of the A α chain and totally protected the B β chain degradation. Consequently, we conclude that galocatechin and miricetin-3-O-glucoside are excellent inhibitors of hemorrhagic toxins and fibrinogenolytic, respectively. In addition, tests of these four compounds with respect to the inhibition of other venom activities may bring promising results in the future. Forthcoming studies, such as molecular modeling and X-ray crystallization using isolated toxins and the present compounds, will be of great importance for the developing of new therapeutical agents for ophidian accidents treatment and for a better understanding of the structure/function relationship of these venoms toxins.

1. Introdução

Atualmente, o tratamento mais eficaz do envenenamento por serpentes é feito pela administração de soro antiofídico por via parenteral, obtido de soro equino hiperimunizado, mas geralmente induz a algumas reações adversas. Durante a soroterapia a neutralização dos efeitos tóxicos sistêmicos usualmente é alcançada, mas a neutralização dos danos teciduais locais não ocorre (Cardoso et al., 2003), podendo resultar em seqüelas permanentes ou na perda do membro afetado. Assim é importante a procura de novos inibidores do veneno, naturais ou sintéticos, que possam complementar a soroterapia, principalmente com relação à reversão do quadro de lesões locais causado pelo envenenamento.

Muitas drogas atuais são derivadas ou desenhadas a partir de substâncias isoladas de plantas como vincristina e vinblastina (*Catharanthus roseus*), atropina (*Atropa belladonna*), morfina e codeína (*Papaver soniferum*) (Rates, 2001). Esses compostos bioativos são geralmente metabólitos secundários como alcalóides, flavonóides e taninos (Habermehl, 1998). Os taninos sempre são encontrados em soluções extrativas aquosas ou hidroalcóolicas de plantas acompanhados de substâncias polifenólicas diversas, algumas estudadas em grupos distintos, como os flavonóis, as leuco-antocianinas, as catequinas e os ácidos fenólicos. Estes compostos, de pesos moleculares relativamente baixos, não são considerados taninos, pois não possuem algumas das suas propriedades, em particular não precipitam proteínas e conseqüentemente falta-lhes a capacidade de curtir as peles; todavia já foi atribuído a vários destes compostos o papel provável de precursores taninicos. Particularmente alguns desses polifenóis, como os flavonóides (que incluem as sub classes flavonóis e catequinas) são conhecidos na literatura por serem habituais em certos fármacos, contribuindo para defini-los como compostos ativos de interesse terapêutico (Costa, 2002).

Em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo (submetidos para publicação), verificamos que o extrato bruto aquoso de *Schizolobium parahyba* foi

eficiente em inibir atividades tóxicas de peçonhas de serpentes botrópicas, crotálicas e de toxinas isoladas, que não é tóxico em camundongos mesmo em grandes quantidades, ao mesmo tempo em que quantidades elevadas do extrato precipitam proteínas. Constatamos também que com um simples fracionamento, obtivemos uma fração não precipitante de proteínas e capaz de inibir a atividade fibrinogenolítica de peçonhas botrópicas. Neste trabalho descrevemos o isolamento e a caracterização estrutural de quatro componentes do extrato aquoso das folhas de *Schizolobium parahyba*. Em adição, testamos seus potenciais neutralizadores de atividades hemorrágica e fibrinogenolítica induzidas pela peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus*.

2. Materiais e métodos

2.1. Preparação do veneno

O veneno de *Bothrops alternatus* (Bal) foi obtido no serpentário da Pentafarma do Brasil, Minas Gerais, Brasil. O veneno liofilizado foi pesado, dissolvido em tampão fosfato, pH 7.2 (PBS) e centrifugado a 3000 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi coletado e imediatamente usado nos experimentos. Proteínas foram estimadas pelo método de Itzhaki & Gill, (1964).

2.2. Animais

Camundongos Swiss machos (20-25 g) foram doados pelo Institute Vallé, Minas Gerais, Brasil e mantidos em condições padrões (temperatura 22 ± 1 °C, humidade relativa $60 \pm 5\%$, ciclo de 12 h luz/escuro) com dieta padronizada e água *ad libitum*.

2.3. Preparação do extrato da planta (Sp)

As folhas foram lavadas, trituradas com água desionizada em liquidificador por 15 minutos a temperatura ambiente e filtrada. O filtrado foi centrifugado a $30.000 \times g$ por 15 min e o sobrenadante foi liofilizado e estocado a -20°C de acordo com Capítulo I.

2.4. Purificação e identificação dos compostos ativos

20 g de (Sp) foram suspensos em 50 mL de metanol, centrifugados e retirado o sobrenadante (SPM), o qual foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado. 7,2115 g de SPM foram ressuspensos em metanol e aplicados em coluna de Sephadex LH-20 (210 cm $\times$ 3,3 cm) utilizando metanol (1,4 L) como fase móvel. As frações resultantes, depois de secas, foram analisadas por TLC (thin-layer chromatography) e reveladas com reagente de vanilina sulfúrica. A fração 5 (SPM5) foi recromatografada em coluna de Sephadex LH-20 (63 cm $\times$ 2,2 cm) utilizando 406 mL de metanol como fase móvel, sendo que a sub fração 4 (SPM5.4) desta cromatografia, assim como as frações 6 (SPMA), 7 (SPMBC) e 8 (SPMDE) da primeira cromatografia, foram todas aplicadas em HPLC semipreparativo (coluna cromatográfica Supelcosil C18), usando um gradiente de concentração metanol:água, sob fluxo de 2mL/min. De todas as frações obtidas nestas cromatografias, 4 foram testadas biologicamente e analisadas por ressonância magnética nuclear. O espectro de RMN foi obtido em espectômetro Bruker DXP-300, operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Para isso 15 mg de cada amostra foram dissolvidos em dimetil- d_6 -sulfoxido (Aldrich) e usados.

2.5. Testes de neutralização

Os ensaios de neutralização das atividades hemorrágica e fibrinogenolítica de Bal foram realizados misturando a amostra com o veneno em diferentes razões imediatamente antes dos testes (peçonha: fração, m/m). Para a inibição da atividade

fibrinogenolítica foram utilizadas as razões 1:50 e 1:100 (peçonha: fração, m/m) e para a atividade hemorrágica as razões: 1:15 e 1:30 (peçonha: fração, m/m). A neutralização da atividade hemorrágica para um dos compostos isolados também foi ensaiada por um protocolo de pré-tratamento, administrando a amostra 30 minutos antes de inocular a peçonha.

2.5.1. Atividade hemorrágica

A dose mínima hemorrágica (DMH) foi calculada para Bal segundo Nikai et al., (1984). A inibição da atividade hemorrágica foi avaliada por injeções intradérmicas dorsais de amostras contendo 3 DMH de Bal em camundongos machos Swiss (n = 6, 18-22g) que foram sacrificados após 3 horas. A intensidade dos halos hemorrágicos na face interna da pele foi verificada visualmente, e estes foram agrupados em intenso, moderado, fraco ou inexistente.

2.5.2. Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio

A atividade fibrinogenolítica da peçonha foi avaliada de acordo com Rodrigues et al (2000). Amostras de 50 μ L de fibrinogênio bovino (1mg/mL PBS) foram incubadas com 5 μ g de Bal a 37°C por 2 horas e a reação foi interrompida com 25 μ L de tampão Tris-HCl 0.5 M, pH 6.5 contendo 2% de SDS (m/v), 10% de β -mercaptoetanol (v/v) e 0.05% de azul de bromofenol (m/v). As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 14% (m/v).

2.6. Análises estatísticas

Os dados são representados como valores de média e desvio padrão (SD). Para a análise de significância estatística de diferença entre os grupos os dados foram submetidos ao teste T de student com valores de $p < 0.05$ considerados significantes.

3. Resultados

3.1. Purificação e identificação dos compostos ativos

A Figura 1 mostra os passos de purificação de quatro compostos ativos do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*; fração SPM5.4.3, SPMA.5, SPMBC.4 e SPMDE.3. Essas frações representam respectivamente 0,08% (6,0 mg), 0,12% (23,2 mg), 0,16% (32,5 mg) e 0,14% (27,1 mg) do extrato bruto total. A Figura 2 mostra os perfis cromatográficos em HPLC semipreparativo de frações que resultaram nestes compostos, assim como TLC e HPLC dos compostos isolados. Análises espectroscópicas dessas frações indicaram que SPM5.4.3 é uma isorquercitrina, SPMA.5 é uma miricetina-3-O-glicosídeo, SPMBC.4 é uma catequina e SPMDE.3 é uma galocatequina. Os valores dos deslocamentos químicos de RMN assim como as estruturas de cada composto isolado estão apresentados na Tabela 1 e Figura 3, respectivamente.

3.2. Inibição da atividade hemorrágica da peçonha bruta

A DMH calculada para a peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi de 7,44 µg. A neutralização da atividade hemorrágica de Bal por cada componente isolado de Sp é apresentada na Fig. 4 na proporção de 1:30 (peçonha/frações, m/m), que foi a proporção que obtivemos resultados positivos. Em (A) temos um controle positivo, onde se observa um intenso halo hemorrágico causado pela inoculação de 2DMH de Bal e em (B) um controle negativo, mostrando a inexistência do halo pela aplicação de tampão PBS. A isoquercitrina (C) inibiu parcialmente a atividade hemorrágica (halo hemorrágico moderado); a miricetina-3-O-glicosídeo (D) e a catequina (E) não foram capazes de inibir a hemorragia induzida pela Bal, o que pode ser observado pela presença de halos hemorrágicos intensos. Já a galocatequina apresentou uma eficiente neutralização da atividade hemorrágica de Bal (halos fracos), tanto na

mistura com Bal (F), como no pré-tratamento (G). Em (H) foi realizado um controle para comparação usando rutina comercial como inibidor, onde se pode observar também um halo fraco.

3.3. Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha

A Figura 05 mostra a ação proteolítica de Bal sobre as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio bovino após 2 h de incubação (linha 1). Ensaio na proporção de 1:50 (peçonha: fração, m/m) não apresentaram proteção evidente para nenhum composto isolado testado. Já na proporção de 1:100 (peçonha: fração, m/m) foi observada uma excelente inibição da ação fibrinogenolítica da peçonha pela Miricetina-3-O-glicosídeo (linha 3). A isoquercitrina (linha 2) não protegeu a proteólise da cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio e inibiu parcialmente a degradação da cadeia $B\beta$, já a catequina (linha 4) e a galocatequina (linha 5) inibiram parcialmente a degradação da cadeia $A\alpha$ e totalmente a da cadeia $B\beta$.

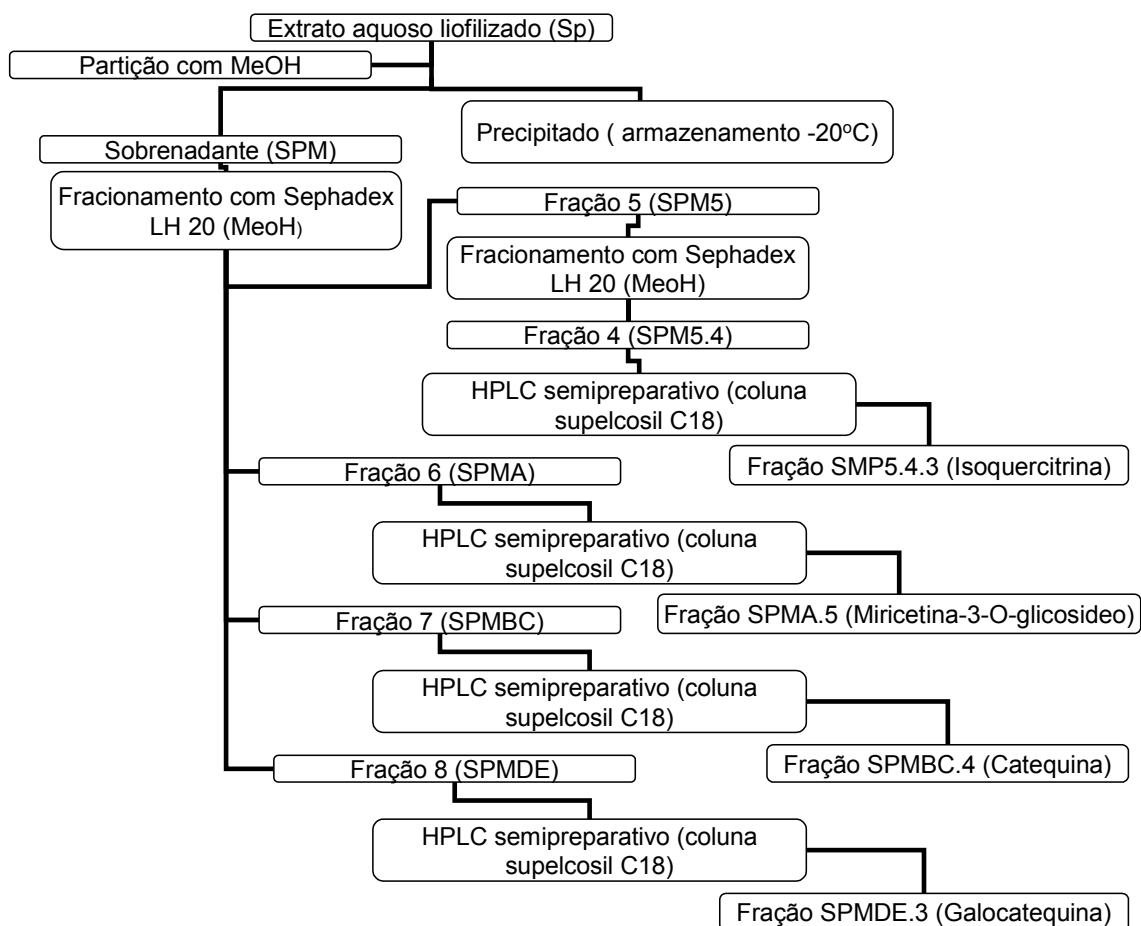


Fig. 01. Fluxograma de isolamento da isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosideo, catequina e galocatequina do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*.

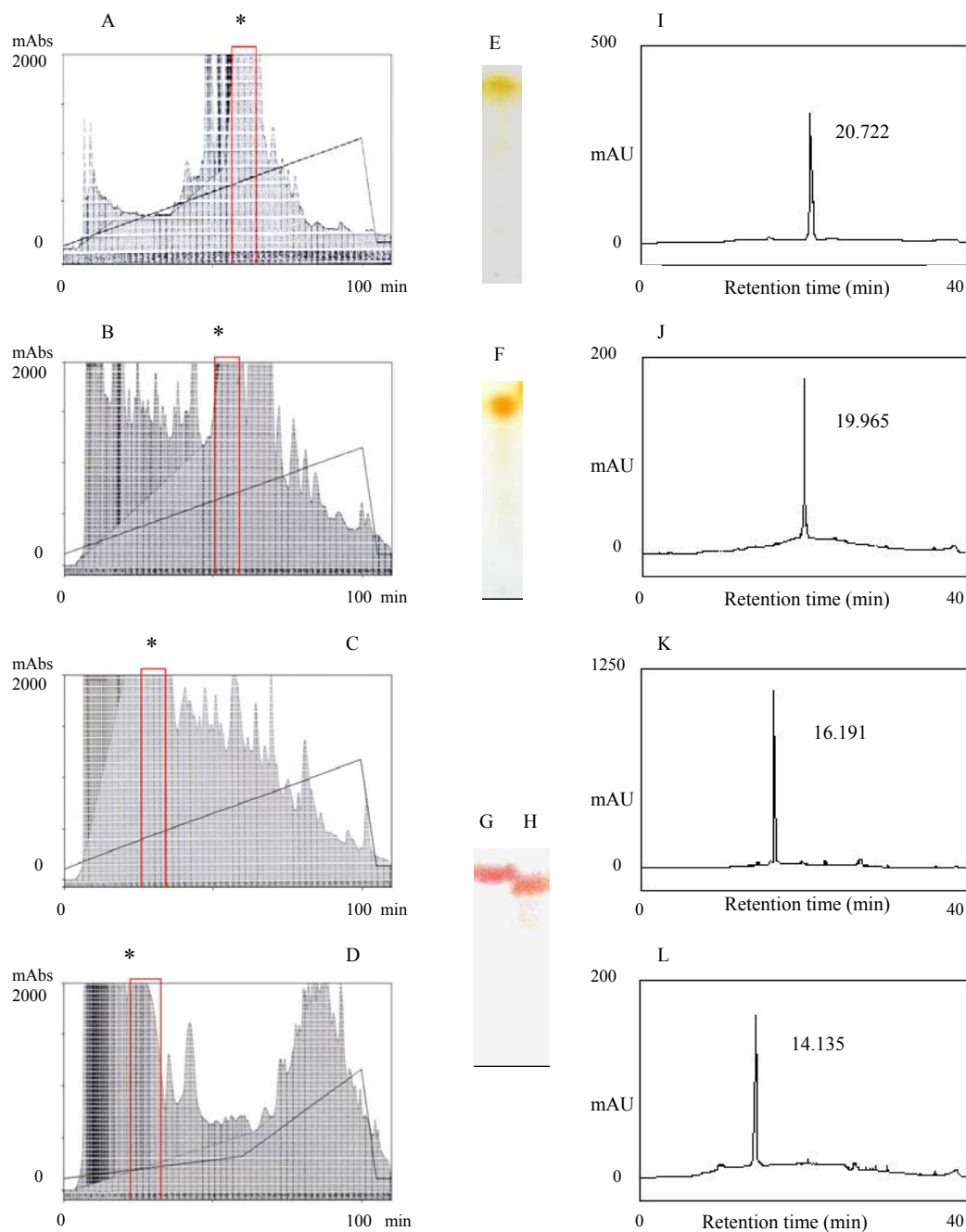


Fig. 02. Purificação da isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina do extrato aquoso de *S. parahyba*. De A a D fracionamento semipreparativo em HPLC utilizando coluna supelcosil C18: A) fração SPM5.4, B) fração SPMA, C) fração SPMBC e D) fração SPMDE. De E a H TLC revelada com reagente vanilina sulfúrica. Fase móvel n-butanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v): E) isoquercitrina, F) miricetina-3-O-glicosídeo, G) catequina e H) galocatequina. De I a L cromatografia analítica em HPLC utilizando coluna octadecilsilano C18 fase reversa, gradiente água/metanol, de isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina respectivamente. Todos os cromatogramas foram analisados em 280 nm.

*Momentos dos fracionamentos em HPLC semipreparativo em que foram coletados os compostos ativos.

Tab. 01 - Dados espectrais de RMN do ^1H e ^{13}C de isoquercitrina (1), miricetina-3-O-glicosídeo (2), catequina (3) e galocatequina (4).

Posição	^1H (ppm)				^{13}C (ppm)			
	compostos							
	1	2	3	4	1	2	3	4
2			4,68 d	4,43 d	156,1	156,1	78,1	78,1
3			3,90 ddd	3,98 ddd	133,4	133,4	64,9	65,0
4			2,46 dd e 2,71 dd	2,50 dd e 2,69 dd	177,3	177,4	28,2	28,2
5	12,61 (OH)	12,63			161,2	161,2	156,3	156,2
6	6,16 d	6,18 s	5,89 d	5,72 d	98,9	98,7	95,1	95,1
7					165,2	164,5	155,8	155,8
8	6,36 d	6,38 s	5,90 d	5,88 d	93,6	93,4	94,1	94,1
9					156,4	156,3	156,6	156,5
10					103,5	103,8	98,5	98,6
1'					121,0	120,0	130,6	132,1
2'	7,90 d	7,19 s	6,91 d	6,37 s	115,2	108,6	114,4	106,1
3'					144,9	145,5	144,5	145,4
4'					148,6	136,7	144,5	145,8
5'	6,84 d		6,89 d		115,9	145,5	114,9	129,8
6'	7,58 dd	7,19 s	6,69 dd	5,89 s	121,9	108,6	118,0	132,1
1''	5,25 d	5,46 d			101,9	102,0		
2''	3,48 t				71,2	71,2		
3''	3,43 t				73,2	73,2		
4''	3,35 t				67,9	68,0		
5''	3,22 ddd				75,8	75,9		
6''	3,64 d e 3,56 d				60,1	60,0		

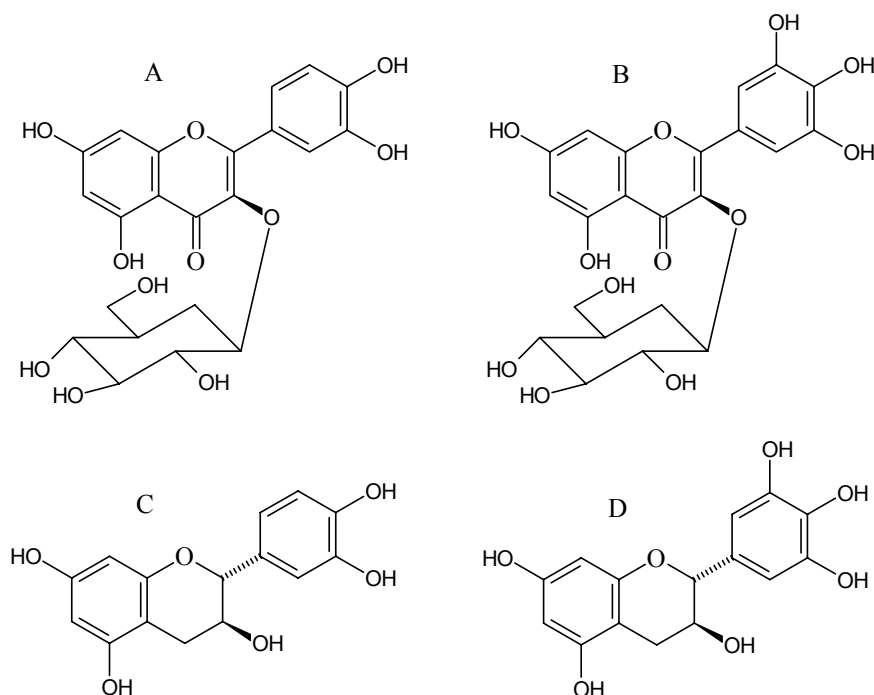


Fig. 03. Flavonóis e catecóis isolados do extrato aquoso das folhas de *Schizolobium parahyba*. A) isoquercitrina, B) miricetina-3-O-glicosídeo, C) catequina e D) galocatequina.

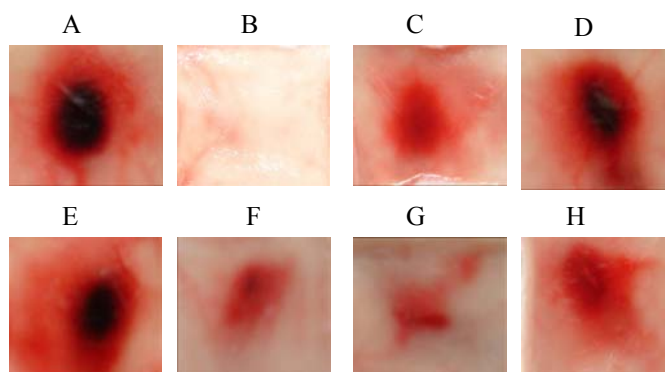


Fig 04. Inibição da atividade hemorrágica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* por compostos ativos isolados do extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*. A) 22,32 µg de peçonha de *B. alternatus* (Bal). B) PBS; C) Bal + isoquercitrina; D) Bal + miricetina-3-O-glicosídeo; E) Bal + catequina; F) Bal + galocatequina; G) galocatequina aplicada 30 minutos antes de Bal; H) Bal + Rutina comercial; (1:30, peçonha:frações, m/m).

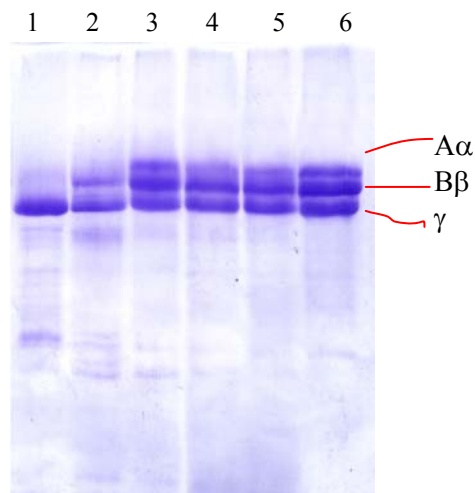


Fig 05. Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* por compostos ativos isolados do extrato aquoso de *Shizolobium parahyba* (1:100, peçonha:frações, m/m).

- 6) (75µg) Padrão de fibrinogênio (FIB)
- 1) FIB + 5 µg de peçonha de *B. alternatus* (Bal)
- 2) 2) FIB + Bal/isoquercitrina
- 3) 3) FIB + Bal/miricetina-3-O-glicosídeo
- 4) 4) FIB + Bal/catequina
- 5) 5) FIB + Bal/galocatequina

4. Discussão e conclusões

Os estudos etnofarmacológicos sempre caminharam no sentido de se comprovar se uma dada espécie de planta utilizada popularmente, realmente apresenta a atividade terapêutica que lhe é atribuída. Muitos desses trabalhos, direcionados ao combate de atividades tóxicas de peçonhas de serpentes utilizando extratos brutos aquosos pré-misturados com os venenos, foram publicados evidenciando os efeitos protetores de tais plantas (Cherdchu et al., 1978, 1983; Akunyili & Akubue, 1987; Mors et al., 1991, 2000; Martz, 1992; Alam et al., 1994; Borges et al., 2000, 2001; Biondo et al., 2003; Izidoro et al. 2003; Soares et al., 2004; da Silva et al., 2005; Maiorano et al., 2005; Oliveira et al., 2005). Mas uma atenção especial a estes ensaios usando extratos vegetais aquosos deve ser dada à presença de taninos, que agem inespecificamente precipitando proteínas e mascarando resultados, como mostrado por Borges et al.,(2005). É sabido que extratos vegetais aquosos ou hidroalcóolicos sempre solubilizam quantidades

significativas de taninos (Costa, 2002; Simões, 2003), e assim o efeito específico de determinado metabólito presente neste extrato pode não ser observado. Mas, uma vez fracionados estes extratos é possível obter compostos menores com ações mais específicas, como vários polifenóis que sempre acompanham as extrações tanínicas (Costa, 2002; Simões, 2003). Atualmente, muitos pesquisadores estão direcionando seus trabalhos para o isolamento e elucidação estrutural de metabólitos vegetais com propriedades antiofídicas, e uma grande parte destes são compostos fenólicos como ar-tumerona (Ferreira et al., 1992), ácido caféico, cinarina (Pereira et al., 1994) e ácido rosmarinico (Ticli et al., 2005). Para uma revisão mais completa ver Soares et al (2004).

Os flavonóides, por sua vez, representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. São atribuídos a este grupo diversas funções como proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, contra patógenos externos, e como atraentes de agentes polinizadores, dentre outros. Terapeuticamente são descritos como antivirais, antioxidantes, antiinflamatórios e antitumorais; desde a década de 30 estão sendo usados no tratamento de fragilidade de vasos capilares e púrpura hemorrágica por serem capazes de recuperar a resistência capilar e também por inibirem a atividade de hialuronidases (Simões, 2003).

Neste trabalho nós isolamos e identificamos pela primeira vez do extrato aquoso das folhas de *Schizolobium parahyba* quatro flavonóides já descritos na literatura: isoquercitrina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina, e subsequentemente, testamos a capacidade de cada um deles em neutralizar a atividade hemorrágica e fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*.

A isoquercitrina foi capaz de inibir a hemorragia induzida pela peçonha, mas não demonstrou grande eficiência em inibir a atividade fibrinogenolítica (Fig. 05, linha 2). Este composto é um glicosídeo natural da quercitrina, um bioflavonóide que é encontrado em muitas plantas responsáveis pelas cores como o amarelo, laranja e vermelho em flores, frutos e folhas (Salim et al., 2004). Muitas atividades biológicas foram descritas para a isoquercitrina, onde destacamos seu potencial protetor do

endotélio contra a injúria oxidativa estabelecida em diabéticos (Vitor et al., 2004), seqüestrador de radicais livres (Yesilada et al., 2000; Kang et al., 2002), assim como uma possível droga no combate a asma por inibição de sisteinil leucotrienos (Fernandez et al., 2005), ação antiinflamatória (Calixto et al., 2003; Morikava et al., 2003), sedativa e não letal em camundongos (Kang et al., 2000). Assim do ponto de vista terapêutico a isoquercitrina claramente pode vir a apresentar bons resultados em testes subseqüentes, com venenos de serpentes, que visem a neutralização dos processos locais inflamatórios e edematogênicos, que sempre são acompanhados de muita dor pela vítima de picada de serpentes.

Miricetina-3-O-glicosideo assim como a isoquercitrina é um flavonol de ocorrência natural e que resulta da glicosilação do carbono 3 da miricetina. Este seu precursor, já foi descrito como potente agente antioxidante (Roback & Gryglewski, 1988; Hertog et al., 1993a; Soobrattee et al., 2005), protetor de lipídeos de membranas contra danos oxidativos, inibidor de lipooxigenases (Ong and Khoo, 1997), agente anticarcinogênico (Hertog et al., 1993b; Huo, 2005) e potente agente antitrombótico por inibição de agregação plaquetária assim como desagregação de trombos plaquetários (Tzeng et al., 1991). A miricetina-3-O-glicosideo, em nossos ensaios, demonstrou potente ação antiproteolítica da peçonha de Bal sobre o fibrinogênio bovino (Fig. 05, linha 3). A proteólise do fibrinogênio é desencadeada por fibrinogenases contidas na peçonha, que podem ser classificadas por seus domínios estruturais como metaloproteinases (**SVMP**) ou serinoproteases (**SVSP**). De acordo com nossos resultados, pode-se sugerir que a miricetina-3-O-glicosideo atua como inibidor destas enzimas inativando-as, evitando assim que as cadeias do fibrinogênio sejam hidrolisadas. Fato interessante é que este flavonol não inibiu a hemorragia desencadeada pela peçonha, o que pode demonstrar uma ação específica contra enzimas fibrinogenolíticas. Todavia mais ensaios com enzimas isoladas poderão elucidar melhor o mecanismo de ação deste composto, assim como testes de inibição de inflamação e agregação plaquetária desencadeados por peçonhas e toxinas nos parecem ser promissores, já que um análogo dela, a Miricetina-3-O-raminosideo foi descrita muito recentemente por Vareed et al.,

(www.sciencedirect.com, artigo in press) por desempenhar inibição da Coxi-1/Cox-2, envolvidas na resposta de processo inflamatório, e de peroxidação de lipídeos.

Os catecóis ou catequinas são um grupo de flavonóides derivados das leucoantocianidinas que já há muito tempo são descritas por apresentarem elevados potenciais biológicos. Estudos recentes têm demonstrado que as catequinas como: a galocatequina, epicatequina e epigalocatequina, possuem uma ampla ação farmacológica de grande interesse comercial. Por exemplo, a inibição de DNA metiltransferases no qual o processo de hipermetilação está associado à indução da instabilidade cromossomal (Lee, et al., 2005), inibição de fosfolipases A2 pancreáticas e consequente absorção de lipídios (Wang et al., 2006), diminuição do risco de doenças coronarianas (Deell'Agli et al., 2004), ação antioxidante e antiinflamatória, modulação de apoptoses e ação neuroprotetora (Sutherland et al., 2006).

A galocatequina isolada do extrato aquoso de *S. parahyba* foi bastante eficiente na neutralização da atividade hemorrágica e parcialmente sobre a fibrinogenólise induzida por *Bal*. Já a catequina que é diferente da galocatequina apenas por não apresentar um grupo OH no carbono 5', não foi capaz inibir a atividade hemorrágica da peçonha, mas apresentou inibição parcial da atividade fibrinogenolítica. Essa sutil diferença estrutural, portanto, pode resultar em um efeito farmacológico totalmente diferente. A literatura é rica em descrições semelhantes, como relatado por Chiu & Lin; (2005) que observaram um aumento da potencia inibitória da oxido nítrico sintase pela epigalocatequina-3-O-(3-O-metil)galato comparada com a epigalocatequina-3-O-(4-O-metil)galato; e por Simões; (2003) descrevendo que as isoflavonas geralmente são antioxidantes mais ativos do que as flavonas devido ao efeito estabilizante da carbonila em C-4 e hidroxila em C-5. Dessa maneira, o grupamento OH no carbono 5' da galocatequina pode estar causando a diminuição do halo hemorrágico não só pelos efeitos vaso-protetores que em geral os flavonóides apresentam (Simões, 2003), mas possivelmente por um outro mecanismo ainda não elucidado.

Em conclusão nossos resultados sugerem que o extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* possui compostos ativos com reais potenciais antiofídicos e

que passos simples de fracionamentos em coluna de Sephadex LH 20 seguido de HPLC semipreparativo nos levam a frações com grau de pureza bastante elevado e quantidades relativamente grandes de isoquercitrina, mericetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina. Observamos que a galocatequina é um excelente inibidor da hemorragia desencadeada pela peçonha e que a mericetina-3-O-glicosídeo é um forte inibidor de toxinas fibrinogenolíticas. No entanto, mais ensaios são necessários para se entender melhor o mecanismo de ação destes compostos, assim como ensaios direcionados para outros efeitos tóxicos dos venenos são importantes para se explorar mais ações terapêuticas destas substâncias. Estudos de modelagem molecular e cristalização de raio-X usando toxinas isoladas e estes compostos para desenho de drogas específicas e melhor elucidação da relação estrutura-função das toxinas também serão de grande importância.

5. Referências bibliográficas

Akunyili, D. N. & Akubue, P. I., 1987. Antisnake venom properties of the stem bark juice of *Schumanniohyton magnificum*. *Fitoterapia* 58, 47-49.

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.

Biondo, R., Pereira, A. M. S., Marcussi, S., Pereira, P. S. França, S. C., Soares, A. M., 2003. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apacynaceae) aqueous extract. *Biochimie* 85, 1017-1025.

Bjarnason. K. B., Fox, J. W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 62, 325-372.

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, J. R. Homs-Brandeburgo, M. I., 2000. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127, 21-31.

Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Oliveira, F., Franshechi, A. M., Rucavo, A., Giglio, J. R., Homs-Brandeburgo, M. I., 2001. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39, 1863-1869.

Borges, M. H., Alves, D. L. F., Raslan, D. S., Piló-Veloso, D., Rodrigues, V. M., Homs-Brandeburgo, M. I., de Lima, M. E., 2005. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 21-29.

Calixto, J. B., Otuki, M. F., Santos, A. R., 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. *Planta Med.* 69, 973-983.

Cardoso, J. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Marques, S. A., Haddad, V. J., 2003. *Animais Peçonhentos No Brasil; Biologia Clínica e Terapêutica Dos Acidentes*. Editora Sarvier, São Paulo.

Cherdchu, C., Srisukawat, K., Ratanabanangkoon K., 1978. Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae). *J. Med. Ass. Thailand* 61, 544-544.

Cherdchu, C. & Karlsson, E., 1983. Proteolytic-independent cobra neurotoxin inhibiting activity of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae). *S. E. Asian J. Trop. Med. Public Health* 14, 176-180.

Chippaux, J. P., 1998. Snake bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health. Organ 76, 515-524.

Chiu, F. L., Lin, J. K., 2005. Hplc analysis of naturally occurring methylated catechins, 3''-and 4''-methyl-epigalloccatechin gallate, in various fresh tea leaves and commercial teas and their potent inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase in macrophages. J. Agric. Food Chem. 53, 7035-7042.

Costa, A. F., 2002. Farmacognosia vol. I. Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa.

Costa, A. F., 2002. Farmacognosia vol. II. Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa.

Costa, A. F., 2002. Farmacognosia vol. III. Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa.

Da silva, J. O., Coppede, J. S., Fernandes, V. C., Sant'Ana, C. D., Ticli, F. K., Mazzi, M. V., Giglio, J. R., Pereira, P. S., Soares, A. M., Sampaio, S. V., 2005. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. Journal of Ethnopharmacology 100, 145-152.

Dell'Agli, M., Buscialà, A., Bosisio, E., 2004. Vascular effects of wine polyphenols. Cardiovascular Research 63, 593-602.

Fernandez, J., Reyes, R., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M. R., Jankowski, C., Campos, M. G., 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D₄-induced contraction in guinea-pig airways. European Journal of Pharmacology 522, 108-115.

Ferreira, L. A. F., Henriques, A. B., Andreoni, A. A. S., Vital, G. R. F., Campos, M. M. C., Habermehl, G. G., de Moraes, V. L. G. 1992. Antivenom and biological effects of Ar-tumerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Toxicon 38, 1211-1218.

Habermehl, G.G., 1998. Secondary and tertiary metabolites as plants toxins. *Toxicon* 36, 1707-1719.

Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan M. B., Kromhout, D., 1993a. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342, 1007-1011.

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H, Katan M. B., Kromhout, D., 1993b. Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Ntr. Cancer* 20, 21-29.

Hutton, R. A., Warrell, D. A. 1993. Action of snake venom components on haemostatic system. *Blood Rev.* 7, 176-189.

Itzhaki, R. F., Gill, D. M., 1964. A microbiuret method for estimating proteins. *Analitical Biochemistry* 9, 401-410.

Izidoro, L. F. M., Rodrigues, V. M. Rodrigues, R. S., Ferro, E. V., Hamaguchi, A., Giglio, J. R., Homsí-Brandeburgo, M. I. 2003. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). *Biochimie* 85, 669-675.

Kang, H. W., Yu, K. W., Jun, W. J., Chang, I. S., Han, S. B., Kim, H. Y., Cho, H. Y., 2002. Isolation and characterization of alkyl peroxy radical scavenging compound from leaves of *Laurus nobilis*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 102-108.

Kang, T. H., Jeong, S. J., Kim, N. Y., Higuchi, R., Kim, Y. C., 2000. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 321-323.

Kamiguti, A. S., Cardoso, J. L.C., 1989. Haemostatic changes caused by the venom South American Snake. *Toxicon* 27, 955-963.

Kuo, P. L., 2005. Myricetin inhibits the induction of anti-Fas IgM-, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β -mediated apoptosis by Fas pathway inhibition in human osteoblastic cell line MG-63. *Life Sciences* 77, 2964-2976.

Lee, W. J., Shim, J. Y., Zhu, B. T., 2005. Mechanisms for the inhibition of dna methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* 68, 1018-1030.

Lewis, G. P., 1987. Legumes of Bahia. 1. ed. Inglaterra: Royal botanic Gardens.

Lorenzi, H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa.

Maiorano, V. C., Marcussi, S., Daher, M. A. F., Oliveira, C. Z., Couto, L. B., Gomes, O. A., França, S. C., Soares, A. M., Pereira, P. S., 2005. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 364-370.

Markland, F. S., 1998. Snake venoms and the haemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800.

Martz, W., 1992. Plant with a reputation against snakebite. *Toxicon* 30, 1131-1142.

Meier, P. A., Stocker, K. F., 1995. Biology and distribution of venom snake of medicinal importance and the composition of snake venoms. In: Meier, J., White, J.

(Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and poisons. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 367-412.

Morikawa, K., Nnaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., Morikawa, S., 2003. Inhibitory effect of quercitrin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 74, 709-721.

Mors, W. B., 1991. Plants active against snake bite. *Economic and Medicinal Plant Research* 5, 352-382.

Mors, W. B., Nascimento, M. C., Pereira, B. M. R., Pereira, N. A., 2000. Plant natural products active against snake bite-the molecular approach. *Phytochemistry* 55, 627-642.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H., Tu, A. T., 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 231-309.

Oliveira, C. Z., Maiorano, V. A., Marcussi, S., Sant'Ana, C. D., Januário, A. H., Lourenço, M. V., Sampaio, S. V., França, S. C., Pereira, P. S., Soares, A. M., 2005. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 213-216.

Ong, K. C., Khoo, H. E., 1997. Biological effects of myricetin. *Gen. Pharmac.* 29, 121-126.

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.

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

Rizzini, C. T. 1978. Plantas do Brasil: árvores e madeira úteis do Brasil, manual de dendrologia brasileira. Edgard Blücher, São Paulo.

Robak, J., Gryglewski, R. J., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmac.* 37, 837-841.

Rodrigues, V. M.; Soares, A. M. ; Guerra-Sá, R.; Rodrigues, V; Fontes, M. R. M.; Giglio, J, R., 2000. Structural and functional characterization of neuwidase, a non hemorrhagic fibrinolytic metalloprotease from *B. neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 213-224.

Rosenfeld, G., Buckley, W., Buckley, E. E., 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in south America. *Venomous and their venoms* 2, 345-403.

Salim, E. I., Kaneko, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Fukushima, S., 2004. Lack of carcinogenicity of enzymatically modified isoquercitrin in F344/DuCrj rats. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1949-1969.

Schery, R. W., 1951. Leguminosae-Caesalpinioidea. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 38, 1-94.

Simões, C. M. O., 2003. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC.

Soares, A. M., Januário, A. H., Lourenço, M. V., Pereira, A. M. S., Pereira, P. S., 2004. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. *Drugs of the Future* 29, 1105-1117.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579, 200-213.

Standley, P. C., Steyermark, J. A., 1946. Leguminosae. *Fieldiana Bot.* 24, 1-425.

Sutherland, B. A., Rahman, R. M. A., Appleton, I., 2006. Mechanisms of action of green tea catechins with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 291-306.

Ticli, F. K., Hage, L. I. S., Cambraia, R. S., Pereira, P. S. Magro, A. J., Fontes, M. R. M., Stábeli, R. G., Giglio, J. R., França, S. C., Soares, A. M., Sampaio, S. V., 2005. Rosmaric acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 46, 318-327.

Tzeng, S. H., Ko, W. C., Ko, F. N., Teng, C. M., 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavanoids. *Thromb. Res.* 64, 91-100.

Varred, S. K., Schutzki, R. E., Nair, M. G. Lipid peroxidation cyclooxygenase enzyme and tumor cell proliferation inhibitory compounds in *Cornus kousa* fruits. *Phytomedicine*, article in press.

Vitor, R. F., Mota-Felipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. I., Teixeira, A., Paulo, A., 2004. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 363-370.

Wang, S., Noh, S. K., Koo, S. I., 2006. Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A₂ and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, article in press.

Yesilada, E., Tsuchiya, K., Takaishi, Y., Kawazoe, K., 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging flavanoid glycosides from the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation. Journal of Ethnopharmacology 73, 471-478.

Anexo:

NORMAS PARA CONFEÇÃO DA VERSÃO FINAL DO MESTRADO/DOCTORADO

I. Capa

deve constar:

- Universidade Federal de Uberlândia
- Instituto de Genética e Bioquímica
- Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
- Título da Tese
- Nome do aluno
- Uberlândia-MG
- Ano da Defesa

II. Papel: Tamanho A4

Margens

Superior 3,0cm
Inferior 2,5cm
Esquerda 3,0cm
Direita 2,5cm ou 24 pt

Fonte: Arial 12, espaço 1,5

III. Ordenação do Conteúdo

O Mestrado e o Doutorado serão escritos sob a forma de Capítulo(s). Tanto o boneco quanto a versão final deverão ter a seguinte forma:

- 1 Capa (Anexo I)
- 1 Contra capa identificando: Curso, Título, Aluno, Orientador, Informes sobre a titulação, cidade e ano. (Anexo II)
- Ficha Catalográfica: Deve ser colocada nas costas da CONTRA CAPA (Anexo III)
- Palavras-chave: Deve ser colocada abaixo da Ficha Catalográfica na CONTRA CAPA (Anexo III)
- Folha de Rosto com Curso, Título, Aluno, Comissão Examinadora, Cidade e Data (Anexo IV)
- Dedicatória
- Agradecimentos
- Índice/Sumário;

- **Introdução**

1. deverá ser uma síntese do tema pesquisado, situando-o em um contexto geral sobre o conhecimento atual do assunto.
2. Não deverá trazer citações bibliográficas.
3. Será finalizada com a apresentação do(s) capítulo(s) com enfoque no(s) objetivo(s) do(s) capítulo(s).

- Quanto à **revisão da literatura**, a mesma **poderá ou não** estar na dissertação/tese, em se optando por colocá-la deverá ser apresentada na forma de capítulo e, neste caso, dispensasse tanto o resumo quanto o abstract do referido capítulo

- **Capítulo(s):**

- Título
- resumo e abstract referentes ao capítulo
- Se o Capítulo foi publicado, pode ser apresentado tanto na forma de separata quanto na forma do texto original do editor de texto, se foi ou está para ser submetido, constar a Revista.
- Cada Capítulo (01 ou mais) deve ser escrito em conformidade com uma Revista de Divulgação Científica escolhida pelo Aluno e seu Orientador.
- O Capítulo pode ser escrito somente em **Português** ou **Inglês**.

- **OPCIONAL**

1. Anexar, ao final da Dissertação/Tese, os Protocolos utilizados em Metodologia para desenvolvimento da Pesquisa
2. Fazer um Capítulo com RESULTADOS COMPLEMENTARES - para resultados que ainda serão completados para fins de publicação, mas que são relevantes e merecem uma Short Communication (nota prévia)

ANEXO I

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

TÍTULO**Aluno:****Orientador:****Co-Orientador:** (se houver)

UBERLÂNDIA - MG
ANO

ANEXO II

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

TÍTULO**ALUNO****Orientador:****Co-Orientador: (se houver)**

**Disertação (ou Tese) apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre (ou
Doutor) em Genética e Bioquímica
(Área Genética ou Área
Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA-MG
ANO**

ANEXO III

No verso da Contra Capa

<u>Sobrenome, nome, ano nascimento</u> - - Uberlândia: <u>Ano da Defesa</u> <u>Nº total de folhas;</u>, <u>Nº total de fotos</u> <u>Nome do Orientador</u> Tese de Mestrado (ou Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia. Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Inclui Bibliografia 1. <u>Palavra chave</u> - Teses. 2. <u>Palavra chave</u> - Teses. 3. <u>Palavra Chave</u> - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia. Coordenação de Pós- Graduação em Genética e Bioquímica. CDU <u>xxxxxx</u>
--

PALAVRAS-CHAVE DO TRABALHO: (informar no mínimo 03 palavras-chave).

IMPORTANTE: *A ficha será confeccionada pelo Setor da Biblioteca campus St^a. Mônica, 2º pavimento, fone 32394257 no horário das 08:00 às 12:00 e das 13:30 às 17:30 apresentando: a obra (boneco) antes do encaminhamento a gráfica.*

ANEXO IV

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

TÍTULO**ALUNO****COMISSÃO EXAMINADORA****Presidente:** _____(Orientador)**Examinadores:**

Data da Defesa: ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)