



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

***Estudo da ação antiofídica e da toxicidade
aguda do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba****

Mirian Machado Mendes

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

Junho—2007

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

***Estudo da ação antiofídica e da toxicidade
aguda do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba****

Mirian Machado Mendes

Prof. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

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

Junho—2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M538e Mendes, Mirian Machado, 1981-
 Estudo da ação antiofídica e da toxicidade aguda do extrato aquoso
 de *Schizolobium parahyba* / Mirian Machado Mendes. - 2007.
 77 f. : il.

 Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
 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. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de Uber-
 lândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.99:598.126

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MIRIAN MACHADO MENDES

Estudo da ação antiofídica e da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente:

Dra.: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores:

Dr.: Consuelo Latorre Fortes Dias

Dra.: Eliane Candiani Arantes

Data da Defesa: 27/02/2007

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

*“Pesquisa é ver o que todos os outros vêem;
e pensar o que ninguém pensou”*

Albert Szent-Gyorgyi

Dedicatória

A DEUS

Que me conhece antes da minha formação

Que me dá ânimo para enfrentar todas as lutas

Que me dá força para levantar mesmo depois das derrotas

Que misericordiosamente me concedeu e tem concedido muito mais vitórias.

*"E eu desistiria da eternidade para tocar você
Pois eu sei que de algum modo, você me sente
Você é o mais próximo do céu que eu já estive"*

Íris – Goo Goo Dolls

*Ao Ricardo, meu querido e amado namorado, cúmplice e amigo em quem encontro
qualidades e princípios raros. Tenho muito a agradecer pelo amor, paciência e carinho a
mim dedicados.*

Aos meus pais: Mãe você faz parte dessa conquista e as palavras são poucas para expressar minha gratidão. Pai se você estivesse aqui sei que estaria muito orgulhoso e pensando o quanto me pareço com você, e teria razão. Obrigada, vocês sempre permanecerão sendo meu referencial.

Agradecimentos

*“A verdadeira Fidalguia é a ação. O que fazeis
é o que sois.”*

Antonio Vieira

- 🍷 À professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela orientação, pela disponibilidade em sempre auxiliar em meus trabalhos, pela preocupação com a qualidade de nossos resultados e com a forma com estes seriam apresentados.
- 🍷 À amiga Veri, que é uma pessoa encantadora e que esconde dentro de si uma guerreira que vence com serenidade as dificuldades que surgem, uma pessoa admirável.
- 🍷 À professora Dra. Maria Inês Homs-Brandeburgo pela oportunidade de começar a trabalhar com Bioquímica, tenho muito a agradecer pela confiança, pela alegria contagiante ao ver nosso progresso e pela amizade.
- 🍷 À Dra. Tânia Machado de Alcântara pelo valioso auxílio com as análises histológicas, pela paciência e pela simpatia.
- 🍷 À Dra. Amélia Hamaguchi
- 🍷 Ao meu amigo Robson pelo auxílio durante os experimentos, trabalhar com você é muito gratificante. É muito bom encontrar alguém que também é apaixonado por plantas medicinais
- 🍷 Ao meu amigo Luiz Fernando, a quem só tenho a agradecer pela ajuda, pelas discussões sempre proveitosas e por nossa amizade
- 🍷 À Carolina pela amizade sincera e verdadeira e pelo auxílio na execução dos experimentos procurando sempre ser objetiva. Essa é uma característica muito valiosa

- 🍷 Ao “trio” recém chegado o Laboratório: Jael, Malson e Sâmela. Vocês são “pessoas” maravilhosas que tem tudo para um futuro cheio de vitórias. É meio “cafona” mas vocês deixam os meus dias mais alegres quando trabalhamos todos juntos.
- 🍷 A amiga Elaine pelo auxílio e pelos momentos descontraídos que passamos juntas. Marjorie é uma "mocinha" de sorte por ter você como mãe.
- 🍷 À Daiana pela disponibilidade, profissionalismo em sempre ajudar no que for necessário e pela amizade.
- 🍷 Ao meu amigo Leonardo, a quem admiro pela bondade e simpatia.
- 🍷 Ao amigo Luís Carlos que consegue tornar o ambiente sempre mais alegre e que sempre que pode ajuda.
- 🍷 À amiga Luciana que busca trabalhar em equipe, trocar idéias, projetar experimentos. É muito bom trabalhar assim e com pessoas como você
- 🍷 Ao amigo Mário Sérgio que apesar de ser baiano não tem “sotaque”, foi muito bom conviver com você esses dois anos. Muito obrigada pela amizade
- 🍷 À Dra. Herica de Lima Santos que apesar de ter passado pouco tempo no laboratório ajudou muito
- 🍷 Aos colegas Fábio Lucas, Luís Henrique, Débora, Jordano, Johara e Renata
- 🍷 Aos funcionários do Instituto: Marlene, Tianinha, Cleuber, Gerson, Sr. Vilmar e Dona Nenzinha.
- 🍷 À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação) e à Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio financeiro

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Sumário

Apresentação	1
Capítulo 1: Peçonhas de Serpentes e sua Inibição por Extratos Vegetais	4
1.1 Introdução Geral	5
1.1.1 As serpentes e o homem	5
1.1.2 Epidemiologia e importância médica	5
1.1.3 A peçonha	7
1.1.4 Os efeitos do envenenamento crotálico	14
1.1.5 A terapia	14
1.1.6 Os Extratos Vegetais	15
1.1.7 Toxicidade de extratos vegetais	17
1.2 Referências	20
Capítulo 2: Propriedades Antiofídicas do extrato aquoso das folhas de <i>Schizolobium parahyba</i> (Caesalpinoideae)	30
2.1 Introdução	33
2.2 Materiais e Métodos	35
2.2.1 Preparação das peçonhas e toxinas	35
2.2.2 Animais	35
2.2.3 Preparação do extrato vegetal	35
2.2.4 Ensaios de Neutralização	35

2.2.4.1	Atividade PLA ₂	36
2.2.4.2	Atividade Coagulante	36
2.2.4.3	Atividade proteolítica sobre Fibrinogênio	37
2.2.4.4	Atividade Hemorrágica	37
2.2.4.5	Atividade Miotóxica	37
2.2.4.6	Análise Histopatológica	37
2.2.4.7	Determinação de plaquetas e fibrinogênio plasmático .	38
2.2.5	Análise Estatística	38
2.3	Resultados	38
2.3.1	Neutralização das atividades enzimáticas das peçonhas brutas e Toxinas	38
2.3.2	Inibição dos efeitos Biológicos das peçonhas brutas e Toxinas .	39
2.4	Discussão	40
2.5	Agradecimentos	43
2.6	Referências	50

Capítulo 3: Estudo da toxicidade aguda do extrato vegetal aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i>		55
3.1	Introdução	58
3.2	Materiais e Métodos	59
3.2.1	Extrato vegetal	59
3.2.2	Animais	59
3.2.3	Toxicidade aguda	59
3.2.4	Análise do sangue	60
3.2.4.1	Testes bioquímicos	60

3.2.4.2	Parâmetros hematológicos	60
3.2.4.3	Análise histológica	60
3.2.5	Análise Estatística	61
3.3	Resultados e Discussão	61
3.3.1	Toxicidade aguda	61
3.4	Conclusões	64
3.5	Agradecimentos	64
3.6	Referências	69
Anexos		72

Lista de Figuras

1	Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	6
2	Serpente <i>Bothrops pauloensis</i>	6
3	Estrutura do fibrinogênio	11
4	Diagrama esquemático da divisão das metaloproteinases de venenos de serpentes, conforme a composição estrutural das enzimas	11
5	Diagrama esquemático da divisão das metaloproteinases de venenos de serpentes, com modificações propostas por FOX & SERRANO (2005) ⁵⁰	13
6	<i>Schizolobium parahyba</i>	18
7	Inibição da proteólise do fibrinogênio induzida pela peçonha de <i>Bp</i> pelo extrato aquoso de <i>Sp</i>	45
8	Inibição da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>Bp</i> pelo extrato aquoso de <i>Sp</i>	46
9	Inibição da atividade miotóxica das peçonhas de <i>Bp</i> , <i>Cdt</i> e suas toxinas isoladas pelo extrato de <i>Sp</i>	47
10	Análise histopatológica do músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss após 24 horas da injeção da peçonha de <i>Bp</i>	48
11	Inibição do decréscimo do número de plaquetas e níveis de fibrinogênio plasmáticos após a injeção de <i>Bp</i> pelo extrato de <i>Sp</i> extract	49
12	Análise Histopatológica do fígado de camundongos inoculados com 2 mg de <i>Sp/g</i> animal	67

Lista de Tabelas

1	Neutralização das atividades coagulante e fosfolipásica de Peçonhas Brutas e Toxinas Isoladas	44
2	Determinação da toxicidade aguda do extrato aquoso de <i>Schizolobium parahyba</i> administrado por via intraperitoneal em camundongos	65
3	Ingestão de água e alimento de camundongos 24 horas após a inoculação de 2 mg/g de <i>Sp</i> por via intraperitoneal	65
4	Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com 2 mg de extrato de <i>Sp</i> por grama de animal	66
5	Efeito do extrato de <i>Sp</i> sobre as células do sangue	68

Lista de Abreviaturas

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransaminase
<i>Bp</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>
<i>Cdt</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
DMH	dose minima hemorrágica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico
new	Newviedase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	tampão fosfato salina
PLA ₂	fosfolipase A ₂ (E.C.3.1.1.4)
RBC	eritrócitos (Red Blood Cell)
<i>Sp</i>	<i>Schizolobium parahyba</i>
TP	tempo de protrombina
WBC	leucócitos (White Blood Cell)

Apresentação

As plantas medicinais constituem um reservatório de princípios ativos que podem ser usados como remédios para uma infinidade de patologias. A busca de plantas úteis para a saúde humana nos conhecimentos populares é de grande importância para a ciência, uma vez que essas informações podem indicar quais as plantas que podem atuar sobre determinadas doenças. A comunidade científica mundial e do Brasil nos últimos anos têm reconhecido a magnitude da importância do estudo das plantas de nossa flora, e muitas agências de fomento têm liberado um grande montante de recursos para financiar pesquisas que visem identificar, isolar e caracterizar princípios ativos de plantas.

Os envenenamentos ofídicos constituem um problema de saúde pública no Brasil devido a grande incidência de acidentes e a gravidade dos efeitos. Devido aos envenenamentos as vítimas podem chegar ao óbito ou muitas vezes em decorrência dos efeitos da peçonha sofrem perdas de tecido ou mesmo a amputação do membro atingido principalmente em acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*. A única terapia disponível é a soroterapia que não consegue reverter os efeitos locais principalmente de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, devido à dificuldade de difusão do soro até os tecidos e a rápida difusão das toxinas ao redor do local da picada. Outro problema enfrentado em relação ao uso do soro é que muitas vezes este não está disponível para populações de regiões mais distantes e carentes, restando a essas pessoas tratamentos alternativos como o uso de plantas que podem ou não exibir o efeito esperado. Casos de intoxicações com plantas são bastante comuns, já que no imaginário popular as plantas medicinais atuam de forma “mágica” não exibindo nenhum efeito colateral ou prejudicial à saúde de quem as consome. Entretanto isso não corresponde à verdade. As plantas, como todo produto estranho ao organismo, provocam respostas que podem ser benéficas ou não ao indivíduo. Assim o estudo da toxicidade de plantas usadas como medicamentos deve ser realizado a fim de conhecer se os efeitos benéficos induzidos pela planta compensam realmente seu uso.

Schizolobium parahyba, uma árvore de 10 a 30 m de altura, é uma espécie que ocorre em regiões de Mata Atlântica, conhecida popularmente por faveira, guapuruvú ou umbela, pertence à família das Leguminosas (Caesalpinoideae). Pessoas leigas da

região do Triângulo Mineiro (Minas Gerais) utilizam as folhas e sementes de *Schizolobium parahyba* contra o ofidismo na forma de chás e infusões.

Este trabalho buscou avaliar a capacidade do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* em inibir os principais efeitos enzimáticos e biológicos da peçonha de *Bothrops pauloensis* e da peçonha de *Crotalus durissus terifficus* e algumas de suas toxinas isoladas. Também foi avaliado o efeito protetor do extrato de *Schizolobium parahyba* quando ensaiado como tratamento administrado posteriormente no mesmo local da injeção da peçonha. A toxicidade aguda do extrato de Sp também foi determinada.

A apresentação desse trabalho foi realizada segundo as normas da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (anexos, página 73). A dissertação foi dividida em: **Capítulo 1** - Introdução ou Revisão de literatura sobre os aspectos epidemiológicos do envenenamento ofídico, características estruturais e funcionais de constituintes das peçonhas de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* e uma revisão sobre extratos vegetais; **Capítulo 2** - Estudo das propriedades antiofídicas do extrato de *Schizolobium parahyba* e seu uso como tratamento local (artigo submetido recentemente ao *Phytotherapy Research*) e **Capítulo 3** - Estudo da toxicidade aguda do extrato de *Schizolobium parahyba* (artigo em preparação).

Capítulo 1

Peçonhas de Serpentes e sua Inibição por Extratos Vegetais

1.1 Introdução Geral

1.1.1 As serpentes e o homem

As serpentes peçonhentas ou não sempre exerceram fascínio nos homens. Para alguns povos orientais elas representaram deuses e para outros povos as serpentes eram personificações do mal^[1]. No Brasil durante o período de colonização dos portugueses que primeiro idealizaram o paraíso devido à exuberância da paisagem, após meio século da descoberta os relatos enviados a metrópole eram permeados de apreensão devido à presença de muitos animais estranhos aos olhos dos europeus e entre os animais citados estão as serpentes como mostra a carta de José de Anchieta em 31 de maio de 1560^[2]

“[...]há os que são desconhecidos nessa parte do mundo. Primeiramente direi das diversas espécies de cobras venenosas. Umas chamam se jararacas, muitíssimo freqüentes nos campos e nos matos e até nas próprias casas onde muitas vezes encontramos; cuja mordedura mata no espaço de 24 horas [...]”

Hoje as serpentes peçonhentas ainda despertam o fascínio tanto pelo risco que oferecem e pela letalidade das peçonhas quanto pela beleza e comportamento. Entretanto as serpentes podem ser admiradas também pela infinidade de compostos farmacologicamente ativos que têm sido descobertos em suas peçonhas, sendo que muitos destes com aplicações na saúde humana.

1.1.2 Epidemiologia e importância médica

Há atualmente cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil estão representadas 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies correspondendo a 10% do total de espécies conhecidas^[2]. Essas 321 espécies estão distribuídas em quatro principais famílias: Colubridae (189 espécies), Boidae (10 espécies), Viperidae (22 espécies) e Elapidae (18 espécies)^[2]. As espécies peçonhentas brasileiras estão reunidas em duas principais famílias, Elapidae e Viperidae. Dentro da família Elapidae está o gênero *Micrurus* que compreende as serpentes



Figura 1: Serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Fonte www.bioterium.com.br acesso 10/12/2006

sendo que a mais conhecida é *Crotalus durissus terrificus* (fig. 1). A característica mais marcante dessas serpentes é a presença de um guizo ou chocalho na extremidade caudal. Essas serpentes habitam geralmente ambientes mais secos e são pouco agressivas^[2].

O gênero *Bothrops* possui mais de 30 espécies e subespécies que estão distribuídas do sul do México até a Argentina e em algumas ilhas do Caribe^[3]. No gênero *Bothrops* as espécies *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*,



Figura 2: Serpente *Bothrops pauloensis*. Fonte:

www.bioterium.com.br acesso 10/12/06

rabo branco ou jararaca pintada foi descrita por^[5]. Era considerada uma única espécie com 12 subespécies, entretanto após uma revisão sistemática em 2000^[6] as 12

conhecidas como corais. A família Viperidae engloba três gêneros *Crotalus* que compreende as cascavéis, o gênero *Bothrops* que engloba as serpentes conhecidas como jararacas e o gênero *Lachesis* que representa as surucucus^[2].

O gênero *Crotalus* está representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus*, que apresenta cinco formas geográficas

Bothrops jararaca, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos do Brasil. Em geral habitam ambientes úmidos como matas, possuem hábitos noturnos, são muito agressivas e se ameaçadas atacam em silêncio^[4]. A espécie *Bothrops neuwiedi* conhecida popularmente por jararaca do

subespécies foram elevadas a sete espécies distintas. Essa classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia-SBH (2005) e assim a espécie *Bothrops neuwiedi pauloensis* (fig. 2) passou a ser *Bothrops pauloensis*.

Estima-se que acidentes ofídicos afetem mais que 2,5 milhões de pessoas anualmente no mundo, dos quais 100 mil resultam em morte^[7]. No Brasil a epidemiologia dos acidentes ofídicos aponta para um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos. A maioria desses acidentes é atribuída ao gênero *Bothrops* (90,5%), seguido dos gêneros *Crotalus* (7,7%), *Lachesis* (1,4%) e *Micrurus* (0,4%)^[8]. No Triângulo Mineiro, os acidentes ofídicos confirmados foram causados principalmente por serpentes das espécies: *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*^[9, 10]. A letalidade dos acidentes com serpentes do gênero *Crotalus* é a maior; cerca de 1,8% de óbitos, seguido por acidentes causados por serpentes do gênero *Lachesis* (0,9%), *Micrurus* (0,4%) e por fim o gênero *Bothrops* (0,3%)^[8].

1.1.3 A peçonha

As peçonhas de serpente são provavelmente as mais complexas de todas as peçonhas animais. Cerca de 90 a 95% de seu peso seco é constituído por proteínas compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas, podendo exercer diferentes atividades farmacológicas^[11]. De acordo com as características funcionais e estruturais as proteínas existentes nas peçonhas de serpentes podem ser divididas em classes como fosfolipases A₂, miotoxinas, metaloproteases, serinoproteases, L-amino oxidases dentre outras.

Enzimas Fosfolipases A₂ (PLA₂) constituem uma superfamília de diferentes enzimas que podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com suas fontes, seqüências e características bioquímicas^[12, 13]. As PLA₂ de classes I, II e III são cálcio dependentes e estruturalmente diferentes das PLA₂ da classe IV. As Fosfolipases A₂ existentes nas peçonhas são das classes I e II^[13]. Na peçonha existem ainda enzimas fosfolipases (A₁, C, D) que agem em diferentes posições do substrato, liberando diferentes produtos. A fosfolipase A₂ (PLA₂) é uma das enzimas mais abundantes nas peçonhas de serpentes^[14] e pode ser encontrada também em artrópodes e no

suco pancreático^[15]. Esta enzima apresenta importante papel no catabolismo dos lipídios da dieta e no metabolismo geral de lipídios estruturais de membrana. São enzimas hidrolíticas que clivam fosfolipídios, hidrolisando a ligação acil na posição 2 do fosfoglicerídio^[16], liberando como produto final o lisofosfatídeos e o ácido graxo, que pode ser o ácido araquidônico.

Existem depositadas em bancos de dados 280 seqüências de PLA₂ que apresentam de 40 a 99% de similaridade na sua seqüência quando comparadas. As PLA₂ também apresentam significativa similaridade em seu “folding” ou dobramento tridimensional^[17]. As PLA₂ de peçonhas geralmente se apresentam como monômeros de aproximadamente 14 kDa, sendo enzimas com estrutura terciária rígida devido à presença de 5 a 8 pontes dissulfeto^[18] conferindo a estas enzimas grande estabilidade. Podem ser classificadas como Asp49, Ser49, Arg49, Asn49 ou Lys49 dependendo do resíduo de aminoácidos na posição 49 da seqüência polipeptídica. As PLA₂ Ser49 são Ecarfolin S, uma toxina de *Echis carinatus sochureki*^[19] e Ammodytin L, uma PLA₂ de *Vipera ammodytes ammodyte*^[20]. Já as PLA₂ Asn49 são: TsR6 e CTs-R6 purificadas da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* e TM-N49 isolada da peçonha de *Protobothrops mucrosquamatus*^[21] e por fim, hoje a única PLA₂ Arg49 descoberta é a Zhaoermiatoxin isolada da peçonha de *Zhaoermia mangshanensis*^[22].

As PLA₂ mais abundantes são as Asp49 e Lys49 encontradas na grande maioria das peçonhas da família Viperidae. Enquanto as Lys49 possuem pouca ou nenhuma atividade catalítica as PLA₂ tipo Asp49 são enzimaticamente ativas^[23]. A carga negativa do resíduo aspartato possibilita que íons cálcio se liguem as PLA₂, atuando como um cofator que estabiliza um intermediário tetraédrico durante a reação catalítica^[24] propiciando a catálise.

As Fosfolipases A₂ são capazes de induzir um largo espectro de efeitos farmacológicos como mionecrose, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hemólise, edema e ação anticoagulante^[25, 26]. A mionecrose ou necrose muscular é uma característica comum de envenenamento por espécies botrópicas. Segundo MEBS & OWNBY (1990)^[27], miotoxicidade pode ser definida como uma ação específica de PLA₂s no músculo esquelético, afetando somente fibras musculares, sendo que outros tecidos como tecido conjuntivo, nervos e vasos permanecem essencialmente intactos.

O mecanismo molecular pelo qual as PLA₂ induzem a necrose muscular foi proposto inicialmente por GUTIÉRREZ & LOMONTE (1995)^[28]. Os autores propuseram que as miotoxinas Lys-49 se ligam a sítios não identificados na membrana sarcoplasmática provocando interação eletrostática entre o sítio catiônico da toxina com grupos carregados negativamente na membrana. Em seguida, a miotoxina penetraria na bicamada por meio de interações hidrofóbicas, fazendo com que a região citotóxica da molécula cause a desorganização e conseqüente rompimento da membrana plasmática levando a perda da permeabilidade seletiva e causando um grande influxo de cálcio, o qual provoca uma série de processos degenerativos que levam a um rápido efluxo de moléculas citosólicas como: creatina kinase, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, mioglobina e creatinina^[29, 30]. Para explicar a grande diversidade de efeitos farmacológicos induzidos pelas PLA₂ foi proposto que estas moléculas teriam sítios ou moléculas alvo^[25, 17], ou seja, cada tecido em particular apresentaria “sítios alvos” específicos na superfície celular onde as PLA₂ poderiam se ancorar e desenvolver sua atividade.

Algumas miotoxinas foram isoladas da peçonha de *Bothrops neuvi* pauloensis, hoje denominada *Bothrops pauloensis*: BnSP6 e BnSP7 ambas Lys-49^[31], duas A₂Asp49 BnTx-I e BnTx-II^[32]. As PLA₂ BnSP6 e BnSP7^[31] são proteínas com peso molecular entre 13,5 e 14 kDa, podendo apresentar-se na forma dimérica. Apresentam conteúdo de aminoácidos bastante similar, com alto conteúdo de resíduos básicos e hidrofóbicos. Ambas são capazes de produzir necrose das fibras musculares de camundongos e não apresentam atividades fosfolipásica ou coagulante^[31, 33].

Também são encontradas nas peçonhas de serpentes as serinoproteases que são enzimas que afetam o sistema hemostático das vítimas de acidentes ofídicos. As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSP) podem atuar sobre as proteínas da cascata de coagulação e no sistema fibrinolítico^[34]. Essas enzimas podem representar até 20% do conteúdo protéico total de algumas peçonhas das famílias Viperidae e Crotalinae^[35], geralmente contem em média 235 resíduos de aminoácidos dos quais 12 resíduos são de cisteína, dos quais 10^[36] ou 12^[37] formam pontes dissulfeto. São sintetizadas na forma de zimogênios.

A maioria das SVSPs clivam apenas um fibrinopeptídeo das cadeias do fibrinogênio

(fig. 3) e a minoria é capaz de clivar os dois fibrinopeptídeos e assim devido a essa ação similar a trombina as SVSP são conhecidas como “Thrombin-Like”^[38]. Por não promoverem a dupla clivagem dos fibrinopeptídeos e não ativarem o fator XIII da cascata de coagulação o coágulo formado pela ação das SVSP é um coágulo com aparência frouxa, diferente do coágulo formado pela ação da trombina que promove as ligações cruzadas^[39, 38]. A batroxobina purificada da peçonha de *B. atrox* é um exemplo de serinoprotease que cliva apenas o fibrinopeptídeo **A**^[40] e, portanto promove a formação de um coágulo “frouxo”. As toxinas “Thrombin-Like” são capazes de fazer a ativação de alguns dos fatores da coagulação como o X e V causando o consumo de fibrinogênio, e dessa foram interferindo na formação da rede de fibrina^[41]. Devido à esta capacidade de interferir na cascata de coagulação sangüínea estão relacionadas ao quadro de coagulopatia.

A coagulopatia é uma das maiores complicações dos acidentes com serpentes das famílias Viperidae e Crotalinae e resulta principalmente do sinergismo das enzimas “Thrombin-Like” e procoagulantes^[34, 42]. Como essas enzimas provocam o consumo de fibrinogênio o resultado é que frequentemente as vítimas apresentam o sangue incoagulável^[42]. Quando administradas “in vivo” causam efeito desfibrinogenante, tornando o sangue incoagulável por depletar o estoque de fibrinogênio plasmático, sendo utilizadas na medicina como agente antitrombótico, podendo até mesmo desfazer coágulos. Quando ensaiadas “in vitro” apresentam ação procoagulante^[34]. As enzimas, “Thrombin-Like” têm aplicação terapêutica na prevenção e tratamento de distúrbios tromboticos bem como na produção de cola de fibrina, que é um adesivo biológico, sendo utilizado para aumentar o poder de cicatrização em suturas^[43].

O medicamento Defibrase® (Pentapharm) ou Batroxobina isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* é um potente agente usado no tratamento e diagnóstico de distúrbios do sistema hemostático. A Batroxobina cliva apenas o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio promovendo sua remoção da circulação rapidamente e conseqüentemente promove a defibrinação terapêutica. Com a mesma aplicação ainda existem outros medicamentos como a Reptilase® isolada da peçonha de *Bothrops atrox*^[44].

As metaloproteases constituem outra importante classe de proteínas, diretamente relacionadas com o quadro hemorrágico característico do envenenamento botrópico.

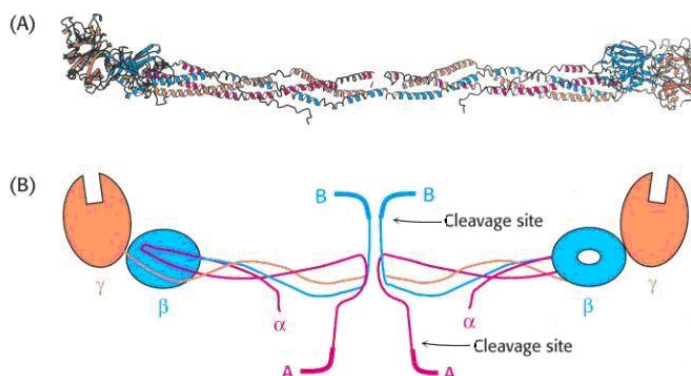


Figura 3: Estrutura do fibrinogênio. (A) (B) esquema da estrutura do fibrinogênio mostrando as cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ e os fibrinopeptídeos A e B. Fonte: <http://oregonstate.edu/instruction/bb450/lecturenoteskevin/regulatorystrategiesoutline.html>

São enzimas extremamente versáteis, exibindo uma grande diversidade estrutural e funcional^[45]. Classicamente conhecidas por toxinas hemorrágicas, as metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMP) nem sempre provocam hemorragia. São sintetizadas nas

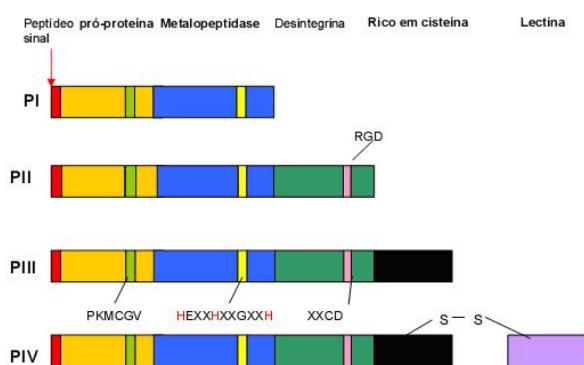


Figura 4: Diagrama esquemático da divisão das metaloproteínases de venenos de serpentes, conforme a composição estrutural das enzimas. Fonte: BJAR-NASON & FOX (1994)^[46]

glândulas de peçonha em forma de zimogênio que contem uma sequência que é perdida após um processamento proteolítico, resultando na ativação destas enzimas^[47]. São enzimas zinco dependentes, ou seja, precisam deste íon como cofator. A massa molecular dessas toxinas pode variar de 20 a 100 kDa^[48, 49, 46]

As SVMP são divididas em quatro classes: A classe PI inclui proteínas de 20 a 30 kDa com baixa ou nenhuma atividade hemorrágica e três domínios estruturais, já as metaloproteases de classe PII incluem proteínas com massa de 30 a 60 kDa, possuem os domínios das metaloproteases de

classe PI e mais um domínio desintegrina, a classe III compreende proteínas altamente hemorrágicas que tem massa entre 60 e 80 kDa com um domínio semelhante à desintegrina e um domínio rico em cisteína e por fim as SVMP de classe IV que apresentam massa entre 80 e 100 kDa e possuem além dos demais domínios um domínio ligante de lectina^[46]. Essa classificação foi revista e atualizada no ano de 2005^[50]. Esta reclassificação aconteceu depois que a hipótese de que as desintegrinas na forma livre eram liberadas de grandes precursores contendo um domínio metaloprotease^[46] foi contrariada por recentes descobertas que sugerem que pode haver uma origem alternativa para as moléculas de desintegrinas. OKUDA et al. (2002)^[51] e posteriormente, FRANCISCHETTI et al. (2004)^[52] relataram a síntese de precursores sem o domínio metaloprotease, possuindo apenas um peptídeo sinal, pró-domínio e domínio desintegrina. Na nova classificação foram incluídas novas classes: precursores PIIa-PII que em sua forma madura não liberam o domínio desintegrina; precursores PIIB-PII que em sua forma madura se apresentam como SVMP diméricas. Precursores D-I são proteínas que não apresentam o domínio metaloprotease; precursores PIIIa-PIII são capazes de liberar seus domínios desintegrina e o domínio rico em cisteína e por fim a classe de precursores PIIIb-PIII que formam SVMPs diméricas, como mostra a figura 5.

As metaloproteases agem diretamente na membrana basal dos vasos sanguíneos provocando a digestão de suas proteínas tais como colágeno tipo IV, laminina, nidogênio, fibronectina, proteoglicanos, heparan sulfato^[49, 53] que juntas asseguram a integridade dos vasos sanguíneos. A ação proteolítica de SVMP sobre esses componentes pode provocar hemorragia no tecido afetado. Na tentativa de compreender a hemorragia induzida por metaloproteases hemorrágicas dois mecanismos foram propostos: a hemorragia “per rhexis” e hemorragia por “diapedesis”. A hemorragia “per rhexis” é caracterizada pelo inchaço e rápido rompimento da membrana das células do endotélio. O endotélio rompido permite que o sangue passe para o tecido ao redor do vaso afetado^[49]. A hemorragia por “diapedesis” ocorre devido ao rompimento das junções entre as células vizinhas, não havendo alterações no espaço intracelular^[49, 45].

Os efeitos locais causados pelas metaloproteases além do quadro de hemorragia local são geralmente danos aos tecidos musculares agravando muito a intensidade dos

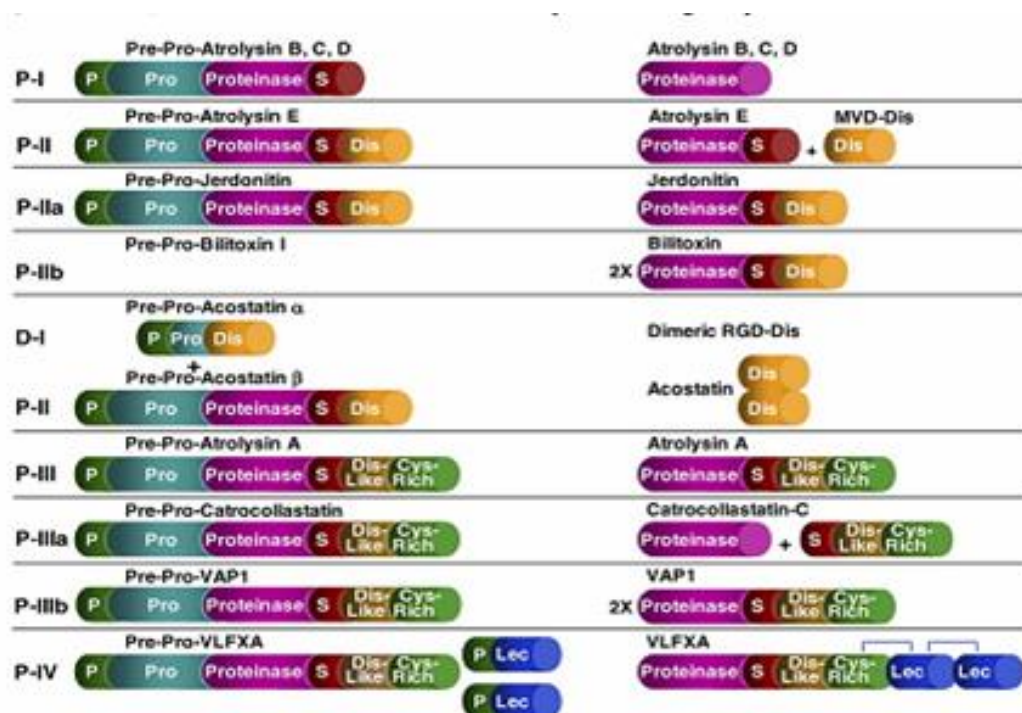


Figura 5: Diagrama esquemático da divisão das metaloproteínas de venenos de serpentes, com modificações propostas por FOX & SERRANO (2005)^[50]. Fonte: FOX & SERRANO (2005)^[50]

efeitos locais tão característicos das peçonhas botrópicas. GUTIÉRREZ et al. (1995)^[54] sugere que o dano às células musculares ocorre secundariamente devido à isquemia causada pelo déficit de sangue ocasionado pela hemorragia nos tecidos próximos a picada. A necrose provocada pela ação de SVMP ou pela peçonha total é mais grave que as lesões necróticas provocadas por miotoxinas isoladas. Geralmente o tecido que foi inoculado com miotoxina depois de 2 semanas substitui o tecido necrótico por tecido muscular enquanto que a regeneração do músculo inoculado com a peçonha bruta não acontece e o tecido necrosado é substituído por tecido fibroso, não funcional. Provavelmente a destruição da microvasculatura pelas metaloproteases é responsável pela não regeneração da área afetada^[55, 45]

Muitas metaloproteases de peçonhas de serpentes já foram isoladas, com destaque ao presente trabalho pode se citar a “Neuwiedase” uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (*B. pauloensis*) que representa aproximadamente 4,5% da massa total da peçonha, e apresenta massa molecular de aproximadamente 24 kDa sendo, portanto uma metaloprotease de Classe PI. Não apresenta

ação hemorrágica, no entanto possui atividade proteolítica sobre vários substratos como o fibrinogênio, fibrina, componentes da matriz extracelular, etc^[56].

1.1.4 Os efeitos do envenenamento crotálico

Os envenenamentos crotálicos são caracterizados por manifestarem efeitos sistêmicos caracterizados por náuseas, cefaléia, prostração^[57]. As principais manifestações clínicas causadas por picadas de serpentes do gênero *Crotalus* são atribuídas a componentes neurotóxicos, miotóxicos e “Thrombin-Like”^[58]. A peçonha crotálica apresenta ação neurotóxica que é exibida após 3 horas do envenenamento com a “fácies miastêmica” com “ptose palpebral” e flacidez da musculatura da face. Esse efeito é causado por bloqueios neuromusculares seguidos de paralisia motora e respiratória. As principais toxinas responsáveis por esses efeitos são a Crotoxina (a toxina mais abundante na peçonha de *Crotalus spp* constituída pelas subunidades crotapotina ou componente CA e fosfolipase A₂ ou componente CB), Crotamina, Giroxina e Convulxina^[59]. Além da ação neurotóxica a peçonha apresenta ação miotóxica sistêmica^[60] que explica o escurecimento da urina das vítimas, é o resultado da mioglobinúria. Com a destruição do tecido muscular a mioglobina que estava no sangue é excretada. Assim como nas peçonhas botrópicas, nas peçonhas crotálicas também existem proteínas trombina símile, que provocam o prolongamento do tempo de coagulação ou tornam o sangue incoagulável^[59]. Os efeitos locais de envenenamentos crotálicos são bastante discretos, sendo geralmente edema de pouca intensidade e eritema^[57].

1.1.5 A terapia

Hoje a única terapia disponível para os envenenamentos por serpentes é a soroterapia que consiste na produção de anticorpos a partir da imunização de animais de grande porte com a peçonha (antígeno). A produção de soro consiste na formação de um “pool” de peçonhas e toxinas que são injetados em cavalos ocorrendo a estimulação do sistema imune do animal. Assim, após estimulação o soro dos animais estará rico em anticorpos com a capacidade de neutralizar as toxinas das peçonhas^[1].

A eficiência da soroterapia está relacionada além de outros fatores, diretamente com o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento e a quantidade de peçonha inoculada^[61]. Entretanto apesar do soro ser a única terapia aceita para os envenenamentos por picadas de serpentes sua ação no local da picada é fraca, não impedindo dano tecidual devido à rapidez com que a peçonha se difunde nos tecidos próximos ao local da picada e devido também à baixa concentração do soro nos tecidos^[48, 62, 42]. Todavia o uso dos soros está vinculado à existência de serviços formais de saúde, e seu emprego permanece restrito às regiões de maior desenvolvimento socioeconômico, onde existem sistemas de atenção médica estruturados. Assim as populações de localidades remotas se vêem compelidas a buscar terapias alternativas.

1.1.6 Os Extratos Vegetais

Longo tem sido o caminho na busca de um antídoto seguro contra venenos animais, em especial aqueles de natureza ofídica. As plantas constituem uma importante fonte para descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos. Muitas drogas de ampla aplicação na saúde humana são derivadas diretamente ou indiretamente de plantas^[63].

Durante séculos pessoas têm usado plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças com sucesso, registros escritos do uso de plantas medicinais datam de no mínimo 5.000 anos atrás, com os Sumérios^[64]. Até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente de plantas e extratos vegetais. Em 1970, 25% das drogas disponíveis nos Estados Unidos continham compostos derivados de plantas^[65]. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) 11% das 252 drogas consideradas como básicas para saúde humana foram descobertas de plantas^[66].

Um exemplo do uso de princípios ativos de plantas como modelo para desenvolver drogas sintéticas foi em 1897, quando Friedrich Bayer e Co. introduziram o ácido acetil salicílico (Aspirina) no mundo. A aspirina é um sintético análogo ao ácido salicílico, que é um composto ativo da casca do salgueiro, que era usado como remédio para dores e febre^[67].

O interesse no estudo das plantas em terapias alternativas com produtos naturais

tem crescido muito nos últimos anos. Este interesse ocorreu devido a diversas razões como ausência do efeito esperado com medicamentos da medicina convencional, o uso abusivo ou incorreto de drogas sintéticas resultam em efeitos colaterais e outros problemas e principalmente, uma grande porcentagem da população mundial não tem acesso a tratamentos com drogas sintéticas^[66].

Apesar do crescente interesse no estudo de plantas como fonte para novas drogas este potencial tem sido pouco explorado, uma vez que, estima-se que existam de 250.000 a 500.000 espécies de plantas no planeta e apenas 5000 foram estudadas até 1991^[68]. Por estarem presentes na natureza em abundância o estudo de extratos vegetais tem se difundido cada vez mais, buscando investigar a sua eficiência e constância de atividade, bem como identificação e isolamento do princípio ativo, determinação de sua estrutura e a possibilidade de síntese e modificação desse princípio.

O metabolismo das plantas pode ser dividido didaticamente em primário e secundário. No metabolismo primário são produzidas substâncias indispensáveis a qualquer ser vivo como lipídios, proteínas, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos que estão relacionados com o crescimento e desenvolvimento do vegetal^[69]. O metabolismo secundário é responsável pela síntese de uma miríade de substâncias. Estima-se que as plantas podem produzir mais de 500.000 dessas substâncias conhecidas como princípios ativos^[70]. Embora não sejam necessariamente essenciais para o produtor os metabólitos secundários garantem vantagens como melhor sobrevivência, num processo chamado de Alelopatia que acontece devido a impactos adversos do ambiente como herbivoria, por exemplo. Existem alguns outros fatores que afetam o teor dos princípios ativos nas plantas como, por exemplo: altitude, temperatura, incidência de luz solar, umidade e qualidade do solo^[69]. MARTINS et al. (1995)^[71] citam que dentre os fatores que podem interferir na composição química de uma planta, a nutrição merece destaque já que a deficiência ou excesso de nutrientes pode levar a maior ou menor produção de princípios ativos por uma planta.

Muitas plantas já foram estudadas quanto à atividade antiofídica tais como: *Eclipta prostrata* (erva botão), que apresentou proteção contra quatro doses letais da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*^[72, 73]; *Curcuma longa* (açafrão); que neutraliza uma neurotoxina purificada da peçonha de *Naja naja siamesis*^[74]; *Hibiscus esculentus* (quiabo),

que apresentou eficácia do extrato aquoso obtido das sementes frescas ou secas do quiabo na inibição da peçonha de *Bothrops jararaca*^[75] e o óleo essencial de *Casearia sylvestris* (guaçatonga), que inibiu significativamente o edema e a permeabilidade vascular induzidos pela peçonha de *Bothrops alternatus*^[76]. Posteriormente, BORGES et al. (2000)^[77] com a mesma planta ratificou o potencial antiofídico quanto à inibição de peçonhas brutas e miotoxinas de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacuçu* ainda IZIDORO et al. (2003)^[78] conseguiram neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi* e uma de suas metaloproteases isoladas, a neuwiedase, pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*.

No ano de 2005 foram publicados sete artigos que tratam do estudo de extratos vegetais com efeitos antiofídicos usando as plantas *Musa paradisiaca*^[79], *Bauhinia forficata*^[80], *Annoma senegallensis*^[81], *Mikania glomerata*^[82], *Piper umbellatum* e *Piper peltatum*^[83], *Cordia verbenacea*^[84], *Penttaclerthra macroloba*^[85].

1.1.7 Toxicidade de extratos vegetais

O uso de uma espécie vegetal pela população não é suficiente para validar sua segurança e efetividade. Os remédios feitos a partir de plantas são frequentemente receitados ou prescritos por pessoas comuns ou mesmo religiosos em rituais e não menos freqüente o resultado é a intoxicação que acontece logo após a ingestão^[66]. No Brasil o confrei (*Symphytum officinalis*) já foi usado como uma panacéia e hoje seu uso é proibido, por apresentar significativo potencial hepatotóxico devido ao seu teor de alcalóides como pirrolizidina e a Babosa (*Aloe vera*) também muito usada principalmente contra o câncer apresenta glicosídeos hidroxiantracênicos, e em baixas dosagens já apresenta efeitos tóxicos que causam severa diarreia^[66].

As plantas não se diferenciam de nenhum xenobiótico sintético e sua utilização deve ser baseada em estudos experimentais que comprovem que os benefícios decorrentes de sua utilização compensem seus possíveis efeitos adversos^[86]. Do ponto de visto toxicológico deve se considerar que uma planta medicinal não tem somente o efeito terapêutico esperado. Como todo composto estranho ao organismo os princípios ativos de plantas sofrem biotransformação e seus produtos podem ser tóxicos a

ponto de causar danos á saúde^[87]. Os princípios ativos de plantas não apresentam apenas efeitos imediatos e benéficos, mas podem provocar efeitos assintomáticos e por isso existe a necessidade de avaliações criteriosas para garantir segurança no uso de uma espécie vegetal ou princípios ativos como qualquer outro medicamento.

O estudo de uma nova droga com efeitos terapêuticos passa por várias etapas das quais podem se destacar 4 principais. A primeira etapa é a etapa botânica que consiste na identificação correta da planta. A segunda etapa ou etapa farmacêutica esta relacionada à forma de preparo, padronização e administração buscando a uniformidade



Figura 6: *Schizolobium parahyba*.

Fonte: foto da autora

das amostras testadas. Os ensaios Biológicos pré-clínicos compreendem a terceira etapa que tem por objetivo comprovar o efeito que motivou o estudo da espécie e sua segurança quanto à toxicidade e por fim a ultima etapa, a etapa clínica realizada em humanos visando determinar experimentalmente o grau de segurança^[87]. No estudo de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com o produto em teste por um período aproximado de 24 horas^[87]. A análise dos resultados de testes após este período podem fornecer a dose capaz de induzir a letalidade, a forma da morte, os órgãos afetados e possíveis al-

terações no comportamento e sinais que precedem a morte bem como alterações hematológicas, bioquímicas plasmáticas e urinárias. A análise Histopatológica é usada para confirmar se houve ou não lesão nos órgãos examinados e para comprovar resultados quantitativos como dosagens de enzimas do plasma. A manutenção de alguns dos animais tratados por um período superior a 24 horas é bastante interessante, pois se permite verificar efeitos tardios que possam ocorrer após as 24 horas iniciais

após a administração da droga^[87]

Schizolobium parahyba é uma espécie que corre em regiões de Mata Atlântica, conhecida popularmente por faveira, guapuruvú ou umbela, pertence à família das Leguminosas (Caesalpinoideae). Árvore de 10 a 30 m de altura. Tronco sem ramificação, coroa de folhas no ápice, casca lisa, acinzentada, com cicatrizes da queda das folhas, sendo que quando jovem a casca é verde e lisa. Possui flores amarelas, fruto tipo legume, com de 10 a 15 cm de comprimento, com uma semente, forma elíptica. Pessoas leigas da região do Triângulo Mineiro (Minas Gerais, Brasil) utilizam as folhas e sementes de *Schizolobium parahyba* contra o ofidismo na forma de chás e infusões. Na literatura científica já está descrita a purificação de dois inibidores de serinoproteases isolados de suas sementes^[88, 89, 90].

1.2 Referências

- 1 OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; A., H.; R., G. J.; L., H.-B. M. Purification and characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Biochemistry Molecular Biology Interactional**, v. 47, p. 1069–1077, 1999.
- 2 CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil : Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo-SP: Sarvier, 2003.
- 3 GREENE, H. W. Snakes: The evolution of mystery in nature. **Berkeley: University of California Press**, p. 351, 1997.
- 4 HOGE, A. R. Sinopse das Serpentes peçonhentas do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42, p. 373–496, 1981.
- 5 AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pitvipers. **Contribution to Harvard Institute of Tropical Biology**, v. 2, p. 1–64, 1925.
- 6 SILVA, V. X. **Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2000.
- 7 WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951–967, 2005.
- 8 SAÚDE, M. D. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília, 2001.
- 9 NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. P. Clinical and epidemiological study of cases of lance-headed vipers. **An Tropical Medicine Parasitology**, v. 86, p. 89–91, 1992.
- 10 Da SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brasil. **Toxicon**, v. 41, p. 251–255, 2003.
- 11 DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; M., S. A.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno Botrópico. **Memórias Instituto Butantan**, v. 54, p. 21–30, 1992.

- 12 SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1-2, p. 1–19, 2000.
- 13 STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2005.
- 14 SUZUKI, T.; IWANAGA, S. Snake venoms. In: ERDÖS E. G. & WILDE, A. F. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin: Springer, 1970. p. 193–212.
- 15 SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, I. M.; TOYAMA, M.; LOMBARDI, F.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys₄₉. Myotoxin II from *Bothrops moojeni* (Caissaca) crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503–514, 1998.
- 16 DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (Jararaca chico) venom with novel Kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, p. 1205–1215, 1997.
- 17 KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827–840, 2003.
- 18 SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v. 250, p. 1541–1546, 1990.
- 19 POLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S. from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Journal of Biochemistry**, v. 319, p. 961–968, 1996.

- 20 KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 1165–1168, 1991.
- 21 TSAI, I. H.; WANG, U. M.; CHEN, Y. H.; TSAI, T. S.; TU, M. C. Venom phospholipases A₂ of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Journal of Biochemistry**, v. 377, p. 215–223, 2004.
- 22 WEI, J.-F.; WEI, X.-L.; CHEN, Q.-Y.; HUANG, T.; QIAO, L.-Y.; WANG, W.-Y.; XIONG, Y.-L.; HE, S.-H. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 462–471, 2006.
- 23 LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885–901, 2003.
- 24 KINI, R. M.; EVANS, H. J. Correlation between the enzymatic activity, anticoagulant and antiplatelet effects of phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Thromboses Haemostasis**, v. 6, p. 170–173, 1988.
- 25 KINI, R. M. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism. In: KINI, R. M. (Ed.). **Phospholipase A₂—A complex multifunctional protein puzzle**. [S.l.]: Wiley, Chichester, 1997. p. 1–28.
- 26 KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1147–1161, 2005.
- 27 MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: Their biochemical and biological activities. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 223–236, 1990.
- 28 GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, p. 1405–1474, 1995.
- 29 GUTIÉRREZ, J. M.; NUÑES, J.; DÍAS, C.; CINTRA, A. C. O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration

- after injection of bothropstoxin II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Mol. Pathol**, v. 55, p. 217–229, 1991.
- 30 GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, W. D.; HAWGOOD, B. J.; ELDER, H. Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, v. 22, p. 85–98, 1984.
- 31 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 215–222, 1998.
- 32 RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, p. 305–314, 2004.
- 33 MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of bnsf-7 and bnsf-6, two lys-49 phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical research Communication**, v. 311, p. 713–720, 2003.
- 34 MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749–1800, 1998.
- 35 WISNER, A.; BRAUD, S.; BON, C. Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom. **Haemostasis**, v. 31, p. 133–140, 2001.
- 36 ITOH, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, T.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Organization of the Gene for Batroxobin, a Thrombin-like Snake Venom Enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7628–7631, 1988.
- 37 BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851–859, 2000.

- 38 SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115–1132, 2005.
- 39 STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v. 20, p. 265–273, 1982.
- 40 STOCKER, K.; BARLOW, G. H. Part b: Proteolytic enzymes. In: LORAND, L. (Ed.). **The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin)**. [S.l.]: Academic Press, 1976. v. 45, p. 214–223.
- 41 OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 9, p. 945–966, 1992.
- 42 ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63–68, 2002.
- 43 LEITE, C. V. S.; NARESE, L. E.; ARANTES, H. L.; NI, M. J. S.; MERCADANTE, M. C.; BARRAVIEIRA, B.; KOBAYASI, S. An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. **Journal Venom Animal and toxins**, v. 6, p. 130–141, 2000.
- 44 MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171–1181, 2005.
- 45 GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.
- 46 BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.
- 47 GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Letters**, v. 335, n. 1, p. 76–80, 1993.

- 48 KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627–642, 1996.
- 49 HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake Venom Hemorrhagins. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 1–19, 1999.
- 50 FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969–985, 2005.
- 51 OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v. 41, p. 14248–14254, 2002.
- 52 FRANCISCHETTI, I. M. B.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M. K.; RIBEIRO, J. M. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v. 337, p. 55–69, 2004.
- 53 INOUE, S. Ultrastructure of basement membranes. **International Review of Cytology**, v. 117, p. 57–98, 1989.
- 54 GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑES, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; MICHAELOVADIA. Skeletal Muscle Necrosis and Regeneration after Injection of BaH1, A Hemorrhagic Metalloproteinase Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 62, p. 28–41, 1995.
- 55 ARCE, V.; BRENES, F.; GURIÉRREZ, J. M. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: A histochemical and immunocytochemical study. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 72, p. 211–226, 1991.
- 56 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; M., F. M. R.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 381, p. 213–224, 2000.

- 57 CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acidente crotálico na infância: aspéctos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, p. 87–96, 1991.
- 58 CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. D.; HERING, S. E. Absence of myocardial involvement in children victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Toxicon**, v. 42, p. 741–745, 2003.
- 59 KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. Haemostatic changes caused by the venoms of South America snakes. **Toxicon**, v. 27, n. 9, p. 955–963, 1989.
- 60 ROSSI, M. A.; PERES, L. C.; DEPAOLA, F.; CUPO, P.; HERING, S. E.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. Electronic microscopic study of systemic myonecrosis due to poisoning by tropical rattlesnake *C. durissus terrificus* in humans. **Archives of Pathology**, v. 113, p. 169–173, 1989.
- 61 FRANÇA, F. O. S. Associação da venenomia e de gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantã, de São Paulo, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. **Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 3, p. 187–190, 1998.
- 62 GUTIÉRREZ, J. M.; ÁVILA, C.; ROJA, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1998.
- 63 CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery: A symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463–480, 2000.
- 64 SWERDLOW, J. Nature's Medicine: Plants that health. **National Geographic Society**, 2000.
- 65 FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants — the sleeping giant of drug development. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 148, p. 46–52, 1976.
- 66 RATES, S. M. K. Plants as souces of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–913, 2001.

- 67 PIERPOINT, W. S. Salicylic acid and its derivatives in plants: Medicine, metabolites and messenger molecules. **Botanical Research**, v. 20, p. 163–235, 1994.
- 68 PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULLER, M. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture. In: **Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems**. Oxford: Oxford University Press, 1991.
- 69 FURLAN, M. R. **Cultivo de plantas medicinais**. 2. ed. Cuiabá-MT: SEBRAE, 1999.
- 70 SINGER, A. C.; CROWLEY, D. E.; THOMPSON, I. P. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 123–130, March 2003.
- 71 MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa-MG: UFV, 1995. 220p.
- 72 MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, p. 1131–1141, 1992.
- 73 PITHAYANUKUL, P.; LAOVACHIRASUWAN, S.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 347–352, 2004.
- 74 CHERDCHU, E.; SRIDUKAVAT, K.; KOON, K. R. Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma sp.* (Zingiberaceae). **Journal Medicine Thailand**, v. 61, p. 544, 1978.
- 75 PEREIRA, N. A.; PEREIRA, P. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta med**, v. 60, p. 99–100, 1994.
- 76 RODRIGUEZ, M.; CARVALHO, J. C. T.; LUCIA, M.; MESQUITA, J. M.; SARTI, S. J. Avaliação da atividade antiofídica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* sobre modelos animais estimulados com veneno de *Bothrops alternatus*. **III Jornada Paulista de Plantas medicinais**, v. 3, p. 110–111, 1997.

- 77 BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on action of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Compendium Biochemistry Physiology**, v. 127, p. 21–30, 2000.
- 78 IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRAMDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flaucortiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669–675, 2003.
- 79 BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 21–29, 2005.
- 80 OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANTANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213–216, 2005.
- 81 ADZU, B.; ABUBAKAR, M. S.; IZEB, K. S.; AKUMKA, D. D.; GAMANIEL, K. S. Effects of *Annona senegalensis* rootbark extracts on *Naja nigricotlis nigricotlis* venom in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 507–513, 2005.
- 82 MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER M, A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 364–370, 2005.
- 83 NUÑES, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts

- towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1017–1025, 2005.
- 84 TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, N. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318–327, 2005.
- 85 SILVA, J. O.; COPPED, J. S.; FERNANDIS, V. C.; SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; MAZZI, M. V.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Anti-hemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 145–152, 2005.
- 86 Fundação Nacional de Saúde. **Sistema de informação de agravos e notificação**. 48. ed. Brasília-DF, 2001.
- 87 SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre–Florianópolis: UFRGS, 2003. 1102 p.
- 88 TELES, R. C. L.; SOUSA, E. M. T.; CALDERON, A.; FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, v. 65, p. 793–799, 2004.
- 89 ELISABETH, M. T. H. S.; MISAOKO, U.; CLAUDIO, A. M. S. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 521–525, 1995.
- 90 TELES, R. C. L.; FREITAS, S. M.; KAWANO, Y.; SOUZA, E. M. T.; AREAS, E. P. G. Vibrational spectroscopic analysis of a chymotrypsin inhibitor isolated from *Schizolobium parahyba*. **Spectrochimica acta**, v. 55, p. 1279–1289, 1999.

Capítulo 2

Propriedades Antiofídicas do extrato aquoso
das folhas de *Schizolobium parahyba*
(Caesalpinoideae)

Resumo

Muitas plantas medicinais são recomendadas para o tratamento de picadas de serpentes. O extrato aquoso preparado com as folhas de *Schizolobium parahyba* foi ensaiado para verificar sua habilidade em inibir algumas atividades enzimáticas e biológicas induzidas por peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Crotalus durissus terrificus*, bem como suas toxinas isoladas, neuwiedase (metaloprotease), BnSP7 (PLA₂ Lys-49 básica) e CB (PLA₂ do complexo crotoxina). As atividades fosfolipase A₂, coagulante, fibrinogenolítica, hemorrágica e miotóxica induzidas por *B. pauloensis* e *C. d. terrificus*, bem como suas toxinas isoladas foram significativamente inibidas quando diferentes quantidades de *S. parahyba* foram incubadas previamente com as peçonhas e toxinas antes dos ensaios. No entanto, quando *S. parahyba* foi administrada na mesma via, após a injeção de peçonha ou das toxinas isoladas, os danos teciduais locais como hemorragia e miotoxicidade foram somente parcialmente inibidos. Avaliamos também o efeito inibitório de *S. parahyba* sobre o espalhamento das proteínas da peçonha da área da injeção para a circulação sistêmica. A neutralização das alterações sistêmicas induzidas pela injeção i.m. da peçonha de *B. pauloensis* foi avaliada mensurando o número de plaquetas e pelos níveis de fibrinogênio plasmático que foram significativamente mantidos quando a inoculação do extrato de *S. parahyba* ocorreu na mesma via, após a injeção da peçonha de *B. pauloensis*. Em conclusão, nossas observações confirmam que extrato aquoso de *S. parahyba* possui potentes propriedades neutralizadoras de peçonhas de serpentes. Podendo, portanto ser usado como um tratamento alternativo a soroterapia e constitui uma rica fonte de potenciais inibidores de toxinas envolvidas em várias doenças fisiopatológicas de humanos e animais

Palavras chave: peçonha de serpentes, *Bothrops pauloensis*, *Crotalus durissus terrificus*, inibição, extrato vegetal, *Schizolobium parahyba*.

Anti-Snake Venom Properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) Aqueous Leaves Extract

Mirian Machado Mendes^a , Carolina Freitas Oliveira^a , Daiana Silva Lopes^a , Luís Henrique Ferreira do Vale^a , Tânia Machado de Alcântara^b , Luiz Fernando M. Izidoro^a , Amélia Hamaguchi^a , Maria Inês Homs-Brandeburgo^a , Veridiana de Melo Rodrigues^a

^aInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia
- MG, Brazil

^bFaculdade de Medicina - Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de
Uberlândia - Uberlândia - MG, Brazil

Abstract

Many medicinal plants have been recommended for the treatment of snakebites. The aqueous extracts prepared from leaves of *Schizolobium parahyba* (plant found in Mata Atlantica in Southeastern Brazil) were assayed for their ability to inhibit some enzymatic and biological activities induced by *Bothrops pauloensis* and *Crotalus durissus terrificus* venoms as well as by their isolated toxins neuwiedase (metalloproteinase), BnSP-7 (basic Lys49 PLA₂) and CB (PLA₂ from crotoxin complex). Phospholipase A₂, coagulant, fibrinogenolytic, hemorrhagic, and myotoxic activities induced by *B. pauloensis* and *C. d. terrificus* venoms, as well as by their isolated toxins were significantly inhibited when different amounts of *S. parahyba* were previously incubated with these venoms and toxins before assays. However, when *S. parahyba* was administered at the same route after the venoms or toxins injections, the tissue local damage, such as hemorrhage and myotoxicity was only partially inhibited. We also evaluated the inhibitory effect of *S. parahyba* upon the spreading of venom proteins from the injected area into systemic circulation. The neutralization of systemic alterations induced by i.m. injection of *B. pauloensis* venom was evaluated by measuring platelet and plasma fibrinogen levels which were significantly maintained when *S. parahyba* extract inoculation occurred at the same route after *B. pauloensis* venom injection. In conclusion,

our observations confirmed that the aqueous extract of *S. parahyba* possesses potent snake venom neutralizing properties. It may be used as an alternative treatment to serum therapy and as a rich source of potential inhibitors of toxins involved in several physiopathological human and animal diseases.

Key words: Snake venom, *Bothrops pauloensis*, *Crotalus durissus terrificus*, Inhibition, Plant extract, *Schizolobium parahyba*.

2.1 Introduction

Venomous snakebites affect around 2.5 million people annually killing more than 100.000^[1]. The burden of morbidity and mortality is greatest in rural areas^[2, 3]. In Latin America, snake bite envenomation constitutes a relevant public health where most accidents are due to species of genus *Bothrops*, although envenomations by *Crotalus* spp. also occurs particularly in South America, where they are usually associated with severe systemic envenomations^[4, 5, 6].

Animal venoms including snake venoms are complex mixtures of proteins, including phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4), myotoxins, hemorrhagic metalloproteinases, cytotoxins and other proteases that act by different mechanisms. The pathophysiology of snake bite envenomation involves a complex series of events that are dependent on the combined action of these venom components. *Bothrops* snake venoms induces release of pharmacologically active substances, with pronounced local effects such as hemorrhage, edema, inflammation, and tissue necrosis. In addition, relevant haemostatic and hematological alterations are frequent^[7].

A serious consequence of *Bothrops* snake bites is muscle necrosis which can evolves with permanent loss of tissue or function, and requires amputation of the affected member^[8]. This myonecrosis may be due to a direct effect of myotoxic phospholipases A₂ (PLA₂s) homologues upon plasma membranes of muscle cells^[4] or by hemorrhaging, zinc-metalloproteinases, capable of disrupt the capillary basement membrane

and causing alterations on capillary vessels^[9].

Antivenins are commonly used to treat the snake bites, however, they are limited in their efficacy in the neutralization of local tissue damage. Degradation of local tissue damage is a continuous process which is prolonged even after the administration of antivenin^[10, 11]. Due to inherent disadvantages such as the high cost, hypersensitivity, non-availability and lack of protection against local effects, a systematic investigation of plant source remedies for snake bite is justified.

Medicinal plants play a key role in world health, as they are source of many pharmacologically active compounds. Many of these substances structurally resemble biological compounds, and this similarity is the basis of their physiological action^[12]. Many plants are used in popular medicine to treat snake bite envenomation. Medicinal plant extracts, a rich source of nature inhibitors and pharmacologically active compounds, have been shown to antagonize the activity of some venoms and toxins. Several species of Brazilian flora are popularly known as antiophidian, and have been scientifically investigated as *Eclipta prostrata*^[13, 14], *Curcuma longa*^[15], *Hibiscus esculentus*^[16], *Casearia sylvestris*^[17], *Musa paradisiaca*^[18], *Mucuna pruriens*^[19], *Casearia mariquitenses*^[20], *Bauhinia forficata*^[21], *Annoma senegallensis*^[22], *Mikania glomerata*^[23], *Piper umbellatum* and *Piper peltatum*^[24], *Cordia verbenacea*^[25], and *Penttaclerthra macroloba*^[26].

Schizolobium parahyba (Sp) (Caesalpinoideae), a plant found in Mata Atlantica in Southeastern Brazil, and popularly called Faveira, Guapuruvú or Umbela, is used in form of teas and infusions against ophidism by people of Triângulo Mineiro region (Minas Gerais, Brazil). In the present study, the ability of the aqueous extract from *Schizolobium parahyba* (Sp) to neutralize the main enzymatic and biological activities induced by snake venoms (*Bothrops pauloensis* and *Crotalus durissus terrificus*) and some isolated toxins was evaluated. Additionally, was also reported the protective effect of Sp when administered at the same route after venoms or toxins injections.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Preparation of venoms and toxins

Bothrops pauloensis (Bnp) and *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) venoms were obtained from the serpentarium of Pentapharm, Minas Gerais, Brazil. Metalloproteinase neuwiedase (Neuw) and myotoxin BnSP7 from the *B. pauloensis* snake venom, and PLA₂ (CB) from the *C. durissus terrificus* snake venom were purified as previously described^[27, 28, 29]. The lyophilized venoms and toxins were weighted, dissolved in phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS) and centrifuged at 3000xg for 10 min. The supernatants were collected and immediately used for the experiments. Proteins were estimated by the method of BRADFORD (1976)^[30].

2.2.2 Animals

Swiss male mice (18-22g) were kindly provided by the Institute Vallé, Minas Gerais, Brazil and maintained under standard conditions (temperature $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity $60 \pm 5\%$, 12 h light/dark cycle) with standard diet and water *ad libitum*.

2.2.3 Preparation of plant extract

The leaves of *Schizolobium parayba* (Sp), collected in Uberlândia, MG, Brazil, were washed, stirred with deionized water in a waring blender for 15 min at room temperature and the sieved. The filtrate was centrifuged at 30.000xg for 15 min and supernatant was lyophilized and stored at -20°C . The aqueous extract of *Schizolobium parayba* (Sp) was weight and dissolved in PBS before use.

2.2.4 Neutralization assays

For phospholipase A₂ (PLA₂), coagulant and fibrinogenolytic activities, toxins and venoms were previously incubated with Sp at different ratios (1:1, 1:5, 1:10 and 1:50,

venoms or toxins/extract, w/w) for 30 min at 37 °C before the tests. For neutralization of biological effects two experimental conditions were tested: (i) Incubation: Mice received solutions containing venoms or toxins previously incubated with *Sp* at ratio (1:50 venom/extract, w/w) for 30 min at 37 °C; (ii) Treatment: Mice received solutions containing venoms or isolated toxins and 15 min later the animals were inoculated by the same route with *Sp*. For these experiments, were utilized the ratios 1:50 and 1:100 venom/extract, w/w. The aqueous extract of *Sp* concentration was expressed in terms of dry weight and the amount of extract used in each experiment was established according to the concentration of the venom or toxin indicated for each test (Borges et al, 2000)

2.2.4.1 PLA₂ activity

PLA₂ enzymatic activity was measured by an indirect hemolytic assay on agarose gel, using washed mice erythrocytes and hen's egg-yolk emulsion as substrate,^[31]. Solutions contained *Sp* (10 µg, 50 µg, 100 µg, 500 µg/20 µL PBS) incubated with *Bp*, *Cdt* venoms or isolated PLA₂ (CB) (10 µg/20 µL PBS) at 37 °C for 30 min were assayed. Venoms, PLA₂ or *Sp* solutions were used as control. Enzymatic activity was expressed as percentage, 100% inhibition indicating the absence of activity of the venom incubated with the aqueous extract. Each experiment was expressed by the mean ±SD (n=3).

2.2.4.2 Coagulant activity

Coagulant activity of *Bp* or *Cdt*venoms on bovine plasma was assayed according to ASSAKURA et al. (1992)^[32]. For the inhibition tests, venoms solutions 10 µg/20 µL PBS were previously incubated with *Sp* (10 µg, 50 µg, 100 µg, 500 µg/20 µL PBS) at 37 °C for 30 min and added immediately on 0.1 mL plasma. The time to clot the plasma solutions was recorded. Control PBS, venoms and *Sp* were used. Coagulant activity was expressed by the mean time of coagulation (in seconds) induced by the snake venoms in the absence and presence of *Sp*.

2.2.4.3 Proteolytic activity upon fibrinogen

Fibrinogenolytic activity was evaluated according to^[27]. Samples of 50 µL of bovine fibrinogen (1 mg/mL PBS) were incubated with 5 µg of *Bp* venom at 37 °C for 2 h. The reaction was stopped with 25 µL of 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.5 containing 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) β-mercaptoethanol and 0.05% (w/v) bromophenol blue. Samples were then analyzed by 14% (w/v) SDS-PAGE.

2.2.4.4 Hemorrhagic activity

Swiss male mice (18-22 g) received two minimum hemorrhagic doses (MHD) of only crude venom *Bp* (16.3 µg) in 50 µL of PBS intradermally^[33]. Control mice received only PBS or *Sp*. Three hours after injection, mice were killed, and the hemorrhagic area of their skin was measured.

2.2.4.5 Myotoxic activity

Swiss male mice (18-22 g) were injected intra-muscularly in the right gastrocnemius with 50 µL of solutions containing 25 µg of *Bp* or *Cdt* venoms or 50 µg of toxins PLA₂ (CB) or Neuw or BnSP7. Control mice received only PBS or *Sp*. After 3 h, the animals were bled from the tail and blood was collected into heparinized capillary tubes. Plasma creatine kinase activity was determined using a commercial kit (Biotécnica, Brazil). Activity was expressed in units/L, one unit corresponding to the production of 1 µmol of NADH per min at 30 °C.

2.2.4.6 Histopathological analysis

The myonecrosis was evaluated on the basis of the morphologic alterations induced by i.m. injections of 50 µg/50 µL of *Bp* venom in the right gastrocnemius skeletal muscle of Swiss mice (18-22 g, n=4)^[33]. Control mice received only PBS or *Sp*. After 24 h, the animals were sacrificed by deep anesthesia with ethyl ether and a small section of the central region of the muscle was excised and soaked in fixing solution

(10% formaldehyde in PBS, v/v). The material was then dehydrated by increasing concentrations of ethanol and processed for inclusion in paraffin. The resulting blocks were sliced in 2.5 μm thick sections, stained with 0.25% (w/v) hematoxin-eosin and examined under a light microscope.

2.2.4.7 Platelet and plasma fibrinogen determination

For neutralization of some systemic alterations by *Sp*, the platelet and plasma fibrinogen levels were evaluated. Groups of four Swiss male mice (18-22 g) were injected in the right gastrocnemius muscle with 50 μL of PBS solution containing 50 μg of *Bp*. Control animals received 50 μL PBS or *Sp* only and 6 h later, the animals were sacrificed with ethyl ether. The blood was collected by cardiac puncture in the presence of EDTA and the blood samples were analyzed by automation at the Sysmex LX-21N to determine platelets number. The plasma fibrinogen concentration was determined by clotting time after obtained the plasma in the presence of citrate using a commercial kit (Biotécnica, Brazil).

2.2.5 Statistical Analysis

The results were presented as medium standard deviation (SD). Statistic significance of results was evaluated using Kruskal-Wallis-test. The value of $p < 0.05$ was considered significant using the program R Language^[34].

2.3 Results

2.3.1 Neutralization of enzymatic activities of crude venoms and toxins

Table 1 shows the PLA_2 activity in the presence or absence of *Sp*. After incubation *Sp* inhibited 26% and 25% PLA_2 activity of *Cdt* venom and its isolated PLA_2 (CB),

respectively at 1:1 ratio (venom or toxin/extract, w/w). At ratio 1:50 (venom/extract, w/w) 100% of PLA₂ activity of *Bp* and *Cdt* venoms was inhibited by *Sp*.

The clotting activity induced by *Bp* venom was partially inhibited by *Sp* at lower ratios 1:1 and 1:5 (venom/extract, w/w). The extract was able to increase the clotting time, prolonging it around three and eight times, when the venom of *Bp* was incubated with *Sp* at 1:10 and 1:50 (venoms/extract, w/w), respectively. However, it was faintly effective in inhibiting this activity induced by *Cdt* venom (Tabela 1).

Figure 7 shows that *Bp* degraded the A α and B β chains of bovine fibrinogen after 2h incubation. Partial inhibition of the B β chain degradation was observed when venom and extract at ratios 1:10 or 1:50 (venom or toxin/extract, w/w) were incubated together and 30 min later mixing with fibrinogen. The degradation of A α chain was partially inhibited by the extract at ratio 1:50 (venom or toxin/extract, w/w).

2.3.2 Inhibition of biological effects of crude venoms and toxins

The haemorrhagic activity induced by *Bp* venom was totally inhibited by the aqueous extract from *Sp* when these samples were previously incubated before venom injections (Figura 8). When *Sp* was inoculated 15 min later at the same route, the haemorrhage induced by *Bp* was inhibited 38.9% (1:50, venom/extract, w/w) and 71.3% (1:100, venom/extract, w/w) (Figura 8).

The myotoxicity induced by *Bp* and *Cdt* venoms and their isolated toxins was confirmed by the increment of plasma CK level (Figura 9). When *Sp* was previously incubated with venoms or toxins at a ratio 1:50 (venom or toxins/extract, w/w), myotoxic activity was efficiently inhibited. *Sp* was also able to inhibit partially this activity when administered 15 min after of *Bp* venom (post-envenomation), neuwiedase or BnSP-7 injections (Figura 9(A), 9(B), 9(C)). In the same way, *Cdt* venom and toxin PLA₂ (CB) were inhibited only at ratio of 1:100 (venom/extract, w/w) (Figura 9(D) and 9(E)).

The histopathological analysis clearly demonstrated that *Bothrops pauloensis* venom causes myonecrosis (Figura 10(B)), showing a drastic hemorrhage, necrosis and a pronounced edema. These alterations, mainly hemorrhagic effect was lower when the

animals were injected with venom previously incubated with *Sp* (Figura 10(D)), but in contrast, the leukocyte infiltrate was fairly prominent. The treatment with *Sp* at 1:50 and 1:100 (venom/extract, w/w) at site injection decreased partially the local tissue alterations, although the hemorrhage has been considerably inhibited (Figura 10(E) and 10(F)). Neither PBS nor *Sp* induced morphological alterations when they were injected alone, respectively (Figura 10(A) and 10(C)).

Platelet number and plasma fibrinogen concentration decreased approximately 56% and 63%, respectively when *Bp* venom was injected by i.m. route in mice (Figure 11(A) and 11(B)). The *Sp* aqueous extract when previously incubated with *Bp* at 1:50 (venom/extract, w/w) was able to neutralize significantly these alterations. This protective effect was also observed when the mice were treated with *Sp* at 1:100 (venom/extract, w/w) i.m. 15 min after the venom injection.

2.4 Discussion

Medical and economical importance of plants has motivated several scientific and ethnopharmacological studies that have resulted in the discovery of many interesting properties. Some studies can confirm the biological effects popularly attributed to these plants and the best way to their utilization.

Several medicinal Brazilian plants have been widely used in popular culture as neutralizer of many effects induced by snake venoms^[26, 35]. In medicinal flora the searching for active principles capable of neutralizing the venom lesioning effects constitutes an important field of scientific investigations.

In the present study the neutralizing effects of *Sp* extract against some enzymatic and biological activities from snake venoms and toxins were evaluated. *Sp* was very effective to inhibit the activities induced by *Bothrops pauloensis* and *Crotalus durissus terrificus* venoms, as well as by some isolated toxins when previously incubated at different ratios before assays. There was a significant inhibition of PLA₂, coagulant, fibrinogenolytic, hemorrhagic and myotoxic activities, as well as the reduction of the decrease of platelet number, and plasma fibrinogen concentration during in vivo assays.

The antivenom activity of several extracts may be due to the presence of enzyme inhibitors, chemical inactivators or immunomodulating principles^[35]. The efficacy of plant species as inhibitors of the toxic and pharmacological actions of snake venoms may be attributed to the presence of multiple factors. Based in our results *Sp* seems to be a potent anti-ophidian mixture.

Many vegetal extracts contain compounds capable of neutralizing the PLA₂ and proteolytic activities of snake and bee venoms^[36, 37, 38, 20, 23, 26, 21]. These authors suggested that extracts of plants caused inhibition of these enzymes by compounds that bind to divalent ions (Ca⁺⁺ or Zn⁺⁺) important for enzymatic activities. We also verified that PLA₂ and proteolytic activities were inhibited by *Sp*, and it is well known that these enzymes depend on metallic ions to exert their action. However this chelate effect induced by compounds of extracts, removing these ions from the medium was discarded by BORGES et al. (2005)^[18]. These authors showed that the inhibition of PLA₂ activity by *Musa paradisiacca* (*MsE*) aqueous extract did not reverse the activity when an excess of Ca⁺⁺ ions was added in the assay. In present work we observed this same effect (results not shown).

Regarding a possible action mechanism, some studies have shown that no alteration occurs in electrophoretic pattern of snake venoms after incubation with different extracts, excluding the proteolytic degradation as a potential mechanism^[23, 21, 26]. However, BORGES et al. (2005)^[18] suggested that the possible antivenom activity of *MsE* occurs due to association of its own components with the venom proteins. They analyzed these properties by electrophoresis that showed a different protein profile of venoms after treatment with aqueous extract of *Musa paradisiacca* (*MsE*). The presence of proteins in the pellet fractions treated with *MsE* confirmed that this extract induces precipitation of different proteins, resulting in a non-specific effect. A partial chemical characterization of this extract showed presence of polyphenols, and probably these compounds would be responsible for protein precipitation^[18]. Previous analysis of ¹H and ¹³C NMR of *Sp* have been done in our laboratory, and showed that *Sp* extract is probably a rich source of polyphenols (results not showed), and also probably contains compounds able to associate with venom proteins, modifying therefore their enzymatic and biological properties.

One interesting aspect of the present study was to demonstrate the capacity of *Sp* to neutralize some local and systemic alterations induced by venoms or toxins when administered at the same route some time after venoms injections. Previous assays were done to choose the better time to inoculate the *Sp* extract after venoms or toxins injections. After 15 min, the same inhibitory effect was observed from different biological activities. In this way tissue local damage such as hemorrhage and myotoxicity (Figura 8, 9 and 10) was partially inhibited when *Schizolobium parahyba* extract inoculation occurred via the same route after venoms or toxins injections. BORGES et al. (2005)^[18] also demonstrated the way of plant extract to neutralize the effects induced by snake venoms. They observed no protection when venom and vegetal extract were injected via different routes.

Snake envenomation is considered as a subcutaneous or intramuscular injection of the venom. In this study the inhibitory effect of *Sp* upon the spreading of venom proteins from the injected area into systemic circulation was evaluated. The neutralization of systemic alterations induced by i.m. injection of *Bp* venom was evaluated by measuring platelet and plasma fibrinogen levels. To allow the development of systemic alterations such as haemostatic and hematological disturbances, venom proteins are needed to diffuse from the injected area into systemic circulation^[39].

Platelet number and plasma fibrinogen concentration (Figura 11(A) and 11(B)) were significantly maintained when *Schizolobium parahyba* extract inoculation occurred via the same route after *Bp* venom injection. Although the precise mechanism of neutralization by *Sp* remains unclear, the *Sp* components inhibited partially the diffusion of venom proteins from injected area into systemic circulation due to association of its components with venom proteins, mainly proteolytic enzymes which are important for envenomation. These enzymes cause rapid spreading of venom components from the injected area into systemic circulation by degradation of extracellular matrix and vascular basement membrane^[39].

In conclusion, we have demonstrated that enzymatic and biological activities of venoms and some toxins were inhibited by *Sp*. Although the mechanism of action of *Schizolobium parahyba* extract is still unknown, our studies support the hypothesis that the neutralizing properties of *Sp* occur probably due the association of its components

with the venom proteins. The isolation and structural elucidation of these compounds will allow the understanding of the interaction with these proteins and consequently the inhibition mechanism. Therefore the development of target molecules may become a novel therapy for snake envenomations.

2.5 Acknowledgements

The authors express their gratitude to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support. Authors gratefully acknowledge to Vanessa Ferreira Tolentino from Laboratório de Análises Clínicas of Centro Universitário de Patos de Minas. The authors thank the BIOTECNICA that kindly donated the Kits for the accomplishment of this work. This work was performed as partial requirement for the MsC degree of Mirian Machado Mendes at the Universidade Federal de Uberlândia.

Tabela 1: Neutralization of the coagulant and phospholipasic activities of crude venoms and their isolated toxins (n=3)

	Coagulant activity (time in seconds)					
	Only CV	Incubation 1:1	Incubation 1:5	Incubation 1:10	Incubation 1:50	Only Sp
<i>Bp</i>	37.43±1.65	*51.33±0.81	*111.96±10.63	*120±0.35	*>300±0.28	
<i>Cdt</i>	15.03±0.68	16.36±0.75	16.66±0.49	17.06±0.46	*>300±0.29	
<i>Sp</i>	—	—	—	—	—	>300±0

	^a Phospholipasic indirect activity (Inhibition %)			
	Incubation 1:1	Incubation 1:5	Incubation 1:10	Incubation 1:50
<i>Bp</i>	11.27	*37.69	*42.25	*100
<i>Cdt</i>	*26.04	*37.26	*47.76	*100
PLA ₂ (CB)	25.25	*27.80	*41.80	*86.99
<i>Sp</i>				0

^aPhospholipasic activity was expressed as a percentage. A hundred percent of inhibition corresponding to the absence of activity in the venom incubated with the extract of *Sp*. Each experiment represents the mean±S.D. (n=3).
Means are statistically significantly different () from the control means.

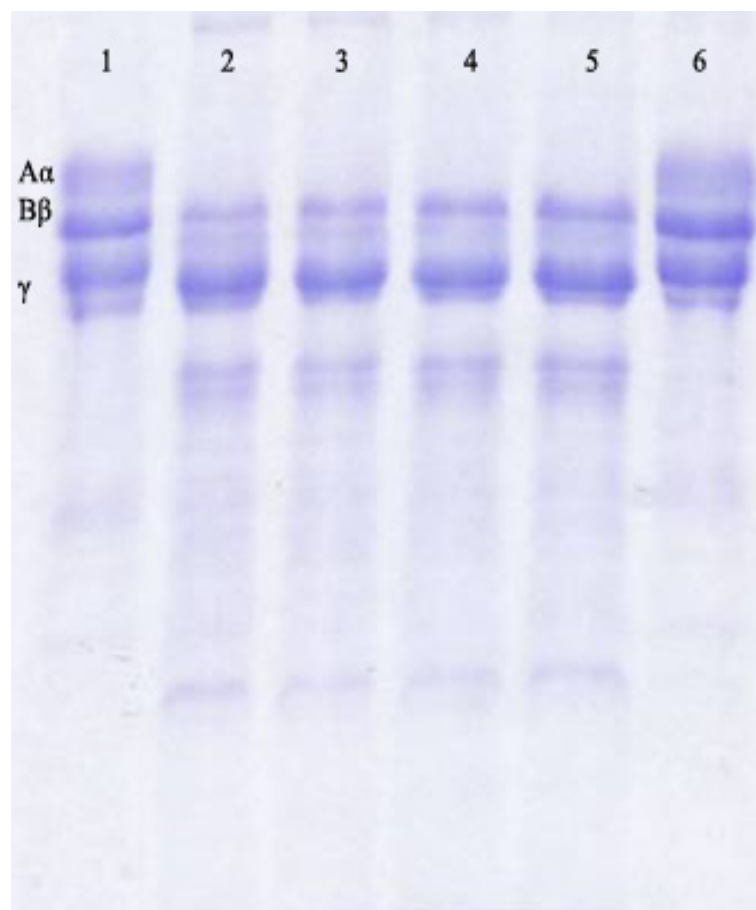


Figura 7: Inhibition of fibrinogen proteolysis induced by (5 μ g) *Bp* by *Sp* aqueous extract. Samples were incubated with extract at different ratios by 30 min at room temperature, and incubated with 50 μ L of fibrinogen solution (1.0 μ g/ μ L PBS) at 37 °C for 2 h. SDS polyacrilamide gel electrophoresis (14%) shows fibrinogen degradation. 1- Fibrinogen (fib) (15 μ g), 2- fib+*Bp*, 3- fib+*Bp*+*Sp*(1:1), 4- fib+*Bp*+*Sp*(1:5), 5- fib+*Bp*+*Sp* (1:10), 6- fib+*Bp*+*Sp* (1:50)

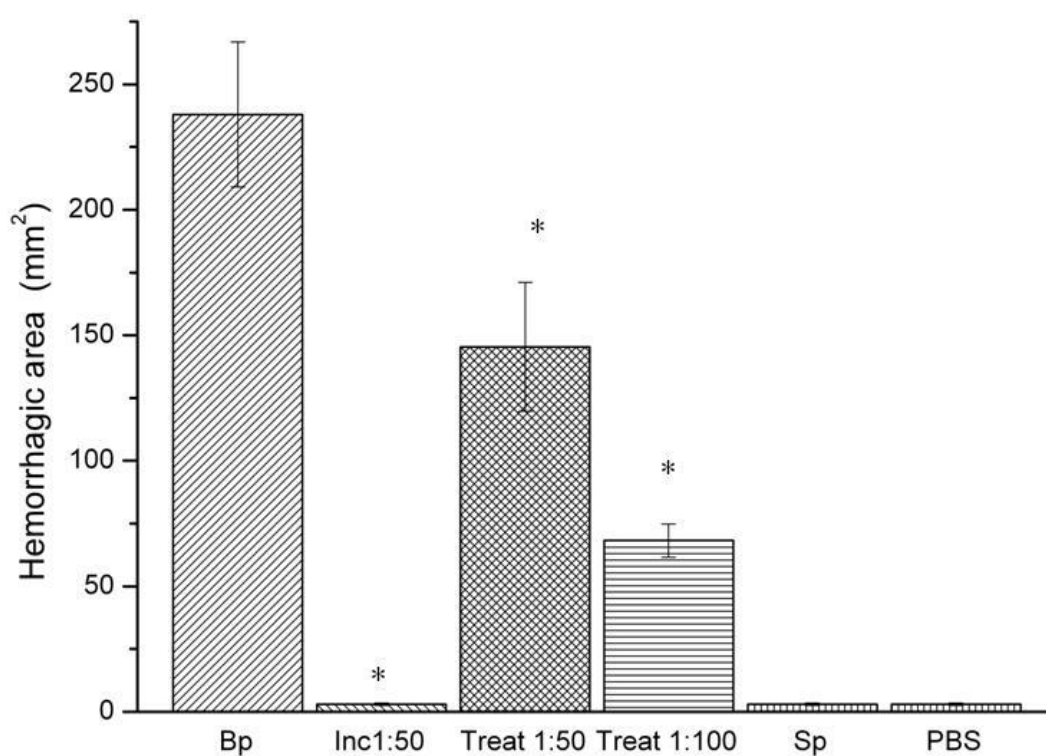


Figura 8: Inhibition of hemorrhagic activity induced by Bp venom. For this assay 2MDH crude venom were incubated for 30 min at 37 °C with aqueous extract *Sp* at 1:50 (venom/extract, w/w) ratio or *Sp* extract was inoculated at the same route 15 min later of venom injection. For these experiments the ratios 1:50 and 1:100 (venom/extract, w/w) were utilized. Each experiment represents the mean S.D. (n=5). (*) The difference between Absence and Presence of *Sp* was significant ($p < 0.05$).

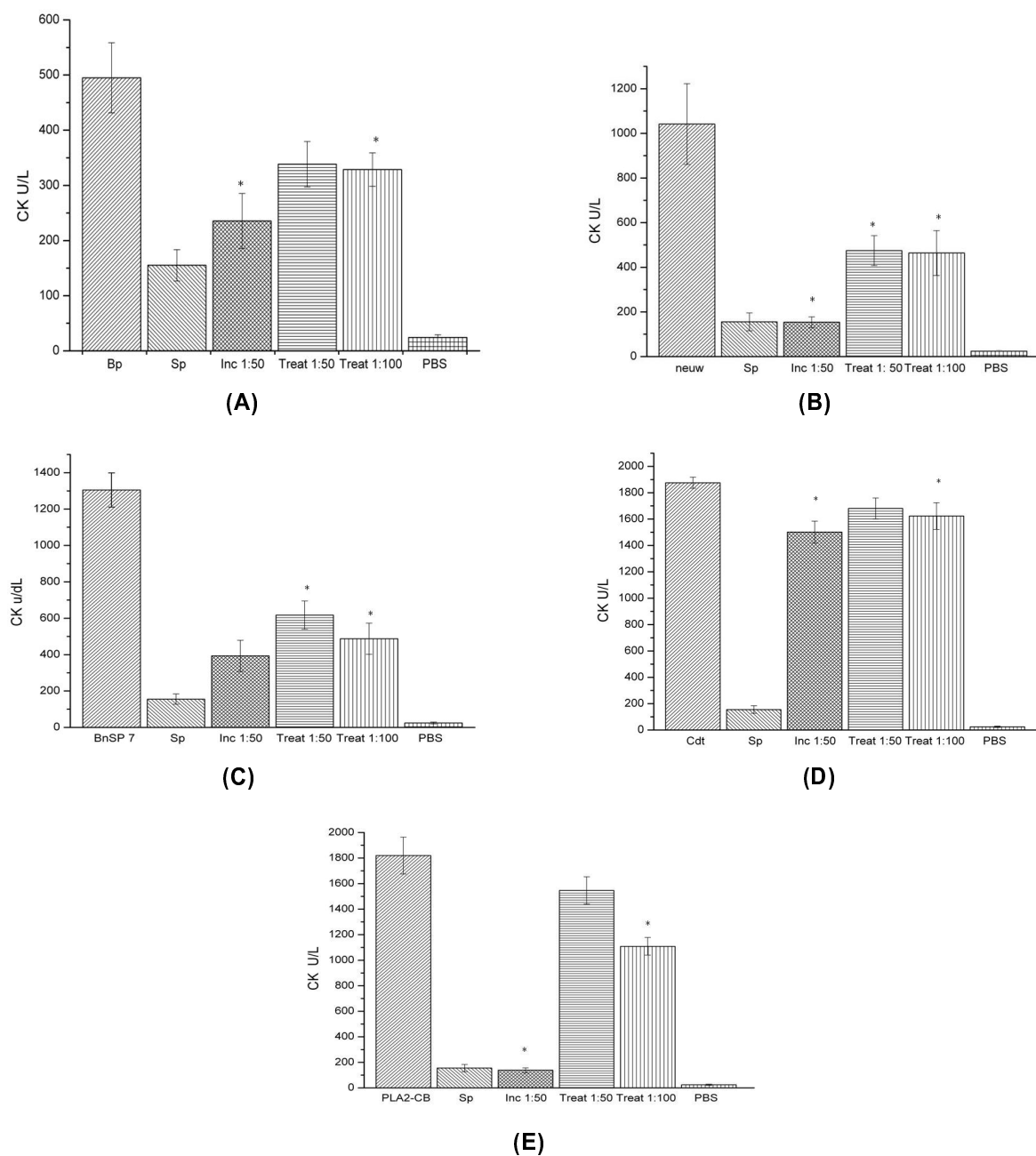


Figura 9: Inhibition of myotoxic activity of *Bp*, *Cdt* venoms, and isolated toxins by *Sp* in incubation and treatment conditions. Animals were injected i.m. with (25 μ g/50 μ L) venoms or (50 μ g/50 μ L) toxins and plasma CK activity was measured at 3 h. Controls mice were injected with PBS or *Sp* extract alone. Results are reported as means $\pm$ SD (n=6). (*) The difference between Absence and Presence of *Sp* was significant ($p < 0.05$).

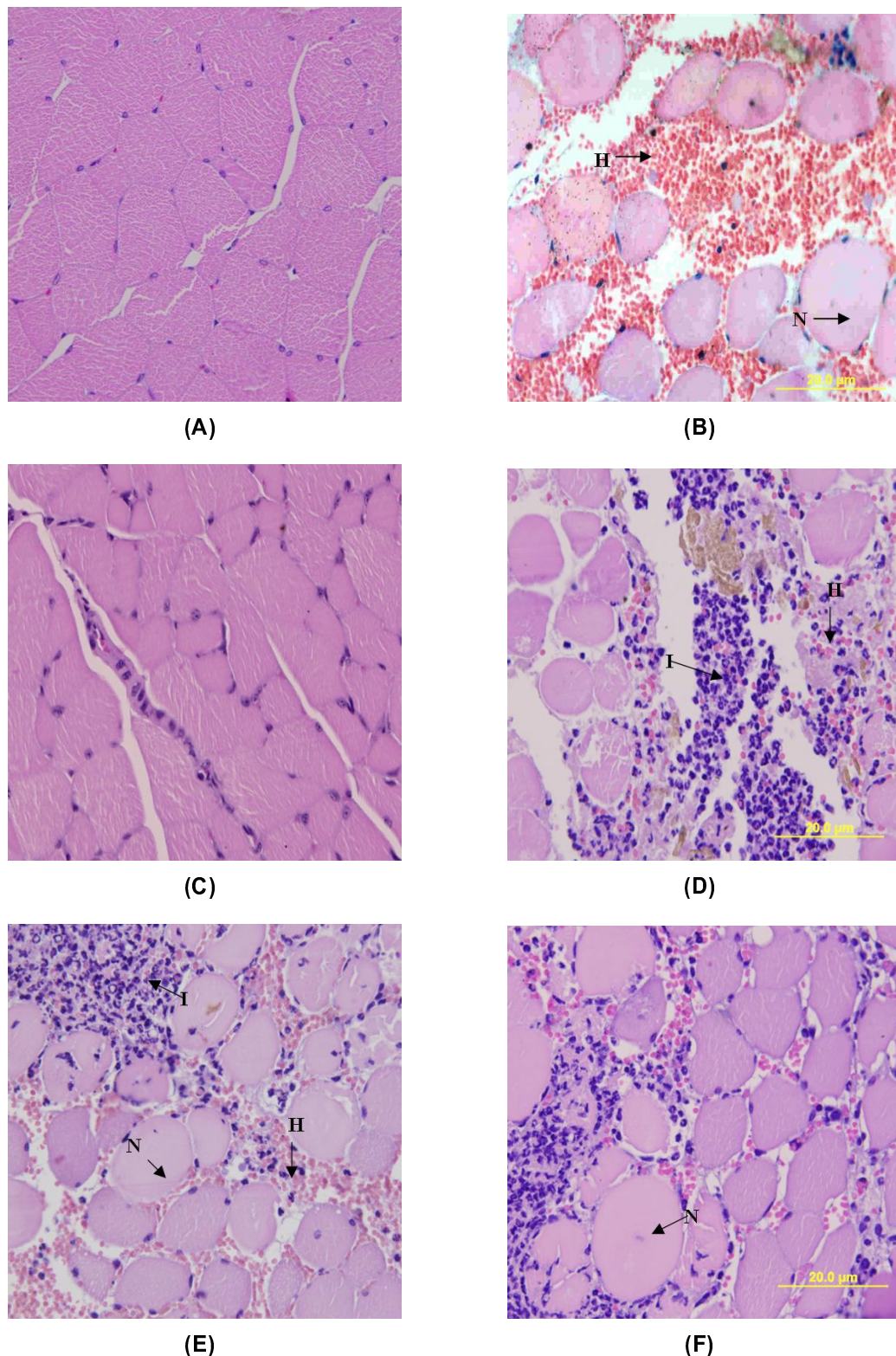


Figura 10: Histopatological analysis of the right gastrocnemius skeletal muscle of Swiss mice (18-22 g, n=4) 24 h after injection of 25 μ L of *Bp* venom dissolved in 50 μ L PBS, stained with hematoxin-eosyn. Mice were injected with PBS ((A)) or *Sp* alone ((C)); *Bp* venom ((B)); *Bp* venom incubated with *Sp* at 1:50 (venom/extract, w/w) ((D)). Treatment with *Sp* at the same route 15 min after *Bp* venom injection 1:50 ((E)) and 1:100 ((F)) (venom/extract, w/w). Some fibers were still preserved while others showed different stages of necrosis. Notice the presence of hemorrhage (H), necrosis (N), and abundant inflammatory infiltrate (I). 260X

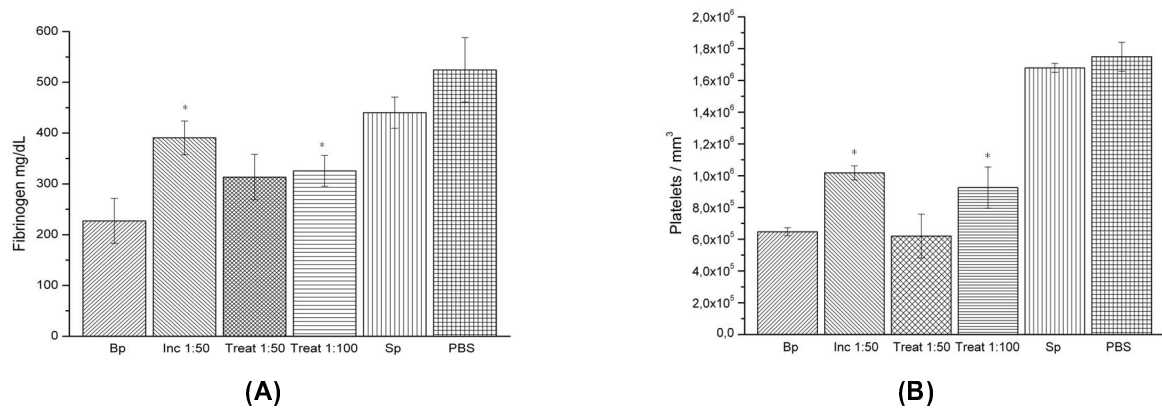


Figura 11: Inhibition of decrease of platelet, and plasma fibrinogen levels after *Bp* (50 μ g/50 μ L PBS) i.m. injection by *Sp* extract following incubation at a ratio of 1:50 venom/extract, w/w) by 30 min at 37 °C; or treatment with *Sp* at the same route 15 min after venom injection. For these experiments, were utilized the ratios 1:50 and 1:100 (venom/extract, w/w) ((**A**) plasma fibrinogen mg/dL, ((**B**) platelets 10⁶/mm³. Bars represent the mean $\pm$ S.D. (n=5). The difference between Absence and Presence of *Sp* was significant (p<0.05)

2.6 Referências

- 1 CHIPPAUX, J. P. Snake bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, p. 515–524, 1998.
- 2 LALLOO, D. G.; TREVETT, A. J.; SAWERI, A.; NARAQI, S.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. The epidemiology of snake bite in Central Province and National Capital District, Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 178–182, 1995.
- 3 WARRELL, D. A.; BHETWAL, B. B.; CHUGH, K. S.; LALLOO, D. G.; LOOA-REESUWAN, S.; WIN, M. M.; SJOSTROM, L.; THEAKSTO, R. D. G.; WATT, G.; WHITE, J. Asin snakes and snakebite. **Journal of Tropical Medicine Public Health**, v. 30, p. 1–85, 1999.
- 4 ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. (Ed.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. II, p. 345–384.
- 5 CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acidente crotálico na infância: aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, p. 87–96, 1991.
- 6 KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. Haemostatic changes caused by the venoms of South America snakes. **Toxicon**, v. 27, n. 9, p. 955–963, 1989.
- 7 GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.
- 8 NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. P. Clinical and epidemiological study of cases of lance-headed vipers. **An Tropical Medicine Parasitology**, v. 86, p. 89–91, 1992.
- 9 BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.
- 10 KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627–642, 1996.

- 11 GUTIÉRREZ, J. M.; ÁVILA, C.; ROJA, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1998.
- 12 HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1141–1148, 1983.
- 13 MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, p. 1131–1141, 1992.
- 14 PITHAYANUKUL, P.; RUENRAROENGSAK, P.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R.; SAEN-OON, S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 527–533, 2005.
- 15 CHERDCHU, E.; SRIDUKAVAT, K.; KOON, K. R. Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma sp.* (Zinngiberaceae). **Journal Medicine Thailand**, v. 61, p. 544, 1978.
- 16 PEREIRA, N. A.; PEREIRA, P. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta med**, v. 60, p. 99–100, 1994.
- 17 RODRIGUEZ, M.; CARVALHO, J. C. T.; LUCIA, M.; MESQUITA, J. M.; SARTI, S. J. Avaliação da atividade antiofídica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* sobre modelos animais estimulados com veneno de *Bothrops alternatus*. **III Jornada Paulista de Plantas medicinais**, v. 3, p. 110–111, 1997.
- 18 BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 21–29, 2005.
- 19 GUERRANTI, R.; AGUIYI, J. C.; ERRICO, E.; PAGANI, R.; MARINELLO, E. Effects of mucuna pruriens extract on activation of protrombin by echis carinatus venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 175–180, 2001.

- 20 IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRAMDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flaucortiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669–675, 2003.
- 21 OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANTANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213–216, 2005.
- 22 ADZU, B.; ABUBAKAR, M. S.; IZEB, K. S.; AKUMKA, D. D.; GAMANIEL, K. S. Effects of *Annona senegalensis* rootbark extracts on *Naja nigricottlis nigricottlis* venom in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 507–513, 2005.
- 23 MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER M, A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 364–370, 2005.
- 24 NUÑES, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1017–1025, 2005.
- 25 TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, N. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318–327, 2005.
- 26 SILVA, J. O.; COPPED, J. S.; FERNANDIS, V. C.; SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; MAZZI, M. V.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Anti-hemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract

- from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 145–152, 2005.
- 27 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; M., F. M. R.; GIGLIO, J. R. Strutural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 381, p. 213–224, 2000.
- 28 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 215–222, 1998.
- 29 BERCOVICI, D.; CHUDZINISKI, A. M.; DIAS, N. O.; ESTEVES, M. I.; HIRAICHI, E.; OISHI, N.; PICARELLI, Z. P.; ROCHA, M. C.; UEDA, C. M. P. M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A systematic fracionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 49, p. 69–78, 1987.
- 30 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- 31 GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potencyof the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1988.
- 32 ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Compendium Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 727–732, 1992.
- 33 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIO-ESCARSO, S. H.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from bothrops neuwiedi snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471–479, 2001.

- 34 R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, 2005. ISBN 3-900051-07-0.
- 35 SOARES, A. M.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs Future**, v. 29, p. 1105–1117, 2004.
- 36 BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on action of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Compendium Biochemistry Physiology**, v. 127, p. 21–30, 2000.
- 37 BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHECHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863–1869, 2001.
- 38 BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, p. 1017–1025, 2003.
- 39 ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63–68, 2002.

Capítulo 3

Estudo da toxicidade aguda do extrato vegetal
aquoso de *Schizolobium parahyba*

Abstract

Schizolobium parahyba (Sp) is a plant used against ophidism. Recent studies have been showing that the extract of Sp has potent effect against lesions induced by toxins presents in snake venoms. This work evaluated the acute toxicity of the aqueous extract of Sp after 24 hours of the administration i.p. in Swiss males mice (18-22 g). The acute toxicity was evaluated by analysis of biochemical, hematological and histopatological alterations. Alterations were observed in the transaminases levels, bilirubin, albumin and time of prothrombin, probably due to the hepatic alterations that were confirmed by light microscopia. The Histopathological analysis of the liver revealed the presence of inflammatory infiltrate. It was not found any other histopathologic alteration us other appraised organs due to the use of Sp. Our results confirm the low toxicity of the extract of *Schizolobium parahyba*. This study, therefore it serves as initial model for future researches that determine the acute toxicity of the extract of Sp and for discovery of doses that don't cause damages to the organism.

keyword: vegetal extract, acute toxicity, *Schizolobium parahyba*.

Estudo da toxicidade aguda do extrato vegetal aquoso de *Schizolobium parahyba*

Mirian Machado Mendes^a , Robson José de Oliveira Junior^a , Luiz Henrique Ferreira do Vale ^a , Tânia Machado Alcântara ^b , Amélia Hamaguchi^a , Maria Inês Homsí-Brandeburgo^a , Veridiana de Melo Rodrigues^a

^aInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia
- MG, Brazil

^bFaculdade de Medicina. Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia - MG, Brazil

Resumo

Schizolobium parahyba (*Sp*) é uma planta usada contra acidentes ofídicos. Estudos recentes têm mostrado que o extrato de *Sp* tem potente efeito contra lesões induzidas pelas toxinas presentes em peçonhas ofídicas. Este trabalho avaliou a toxicidade aguda do extrato aquoso de *Sp* após 24 horas da administração intraperitoneal em camundongos Swiss machos (18-22 g). A toxicidade aguda foi avaliada pela análise das alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. Foram observadas alterações nos níveis de transaminases, bilirrubina, albumina e tempo de protrombina, provavelmente devido às alterações hepáticas que foram confirmadas por microscopia de luz. A análise histopatológica do fígado revelou a presença de infiltrado leucocitário. Não foi encontrada nenhuma outra alteração histopatológica nos demais órgãos avaliados em decorrência do uso de *Sp*. Nossos resultados confirmam a baixa toxicidade do extrato de *Schizolobium parahyba*. Este estudo, portanto serve como modelo inicial para futuras pesquisas que determinem a toxicidade aguda do extrato de *Sp* e para descoberta de doses que não causem prejuízos ao organismo.

Palavras chave: extrato vegetal, toxicidade aguda, *Schizolobium parahyba*.

3.1 Introdução

Os produtos naturais vêm sendo usados pelo homem desde os primórdios da civilização humana para tratar e curar várias doenças^[1, 2]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 65 a 80% da população de países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas para a manutenção da saúde, devido a pobreza e a conseqüente falta de acesso a medicina moderna. Apesar disso, relativamente poucas plantas tem sido cientificamente estudadas quanto a sua qualidade, eficiência e segurança^[3]. A avaliação quanto à toxicidade das plantas é fundamental, pois o uso tradicional não é suficiente para validar a utilização de infusões, chás e compressas como medicamentos eficazes e seguros. Do ponto de visto toxicológico deve se considerar que uma planta medicinal não tem somente o efeito terapêutico esperado. Como todo composto estranho ao organismo sofre biotransformação e seus produtos podem ser tóxicos a ponto de causar danos á saúde. Muitas plantas apresentam significantes efeitos tóxicos como mutagenicidade, embriotoxicidade ou mesmo toxicidade sistêmica^[4], por isso é muito importante o estudo da toxicidade de plantas usadas como remédios.

O número de acidentes ofídicos na parte central do Brasil evidencia que o ofidismo, principalmente com serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas), constitui um problema de saúde pública. A única terapia para reverter os efeitos lesivos causados pelas picadas de serpentes é a soroterapia. Uma alternativa a soroterapia para neutralizar os efeitos lesivos das peçonhas é o uso de princípios ativos da flora medicinal para tratar os efeitos dos envenenamentos caracterizados por dor, edema, necrose do tecido muscular e hemorragia local e sistêmica^[5, 6, 7, 8].

O uso de folhas e sementes de *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) conhecida popularmente por faveira, guapuruvú ou umbela é uma prática tradicional na região do Triângulo Mineiro para tratar pessoas e animais que foram picados por serpentes. Estudos recentes têm mostrado que o extrato de *Schizolobium parahyba* tem potente efeito contra lesões induzidas pelas toxinas presentes na peçonha.

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade do extrato de *Sp* e estabelecer a segurança do uso de *Schizolobium parahyba* avaliando sua toxicidade aguda ensaiada

em camundongos.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Extrato vegetal

Foram coletadas folhas de uma planta previamente identificada numa área de cerrado modificado. As folhas de *Schizolobium parahyba* (Sp) foram lavadas e homogeneizadas com água desionizada em um triturador por 15 minutos a temperatura ambiente. O material foi filtrado e centrifugado a 30.000xg por 15 minutos e o sobrenadante foi liofilizado e estocado a -20°C . O extrato (EV) liofilizado das folhas foi pesado e dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) antes do uso. A concentração de extrato foi expressa em termos de massa seca liofilizada.

3.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (18-22 g) fornecidos pelo Instituto Valle do Brasil e mantidos no LEA (Laboratório de Experimentação Animal) da Universidade Federal de Uberlândia sob condições de temperatura e umidade controladas ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $60\pm 5\%$, respectivamente) e com dieta “*ad libitum*”.

3.2.3 Toxicidade aguda

Testes preliminares foram conduzidos para determinar a dose letal capaz de provocar a morte de 50% dos animais (DL50), após uma única administração do extrato vegetal de Sp. Grupos de 20 camundongos Swiss receberam 0,5 mg, 1 mg, 1,5 mg e 2 mg de extrato vegetal de Sp por grama de animal para determinação da DL50 de Sp e um grupo recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9% m/v). O extrato vegetal foi administrado por via intraperitoneal. Os animais foram observados quanto aos sintomas de toxicidade e mortalidade por 24 horas. Após 24 horas 10 animais de cada

grupo foram sacrificados e submetidos à punção cardíaca e necrópsia. Os 10 animais restantes de cada grupo foram observados por 7 dias.

A ração e água fornecida aos animais durante as 24 horas de teste foi pesada e medida, respectivamente, no início e término do experimento para averiguar se ocorreu a diminuição da ingestão durante a experimentação.

3.2.4 Análise do sangue

O sangue dos animais anestesiados foi coletado por punção cardíaca na presença ou não de anticoagulante EDTA ou citrato de sódio 0,130 M em eppendorfs. Parte do volume de sangue obtido de cada animal foi destinada para os testes bioquímicos e parte para a determinação dos parâmetros hematológicos.

3.2.4.1 Testes bioquímicos

O sangue coletado na presença de EDTA foi centrifugado a 2000x g por 20 minutos a 4 °C para a obtenção do plasma para quantificar albumina, glicose, uréia, creatinina e transaminases (AST e ALT). Com soro foram determinadas bilirrubina (total e direta). Para a quantificação desses analitos foram usados kits comerciais da marca Biotécnia - Brasil, utilizando espectrofotômetro da marca Pharmacia Biotech.

3.2.4.2 Parâmetros hematológicos

Amostras de sangue foram analisadas usando um contador automático de células da marca Sysmex LX -21N para contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e para a determinação da concentração de hemoglobina e hematócrito.

3.2.4.3 Análise histológica

Após a morte dos animais a cavidade torácica foi aberta. Os órgãos: fígado, rins, pâncreas, baço, coração e estômago foram submetidos à biópsia e a presença ou ausência de anormalidades macroscópicas foram observadas. Em seguida foram

fixados em salina com formol a 10% (v/v) por 24 horas e então foram desidratados e incluídos em blocos de parafina. Após a confecção das laminas os cortes de 5 μ m foram corados com HE.

3.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como desvio padrão médio (DP). A significância estatística dos resultados foram realizados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Com significância de $\alpha < 0,05$ usando o programa R Language^[9].

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Toxicidade aguda

Do ponto de vista toxicológico, deve se considerar que as plantas contém uma grande variedade de princípios ativos que podem levar a efeitos assintomáticos como efeitos nefrotóxicos e hepatotoxicidade^[10].

Imediatamente após as aplicações de *Sp* por via intraperitoneal efeitos adversos foram observados, tais como hipoatividade, contrações abdominais, ritmo de respiração acelerado, pelo eriçado e postura anormal (tabela 2). Estes sintomas foram sendo minimizados e desapareceram 50, 60, 80 e 120 minutos depois das aplicações para os grupos que receberam 0, 5; 1,0; 1,5 e 2, 0 mg de *Sp*/g animal, respectivamente.

Apesar dos sintomas iniciais, *Sp* não causou a morte de nenhum animal em todas as doses testadas (tabela 2). Este dado indica que provavelmente o extrato de *Sp* não é capaz de causar a morte mesmo em altas doses. A dosagem de 2 mg/g de animal corresponderia para um humano de 65 kg á dose de 130 g de extrato^[11, 2]. Ver as demais. Doses maiores não foram testadas devido a dificuldade de solubilização e administração do extrato de *Sp*.

Os animais que receberam 2 mg de *Sp* por grama de animal, administrados por via intraperitoneal tiveram perda de peso e significativa redução de 41 e 45% na ingestão

de água e ração, respectivamente, quando comparados ao grupo que recebeu solução salina (tabela 3).

A dosagem de parâmetros bioquímicos é um dos métodos utilizados para avaliação dos efeitos fisiológicos desencadeados no organismo após a administração de princípios ativos de plantas ou qualquer outra substância estranha ao organismo^[11]. A elevação de uréia e creatinina plasmáticas são consideradas como significativos marcadores de disfunções renais^[12]. O aumento de uréia no sangue pode estar relacionado com aumento do catabolismo de proteínas ou com mudanças histopatológicas nos rins que podem levar a distúrbios no sistema de transporte dos constituintes bioquímicos dos rins^[13]. Os níveis de uréia dosada no plasma não se apresentaram significativamente alterados nas primeiras 24 horas após a inoculação de *Sp* (tabela 4). O grupo controle apresentou média de 0,4 mg/dL de uréia enquanto o grupo tratado com 2mg*Sp*/g animal teve média de 0,37 mg/dL (tabela 4).

Sp parece não ter causado alterações na função renal dos animais (tabela 4) uma vez que não foi observado alterações nos níveis de creatinina. Os níveis séricos de creatinina aumentam à medida que ocorre a diminuição da taxa de filtração glomerular e por isso, esses níveis podem ser utilizados como marcadores da função renal^[14]. Corroborando com estes resultados, *Sp* também não induziu alterações morfológicas no tecido renal (resultados não mostrados).

Os níveis de glicose sangüínea foram significativamente alterados, a média do grupo tratado foi 78mg/dL de sangue enquanto a média do grupo controle foi de 159,25 mg/dL, como mostra a tabela 4. Vários estudos têm demonstrado que algumas plantas como *Bauhinia forficata*^[15] *Eugenia jambolana*^[16], *Salacia oblonga*^[17, 18], possuem princípios ativos capazes de promover a diminuição da glicemia, embora os mecanismos que promovam hipoglicemia não tenham sido demonstrados. Nossos resultados sugerem que o baixo índice glicêmico observado pode também ser devido à redução da ingestão de alimento nas 24 horas após a inoculação de *Sp*, como mostrado na tabela 3.

Os animais tratados com 2mg de *Sp* por grama de animal apresentaram níveis de bilirrubina direta e total, significativamente aumentados em 42 e 60%, respectivamente (tabela 4). Os valores de AST (aspartato transaminase) também se apresentaram

aumentados em aproximadamente duas vezes quando comparados ao controle com salina (tabela 4). Tanto a bilirrubina quanto as transaminases são produzidas no fígado que é um órgão muito importante devido ao seu papel chave na regulação de vários processos fisiológicos no organismo. O fígado está envolvido em várias funções vitais, tais como metabolismo, secreção e estoque, possuindo a capacidade de detoxificar o organismo exposto a compostos tóxicos^[19, 20, 21]. Assim a quantificação de enzimas hepáticas é um bom parâmetro para avaliar se estão ocorrendo lesões no órgão^[22, 23]. Elevados índices de ALT e AST no plasma são usualmente indicativos de doenças hepáticas^[24]. Os níveis de bilirrubina podem se elevar no plasma devido ao aumento da destruição de eritrócitos ou por lesões hepáticas como necrose periportal^[25, 11] que diminuem sua conjugação e conseqüentemente sua excreção^[14]. Nossos resultados demonstram que os valores aumentados de bilirrubina podem ser devidos a uma disfunção hepática preferencialmente do que um processo hemolítico intenso, haja visto que os valores obtidos no hemograma demonstram claramente que o extrato de *Sp* não foi capaz de causar nenhuma alteração significativa no número de células sangüíneas (tabela 5).

A diminuição da concentração plasmática de albumina, uma das proteínas mais abundantes no sangue, e dos fatores da coagulação sangüínea no plasma podem servir de marcadores para indicar se houve prejuízo na função de síntese hepática, pois estas proteínas são produzidas exclusivamente no fígado^[14]. Os animais tratados com *Sp* tiveram redução dos níveis de albumina no sangue em 21%, porém não são valores estatisticamente significativos (tabela 4). A avaliação do tempo de protrombina mostrou que o tempo de coagulação do plasma dos animais que receberam o extrato de *Sp* foi prolongado em 2 vezes sugerindo que a concentração plasmática de protrombina está reduzida, essa redução pode ser devido a lesões hepáticas. A avaliação dos níveis plasmáticos de albumina e protrombina mostrou alterações que embora não sejam significativas sugerem que a função de síntese do fígado nos animais tratados com *Sp* foi prejudicada.

Os testes bioquímicos quantificando bilirrubina, albumina, transaminases e tempo de protrombina mostram que o extrato de *Sp* administrado em altas doses pode causar prejuízos ao fígado dos animais tratados, esses resultados foram confirmados pela

microscopia de luz. Foi observado discreto infiltrado linfoplasmocitário (I) (fig. 12)

3.4 Conclusões

O presente estudo demonstra que o extrato de *Sp* quando administrado em altas doses apresenta baixa toxicidade, causando discretos danos ao fígado. Apesar disso acreditamos que o extrato de *Sp* pode ser usado para o isolamento de compostos ativos que possam ser utilizados como agente terapêutico contra o ofidismo desde que se estabeleça doses terapêuticas mas com cautela usando doses inferiores a de 2mg por grama de peso. Este estudo serve como modelo inicial para futuras pesquisas como genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e determinação da toxicidade crônica do extrato de *Sp* e compostos isolados para descoberta de doses que não causem prejuízos ao organismo.

3.5 Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Os autores agradecem também a Biotécnica Ltda pela doação dos Kits para a realização deste trabalho.

Tabela 2: Determinação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* administrado por via intraperitoneal em camundongos

Dose (mg <i>Sp</i> /g animal)	N° M/T(24 horas)	N° M/T(7 dias)	Sintomas de toxicidade
0	0/10	0/10	–
0,5	0/10	0/10	hipoatividade
1,0	0/10	0/10	hipoatividade, contrações, pêlo eriçado
1,5	0/10	0/10	hipoatividade, contrações, pêlo eriçado, postura anormal
2,0	0/10	0/10	hipoatividade, contrações, pêlo eriçado, respiração acelerada e postura anormal

M/T: mortes/camundongos tratados

Tabela 3: Ingestão de água e alimento de camundongos 24 horas após a inoculação de 2 mg/g de *Sp* por via intraperitoneal

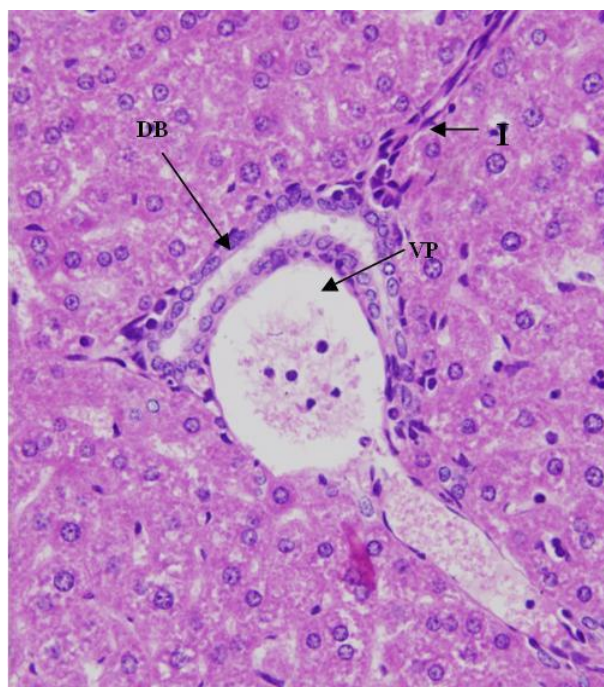
Dose (mg Sp /g animal)	Ração(g)	Água (mL)
0	45,05±0,5	60,55±0,6
2	*24,53±0,8	*35,97±0,7

Resultados são apresentados com média (n=10) e desvio padrão (*) A diferença entre ausência e presença de *Sp* foi significativa ($p<0.05$)

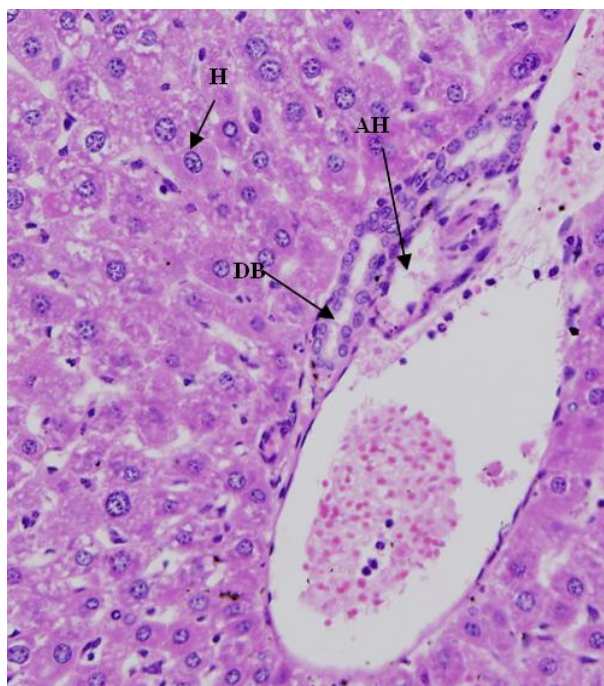
Tabela 4: Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com 2 mg de extrato de Sp por grama de animal

Dose (mgSp/g animal)	Albumina (g/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	Bilirrubina direta (mg/dL)	Bilirrubina indireta (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	TP (seg)	Uréia (mg/dL)
0	3,66±0,20	0,60±0,03	0,13±0,02	0,47±0,31	0,40±0,06	159,25±8,67	96,9±4,52	44,23±16,43	8,57±0,21	41,96±5,23
2	2,88±0,15	*1,05±0,22	*0,43±0,02	0,62±0,19	0,37±0,05	*78,93±15,84	*192,79±23,93	55,12±7,24	*21,43±2,06	41,25±6,13

Resultados são apresentados com média (n=10) e desvio padrão (*) A diferença entre ausência e presença de Sp foi significativa (p<0.05)



(A)



(B)

Figura 12: Análise Histopatológica do fígado de camundongos machos (18-22g) inoculados por via intraperitoneal com 2 mg de *Sp/g* animal (A) ou com 100 µL de salina (B) após 24 horas da inoculação. Observar as estruturas de VP (veia porta), DB (ducto biliar), AH (artéria Hepática), H (hepatócito) e a presença de discreto infiltrado linfoplasmocitário (I). 260x

Tabela 5: Efeito do extrato de *Sp* sobre as células do sangue

Parâmetros	Tratamento	
	Salina	<i>Sp</i> (2mg/g animal)
RBC ($10^6 \mu\text{L}$)	6,99 $\pm$ 0,73	7,26 $\pm$ 0,78
WBC ($10^3 \mu\text{L}$)	7,15 $\pm$ 1,18	6,65 $\pm$ 1,32
Hemoglobina (g/dL)	12,25 $\pm$ 1,16	12,8 $\pm$ 1,76
Hematocrito (vol. %)	41,7 $\pm$ 4,83	42,65 $\pm$ 5,19
Plaquetas ($10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	1249,67 $\pm$ 438,16	1133,75 $\pm$ 215,05

RBC= eritrócitos (Red Blood Cells), WBC= leucócitos (White Blood Cells). Resultados são apresentados com média (n=10) e desvio padrão

3.6 Referências

- 1 SWERDLOW, J. Nature's Medicine: Plants that health. **National Geographic Society**, 2000.
- 2 BALIGA, M. S.; JAGETIA, G. C.; ULLOR, J. N.; BALIGA, M. P.; VENKATESH, P.; REDDY, R.; RAO, K. V. N. M.; BALIGA, B. S.; DEVI, S.; RAJU, S. K.; BAIRY, K. L. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of sapharma *Alstonia scholaris* in mice and rats. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 317–326, 2004.
- 3 CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.
- 4 HILARY, J. E.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSE, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga reptans* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 43–50, 2004.
- 5 TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, v. 26, p. 292–300, 1989.
- 6 MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation from venoms of different species of *Bothrops* Snakes. **Toxicon**, v. 24, p. 713–723, 1991.
- 7 PEREZ, O. C. A.; KOSCINZUK, P.; TEILBLER, P.; NEGRETE, M. S.; RUIZ, R.; MURANAK, S.; BOGARIN, G. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almofadilla plantas del ratón inducidas por venenos de serpientes de corrales *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. **Toxicon**, v. 36, p. 1165–1172, 1998.
- 8 ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63–68, 2002.
- 9 R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, 2005. ISBN 3-900051-07-0.

- 10 EMEA – THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Position paper on the risks associated with the use of herbal products containing *Aristolochia* species. **EMEA/HMPWP/23/00**, 2000.
- 11 YOUSEF, M. I.; EL-DEMERDASH, F. M.; I.KAMEL, K.; AL-SALHEN, K. S. Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. **Toxicology**, v. 189, p. 223–234, 2003.
- 12 ALMDAL, T. P.; VILSTRUPP, H. Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea-N synthesis in experimental diabetes in rats. **Diabetologica**, v. 31, p. 114–118, 1988.
- 13 JANARDHAN, A.; RAO, A. B.; SISODIA, P. Short-term toxicity of methyl benzimidazole carbamate in dogs. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 704–711, 1988.
- 14 BENNETT, J. C.; PLUM, F. (Ed.). **Cecil - Tratado de medicina interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A., 1996.
- 15 DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. D. M. P.; AGUILAR, R.; RUDGE, M. V. C. Effect of *Bauhinia forticata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, p. 196–201, 2004.
- 16 SHARMA, S. B.; NASIR, A.; PRABHU, K. M.; MURTHY, P. S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 367–373, 2006.
- 17 HUANG, T. H.-W.; PENG, G.; LI, G. Q.; YAMAHARA, J.; LI, B. D. R. Y. *Salacia oblonga* root improves postprandial hyperlipidemia and hepatic steatosis in Zucker diabetic fatty rats: Activation of PPAR- α . **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, p. 225–235, 2006.
- 18 COLLENE, A. L.; HERTZLER, S. R.; WILLIAMS, J. A.; WOLF, B. W. Effects of nutritional supplement containing *Salacia oblonga* extract and insulinogenic amino acids on postprandial glycemia, insulinemia and breath hydrogen responses in healthy adults. **Nutrition**, v. 21, p. 848–854, 2005.

- 19 CLARKE, E. G. C.; CLARKE, M. L. Veterinary toxicology. In: . London: Cassel and Collier Macmillan, 1977. p. 268–277.
- 20 SHAHANI, S. Evaluation of hepatoprotective efficacy of APCL-A polyherbal formulation in vivo in rats. **Indian Drugs**, v. 36, p. 628–631, 1999.
- 21 ADENEYE, A. A.; AJAGBONNA, O. P.; ADELEKE, T. I.; BELLO, S. O. Preliminary toxicity and phytochemical studies of stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 374–379, 2006.
- 22 BIASI, F.; ALBANO, E.; CHIARPOTTO, E.; CORONGIU, F. P.; PRONZATO, M. A.; HARINARI, U. M.; PAROLA, M.; DIANZANI, M. U.; POLI, G. In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. **Cell Biochemistry and Function**, v. 9, p. 111–118, 1991.
- 23 OZARDALI; BITIREN, M.; KARAKILÇIK, A. Z.; ZERIN, M.; MUSA, D. Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental liver injury of rats. **Experimental and Toxicological Pathology**, v. 56, p. 59–64, 2004.
- 24 MANNA, Z.; GUOPEI, S.; MINUK, G. Y. Effects of hepatic stimulator substance herbal medicine selenium/vitamin E and ciprofloxacin on cirrhosis in the rat. **Gastroenterology**, v. 110, p. 1150–1155, 1996.
- 25 CLIFFORD, J. I.; REES, K. R. The action of aflatoxin B₁ on rat liver. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 65–72, 1967.

Anexos

NORMAS PARA CONFEÇÃO DA VERSÃO FINAL DO MESTRADO (fonte: www.cogeb.ufu.br)

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.
- Ficha Catalográfica: Deve ser colocada nas costas da CONTRA CAPA
- Palavras-chave: Deve ser colocada abaixo da Ficha Catalográfica na CONTRA CAPA
- Folha de Rosto com Curso, Título, Aluno, Comissão Examinadora, Cidade e Data

- 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)