

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES FIBRINOGENOLÍTICA E COAGULANTE
DAS PEÇONHAS DAS SERPENTES *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* PELO
EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DE *Schizolobium parahyba*

LUIS HENRIQUE FERREIRA DO VALE

Monografia apresentada à coordenação do curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Novembro-2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES FIBRINOGENOLÍTICA E COAGULANTE
DAS PEÇONHAS DAS SERPENTES *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* PELO
EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DE *Schizolobium parahyba*

LUIS HENRIQUE FERREIRA DO VALE

MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

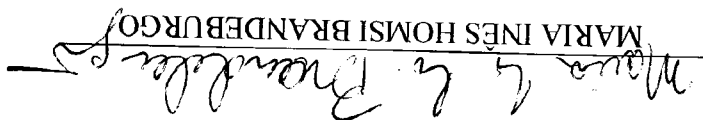
Monografia apresentada à coordenação do curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Novembro-2004

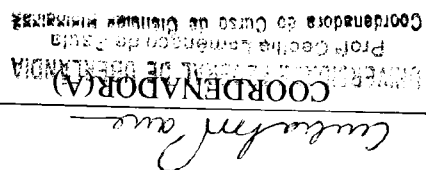
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES FIBRINOGENOLÍTICA E COAGULANTE
DAS PEÇONHAS DAS SERPENTES *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* PELO
EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DE *Schizolobium parahyba*

LUIS HENRIQUE FERREIRA DO VALE


MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

Homologado pela coordenação do Curso de Ciências
Biológicas em 24/06/05


COORDENADORA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Prof. Cecília Leal de Paula
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Novembro-2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus queridos irmãos Nilzinha, Cristininha, Laininha e João por sempre terem sido meus guias. Obrigado! Sem vocês eu nunca que conseguiria chegar até aqui! A minha mãe por me amar tanto e sempre ter lutado como uma leoa pelo meu melhor e ao meu pai por ter contribuído com seus 23 cromossomos que em mim se encontram, embora tenha transmitido alguns genes de que não gosto!

Um agradecimento muito especial a minha amiga Miriam por sempre ter me ajudado, por sempre ter sido uma pessoa verdadeira e por ter iniciado os trabalhos bioquímicos com a planta *Schizolobium parahyba*, que seu querido pai utilizava para tratar seu gado quando eram picados por serpentes.

Aos meus companheiros Rodrigo, Gívan, Luiz Fernando, Luis Carlos e Renata, por sempre terem me ajudado e por terem me ensinado como pesquisar. Obrigado!

Ao Meu camarada Fábio Lucas por ser um grande amigo!

Aos amigos do laboratório, André, Taininha, Marília, Carla, Cristiane, Luis Antônio, Daiane, e Carol

Agradeço aos professores Evandro, Sérgio e Chang do Instituto de Química da UFV, por terem me ajudado tanto com meu trabalho. A professora Dorila do Instituto de Química da UFMG pelas análises químicas. A professora Denise do Instituto de Ciências Agrárias pela ajuda em estatística. A Professora Amélia e Veridiana por sempre terem me auxiliado nas pesquisas.

Um agradecido especial às professoras Maria Inês e Cecília Lomônaco por acreditarem em meu potencial, por me ajudarem tanto e por sempre me incentivar a prosseguir. Obrigado!

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho em memória a dois grandes amigos de
infância que partiram tão cedo, mas que sempre estarão vivos em
meu coração! Micael e Artur...saudades mil!!!*

RESUMO

Schizolobium parahyba é uma planta brasileira de encosta de mata atlântica que é utilizada por alguns camponeses do Triângulo Mineiro contra acidentes ofídicos. Seguindo abordagem etnofarmacológica, demonstramos grande habilidade do extrato bruto aquoso (EA) desta planta na inibição das atividades coagulante e fibrinogenolítica induzidas pela peçonha bruta (PB) de duas espécies de serpentes: *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*. Na proporção de 1:5 (m/m; veneno/extrato) o EA elevou significativamente o tempo de formação da rede de fibrina na atividade coagulante das PB. A atividade fibrinogenolítica dos venenos, também foi neutralizada pelo EA na proporção de 1:10 (m/m; veneno/extrato), resultando em proteção total da cadeia BP e parcial da cadeia Aα do fibrinogênio. No entanto, na presença de concentrações maiores de extrato resultaram no desaparecimento de todas as cadeias do fibrinogênio numa possível precipitação. De acordo com os testes de análises químicas o EA parece ser grandemente constituído por saponinas e apresentou solubilidade total em água desionizada, o qual foi submetido ao fracionamento em resina Sephadex LH-20 e eluído com solvente orgânico com polaridade crescente. Três frações foram coletadas, as quais foram submetidas a rotoevaporação, liofilizadas e posteriormente testadas. A fração 100% metanólica mostrou proteção total das cadeias do fibrinogênio na proporção de 1:250, e baixa inibição da atividade coagulante. A fração metanol a 50% em água, mostrou resultados semelhantes ao da fração 100% metanólica, exceto pela proteção da cadeia Aα. Já a fração 100% aquosa apresentou proteção significativa contra a atividade coagulante das PB na proporção de 1:50.

Palavras chave: Extrato vegetal, *Schizolobium parahyba*, peçonha, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, análises químicas, fracionamento.

ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO.....	01
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	07
2.1-Materiais.....	07
2.1.1-Venenos brutos.....	07
2.1.2-Extrato vegetal.....	07
2.1.3-Reagentes.....	07
2.2-Métodos.....	08
2.2.1-Preparo das soluções de veneno.....	08
2.2.2-Preparo do extrato vegetal.....	08
2.2.3-Dosagem de proteína.....	08
2.2.4.1-Teste de solubilidade.....	09
2.2.4.2-Análise na região do UV-visível.....	09
2.2.4.3-Espectroscopia no infravermelho.....	09
2.2.4.4-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	10
2.2.4.5-Análise elementar de CHNSO.....	10
2.2.4.6-Filtração em Sephadex LH-20.....	10
2.2.5-Estudos de inibição.....	11
2.2.6-Atividade coagulante sobre o plasma bovino.....	11
2.2.7-Atividade fibrinogenolítica.....	11
2.2.8-Eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante.....	12
2.2.9-Testes estatísticos.....	12
3-RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	13
4-CONCLUSÃO.....	29
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> pelo extrato bruto aquoso de <i>Schizolobium parayba</i> (EA).....	14
Fig. 2: Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> pelo extrato bruto aquoso de <i>Schizolobium parayba</i> (EA).....	14
Fig. 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida (a 14% com agentes desnaturantes) do fibrinogênio bovino incubado a 37°C por duas horas com proporções crescentes de EA..	15
Fig.4: Espectro de RMN do ¹ H do EA em D ₂ O.....	16
Fig.5: Espectro de RMN do ¹³ C do EA em D ₂ O.....	17
Fig.6: Espectro de Infravermelho do EA.....	18
Fig.7: Espectro de Ultravioleta do EA.....	19
Fig. 8: Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> pelo traço F1 do extrato aquoso de <i>Schizolobium parayba</i>	20
Fig. 9: Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> pelo traço F1 do extrato aquoso de <i>Schizolobium parayba</i>	20
Fig.10: Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> pela traço F2 do extrato aquoso de <i>Schizolobium parayba</i>	22
Fig.11: Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> pela traço F2 do extrato aquoso de <i>Schizolobium parayba</i>	22
Fig. 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino resultante da ação da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i> combinada com F3 de <i>Schizolobium parayba</i>	22
Fig. 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida, a 14% com agentes desnaturantes, dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino resultante da ação da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> combinada com a traço F3 de <i>Schizolobium parayba</i>	23
Fig. 14: Inibição da atividade coagulante sobre o plasma bovino da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i> na presença de EA, F1, F2 e F3 de <i>Schizolobium parayba</i>	25
Fig. 15: Inibição da atividade coagulante sobre o plasma bovino da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> na presença de EA, F1, F2 e F3 de <i>Schizolobium parayba</i>	26

LISTA DE TABELAS

Tabela-1: Teste de solubilidade do EA.....	15
Tabela-2: Resultado da Análise Elementar de CHNSO do EA.....	17
Tabela-3: Resultados do fracionamento de EA em resina Sephadex LH-20.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

EA: Extrato bruto aquoso de *Schizolobium parahyba*

PB: Pecuinha bruta

Fib: Fibrinogênio bovino

Pla: Plasma bovino

F1: Fração 1 do extrato bruto aquoso de *Schizolobium parahyba*

F2: Fração 2 do extrato bruto aquoso de *Schizolobium parahyba*

F3: Fração 3 do extrato bruto aquoso de *Schizolobium parahyba*

RMN: Ressonância magnética nuclear

IV: Infravermelho

UV: ultravioleta

CHNSO: Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio, Enxofre e Oxigênio

1-INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e por um longo tempo produtos minerais, vegetais e animais foram a principal fonte de drogas (De Pasquale, 1984 apud Rates, 2000). Cerca de 25% das drogas prescritas no mundo inteiro são de origem vegetal sendo que cerca de 121 compostos ativos estão sendo usados correntemente (Rates, 2000). Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo das restantes são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Rates, 2000). Também foi estimado que em 1997 o mercado mundial de produtos fitoterápicos atingiu 10 bilhões de dólares com um crescimento anual de 6,5% (Soldati, 1997 apud Rates 2000).

Dessa forma fica clara a importância dos avanços científicos na área dos medicamentos advindos das plantas tanto em nível medicinal como financeiro. A humanidade tem na natureza uma infinidade de substâncias que ainda não foram conhecidas, descritas ou estudadas. Substâncias essas, que podem ajudar no tratamento de várias enfermidades que acometem o homem, como os acidentes com serpentes peçonhentas, que sabemos ser alto o seu número: De 1993 a 1995, 90 casos de acidentes ofídicos envolvendo a subfamília *Crotalinae* (gêneros *Bothrops* e *Crotalus*) e dois casos com o gênero *Micrurus* foram atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. As serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Micrurus* foram responsáveis por 74, 24 e 2 % dos acidentes notificados na região respectivamente (da Silva, et al., 2003). Em relação aos números da epidemiologia nacional, tivemos notificados de 1990 a 1993 cerca de 20.000 acidentes por ano, envolvendo 90 mortes (Brasil, 1998 apud da Silva et al., 2003). Dessa forma, os acidentes ofídicos constituem problema de saúde pública devido não só a grande incidência, mas também pela

gravidade e sequelas deixadas nos doentes (Ministério da Saúde, 1986; França, 1998). Deve-se considerar ainda o fato de que o soro antiofídico para ter uma boa ação depende de muitos fatores, como o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento, a sua especificidade ao gênero e limitação a reações de hipersensibilidade comuns em tratamentos à base de anticorpos. (Ownby et al., 1986; Gutiérrez et al., 1987; Moura-da-Silva et al., 1991)

O gênero *Bothrops*, encontrado em todo território nacional, é o grande responsável pelos acidentes com serpentes peçonhentas, chegando a quase 90% da totalidade dos casos (ROSENFELD, 1971; FERREIRA et al., 1992; RIBEIRO, 1993; BARRAVIERIA, 1994). Seu envenenamento causa disfunções no sistema de coagulação sangüínea, hemorragias, edemas e necrose local (MOURA-DA-SILVA et al., 1991), devido à presença, em sua peçonha, de uma mistura de substâncias tóxicas sobretudo de origem protéica (90 a 95% do seu peso seco), com grande variedade de enzimas proteolíticas.

Essas enzimas proteolíticas agem em vários substratos naturais como a hemoglobina, colágeno, fibrinogênio, caseína, gelatina, elastina e outros (IWANAGA & SUZUKI, 1979), sendo que muitas afetam a coagulação sangüínea atuando como prococagulantes na conversão de fibrinogênio em fibrina (ação coagulante tipo trombina) (MARKLAND, 1998; SMOLKA et al., 1998), ou como anticoagulantes por exercerem ação fibrinogenolítica e/ou fibrinolítica (DAOUD et al., 1986).

Recentemente, os pesquisadores tem isolado do veneno de serpentes brasileiras, glicoproteínas da classe das lectinas tipo-C que interferem na agregação plaquetária induzida pela trombina, como a botrojaracina, isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, a qual possui duas subunidades não idênticas de 15 e 13 kDa ligadas por pontes dissulfeto (ZINGALI et al., 1993; apud CASTRO et al., 1998), e a botroaltermina, purificada da peçonha de *Bothrops alternatus*, de 27 kDa identificada em ensaios de Western-blot usando anticorpos policlonais anti-botrojaracina (CASTRO et al., 1998).

As enzimas proteolíticas encontradas nos venenos de serpentes que causam disfunções no sistema de coagulação estão dentro de duas classes distintas de enzimas: as serinoproteases e as metaloproteases (SOUZA et al., 2001).

As serinoproteases são as chamadas “thrombin like”, apresentando atividades fibrinolíticas e fibrinogenolíticas. Atuam degradando as cadeias A α e B β do fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A e B e induzindo os monômeros de fibrina a se polimerizarem para a formação de um coágulo frouxo da rede de fibrina, por não serem capazes de ativar o fator XIII da cascata de

coagulação responsável pela formação do coágulo denso; e assim favorecem a fibrinólise (MAHIR et al., 1987). Logo, as “thrombin like” *in vivo* causam efeitos defibrinogénantes (anticoagulantes) mas *in vitro* são procoagulantes (OLIVEIRA, 2001).

Muitas dessas “thrombin like” foram purificadas de peçonhas de serpentes (ZANELLI et al., 1996 apud OLIVEIRA, 2001) e estão sendo usadas com grandes interesses na área médica em tratamentos clínicos de desordens do sistema de coagulação, prevenindo trombos, melhorando a viscosidade do sangue (STOCKER & MEIER, 1988), bem como na produção da cola de fibrina que é um adesivo biológico utilizado para aumentar o poder de cicatrização em suturas (LEITE et al., 2000; apud IZIDORO 2001).

A batroxobina uma “thrombin like” purificada da peçonha de *Bothrops atrox* (STOCKER & MEIER, 1988) vem sendo usada como agente anticoagulante e antitrombótico.

A elegaxobin, uma enzima purificada e caracterizada da peçonha de *Trimereurus elegans* (OYAMA et al., 2000) é mais uma “thrombin like” agora conhecida com capacidade de hidrolizar a cadeia α do fibrinogênio convertendo-o em fibrina.

As metaloproteases correspondem a um grupo de enzimas que também são encontradas em peçonhas de serpentes, são altamente tóxicas e muitas apresentam ação fibrinogenolítica (MARKLAND, 1998) assim como as serinoproteases, por hidrolizarem as cadeias do fibrinogênio, principalmente $\text{A}\alpha$ e $\text{B}\beta$. Possuem grandes interesses clínicos no combate à formação de trombos, e por isso seu estudo e purificação a partir de peçonhas de serpentes vem sendo cada vez mais difundido.

A neuwiedase é uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi* com ação fibrinogenolítica, proteolítica (sobre alguns componentes da matriz extracelular) e sobre a fibrina (RODRIGUES et al., 2000).

SIIGUR et al., (1996) purificaram uma metaloprotease da peçonha de *Vipera lebetina* denominada de lebetase com peso molecular de 23.700 kDa com o poder de hidrólise total da cadeia $\text{A}\alpha$ e parcial da $\text{B}\beta$ do fibrinogênio.

Além das serinoproteases e metaloproteases os venenos de serpentes possuem um grupo de polipeptídeos denominados desintegrinas que também causam disfunções no sistema hemostático. Essas proteínas de baixo peso molecular inibem a agregação plaquetária ao fibrinogênio devido à ligação de suas sequências RGD (Arg-Gly-Asp) ou KGD (Lys-Gly-Asp) aos receptores integrinas $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ das plaquetas (SCARBOROUGH et al., 1993 apud BORGES, 1998).

Muitas plantas são usadas na medicina popular para o tratamento contra acidentes ofídicos. Após uma longa pesquisa etnofarmacológica, que consiste na exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos tradicionalmente empregados ou observados por determinado agrupamento humano (MACIEL et al., 2002), Martz 1992, num trabalho de revisão, identificou 578 espécies de plantas superiores de 94 famílias como sendo ativas contra picada de serpentes. Algumas como *Schumanniohyton magnificum*, *Aristolochia radix*, *Eclipta prostrata* (Martz, 1992) e *Hemidesmus indicus* (Alam et al., 1994) já possuem seus princípios ativos isolados. Para tanto estes pesquisadores valeram-se de técnicas de investigação fitoquímica como análise de ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV) ultravioleta-visível (UV-visível) e análise elementar de CHNSO.

Utilizando estas técnicas, podemos conhecer o número, a natureza e a vizinhança de todos os prótons da molécula (Moura Campos, 1976; apud Borges, 1998), bem como a ausência e a presença de grupos funcionais e a porcentagem de átomos que compõem majoritariamente a matéria. Essas investigações químicas juntas representam uma eficiente ferramenta utilizada pelos químicos e bioquímicos para deduzir a estrutura de um composto (Allinger et al., 1976).

Na determinação estrutural de compostos orgânicos, uma vez determinado o esqueleto carbonado e o tipo de composto, o espectro de absorção de uma substância no UV-visível indica a presença de certos grupos funcionais, bem como a posição dos substituintes no esqueleto da molécula (Rücker et al., 1998; apud Simões et al., 2003).

O espectro IV de uma substância orgânica mostra o conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetida à radiação infravermelha e estas bandas correspondem às mudanças na energia vibracional dos compostos orgânicos. A energia seletivamente absorvida da radiação IV provoca alterações transitórias nas ligações interatômicas, que podem sofrer estiramento ou deformações nos ângulos de ligações. As frequências com que ocorrem as vibrações dependem da natureza das ligações em particular, e da presença de insaturações (conjugadas ou não); sistemas aromáticos e grupos funcionais específicos podem ser verificados por meio de bandas características, que têm grande importância na análise estrutural (Cirelli & Deluca, 1995).

Por outro lado, a espectroscopia de RMN é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto da molécula. Para a obtenção de espectros de ressonância, submete-se a amostra a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos que apresentam um momento magnético nuclear (núcleos com número de massa ímpar como ^1H , ^{13}C , ^{31}P , por exemplo) podem entrar em

ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua vizinhança química (Nascimento & Bloch Jr, 2001).

Os dados obtidos com esse método espectroscópico são muito importantes para a elucidação estrutural de praticamente todas as classes de produtos naturais, incluindo os metabólitos secundários vegetais. Os espectros de RMN de próton e carbono ¹³ são os mais utilizados e a sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização do deslocamento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética (Böcker, 1997; Cordell, 1995; apud Simões et al., 2003).

Geralmente, é graças ao conjunto de dados espectrais que o pesquisador consegue elucidar completamente a estrutura de uma substância desconhecida. Essas informações servem também como instrumentos importantes para a avaliação da qualidade de fitoterápicos, tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo (Simões et al., 2003).

Borges (1998) ao fracionar o extrato aquoso de *Casuarina sylvestris*, uma planta estudada justamente pelo seu extrato apresentar ação antiofídica, em resina Sephadex LH-20, obteve frações metanólicas que foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (¹H) e IV. As frações iniciais apresentaram açúcares, provavelmente oligossacarídeos e nas últimas foram detectadas algumas substâncias avermelhadas contendo em sua estrutura molecular um sistema aromático.

Observamos, então, um grande dispêndio em pesquisa de vários centros bioquímicos e farmacológicos sobre a fitoterapia, o que nos revela a importância das substâncias obtidas dos produtos naturais. Se tratando de compostos antiofídicos também encontramos muitos trabalhos publicados sendo que alguns destes já demonstraram terem isolado algumas substâncias com essa propriedade como no caso da wedelolactona (Mors et al., 1989 apud Martz 1992) e o ácido aristolochio (Tsay et al., 1980 apud Martz 1992). Futuramente essas substâncias poderão estar sendo usadas como formas alternativas ou complementares para o tratamento de acidentes ofídicos.

Estudos preliminares com *Schizolobium parahyba* estão sendo desenvolvidos na tentativa de descobrir se essa planta realmente apresenta ação antiofídica, como relatado em nossa cultura popular regional.

A planta *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae), conhecida popularmente em nossa região como Biroscá, é uma árvore que ocorre da Bahia até Santa Catarina, nas florestas pluviais de encosta da Mata Atlântica e foi difundida também para o Estado de Minas Gerais (Standley & Steyermark, 1946; Schery, 1951; Lewis, 1987). Estudos bioquímicos usando o extrato vegetal dessa

planta já vêm sendo desenvolvidos por profissionais da área como no caso de Teles et al., (1999), identificaram e isolaram um inibidor protéico de quimotripsina denominado SPCI; De-Souza-Elizabeth et al., (2000), testaram efeitos de agentes desnaturantes e estabilizantes na atividade inibitória e estabilidade conformacional do mesmo inibidor de quimotripsina; Mendes et al. (2002) e Vale et al., (2002, 2003) que identificaram para o extrato bruto das folhas e sementes de *S. parahyba* inibições significativas de algumas atividades proteolíticas do veneno de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

O presente trabalho teve como objetivos testar a eficiência do extrato aquoso (EA) de *Schizolobium parahyba* em neutralizar as atividades coagulante e fibrinogenolítica da peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni* e *Bothrops alternatus*. Fazer a caracterização química parcial do EA por testes de solubilidade, análise espectroscópica no IV, no UV-vis, por RMN do ^1H e ^{13}C e análise elementar de CHNSO. Fracionar o EA em resina Sephadex LH-20 e analisar as frações obtidas sobre as atividades coagulante e fibrinogenolítica da PB.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Materiais

2.1.1-Venenos brutos

Os venenos de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* que foram utilizados neste trabalho foram doados pela profa. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites, responsável pelo Setor de Répteis da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A peçonha bruta foi dessecada a vácuo, em temperatura ambiente e depois armazenada a -20°C .

2.1.2-Extrato vegetal

Folhas e flores de *Schizolobium parahyba* foram coletadas no Campus Umuarama, no município de Uberlândia-MG, para serem identificadas e feita a exsiccata pelo Botânico Prof. Dr. Jimi Naoki Nakajima do Instituto de Biologia da UFU, sendo que as folhas recém colhidas foram diretamente levadas para o preparo da solução do extrato.

2.1.3-Reagentes

Acrilamida, Bis-acrilamida (N,N-metilenobisacrilamida), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino), SDS (dodecil sulfato de sódio), Coomassie Brilliant Blue R-250, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), Azul de Bromofenol, β -Mercaptoetanol, Persulfato de Amônio,

2.2-Métodos

2.2.1-Preparo das soluções de veneno

Soroalbumina bovina, Tris-HCl, Glicina, Glicerol, Metanol, Etanol, Ácido Acético Glacial, Fibrinogênio bovino, Hexano, Clorofórmio, Acetona, Metanol, Etanol (todos da Sigma Chem. Co.) e Resina Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech). O Plasma bovino foi obtido de animais saudáveis, disponíveis no hospital veterinário da UFU. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2.2-Preparo do extrato vegetal:

Cerca de 2,3mg de cada peconha foram pesados, dissolvidos em 1ml de solução salina e centrifugados a 20.000 x g por 10 minutos a -4°C em centrífuga SIGMA Laborzentrifugen 2K15 e o sobrenadante foi coletado e aliqotado para uso posterior.

O extrato vegetal foi preparado a partir de aproximadamente 30g de folhas, que foram lavadas e trituradas com 1L de água desionizada em um liquidificador comum por 5 minutos e filtradas em gaze. O filtrado foi centrifugado à 30.000xg por 20minutos em centrífuga SIGMA Laborzentrifugen 2K15 e o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C. No momento do experimento o extrato foi pesado e suspenso em salina.

2.2.3-Dosagem de proteína

A quantificação das proteínas presentes nas amostras de venenos foi feita pelo método do microbiureto (TTZAKI & GILL, 1964) que utiliza a soroalbumina bovina para estimar a reta padrão. Foram preparadas 4 amostras e colocadas cada uma em um tubo de ensaio com os devidos reagentes, conforme descrito abaixo:

Tubos	PB	Água desionizada	R1*	R2*	Volume final
1	25 µl	975 µl	500 µl	----	1500 µl
2	25 µl	975 µl	----	500 µl	1500 µl
3	----	1000 µl	500 µl	----	1500 µl
4	----	1000 µl	----	500 µl	1500 µl

A leitura no espectrofotômetro (SPEKOL) a 310nm foi feita para todos os tubos, sendo que o tubo 3 era o branco sem proteína para o tubo 1, e o tubo 4 era o branco sem proteína para o tubo 2.

*O reagente R1 é composto por 0,21% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em NaOH 30% e o reagente R2 é formado por uma solução de NaOH 30%, que foram preparados de acordo com a metodologia do método do microbiureto.

2.2.4.1-Teste de solubilidade

Neste teste, segundo Demuner et al., 2000 com modificações, foram utilizados 3 ml de cada um dos seguintes solventes disponíveis no laboratório: hexano, clorofórmio, acetona, metanol, etanol e água desionizada. Posteriormente, 0,1 mg de extrato liofilizado foram acrescentados a cada solvente, agitados em agitador magnético durante 10 min, a temperatura ambiente, e colocados em tubos de ensaios encapados com papel alumínio para controle de luminosidade. Após 24 horas a solubilidade da amostra foi verificada da seguinte maneira: com precipitado sem turvação do solvente = insolúvel; com precipitado e leve turvação do solvente = pouco solúvel; com precipitado e grande turvação do solvente = solúvel.

2.2.4.2-Análise na região do UV-visível

A principal função da espectrofotometria no UV-visível é identificar e quantificar grupos de substâncias que exibem a característica de absorver luz na faixa compreendida entre 200 a 850 nm. Aliquota de 1,5 µl de uma solução aquosa de EA numa concentração de 1mg/44ml foi colocada em uma cubeta de quartzo, que possui a característica de ser inerte aos comprimentos de onda do UV-vis, para análise. As investigações foram feitas em espectrofotômetro marca Hitachi modelo U-2000 do Laboratório de Produtos Naturais e Química da Madeira do Instituto de Química da UFU.

2.2.4.3-Espectroscopia no infravermelho

O extrato liofilizado foi misturado com brometo de potássio na proporção de 1:99 e triturado em um cadinho de ágata. Em seguida, uma porção foi prensada em uma prensa hidráulica a uma pressão de 2500Kg/m² por 20 segundos. Posteriormente a amostra foi colocada no suporte próprio

do aparelho para análise. O aparelho usado foi um espectrofotômetro de infravermelho da marca Shimadzu modelo DR-8001/FTIR-81.

2.2.4.4-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A amostra de 1,0 mg de EA liofilizada foi dissolvida em água deuterada e analisada por espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C no espectrofotômetro da marca Bruker modelo AVANCE DRX-400 de 400 MHz do LAREMAR, do Departamento de Química da UFMG com a colaboração da Dra. Dorila Piló-Veloso.

2.2.4.5-Análise elementar de CHNSO

A massa de 1,0 mg da amostra liofilizada foi analisada pelo Instituto de Química da USP-São Paulo em um analisador de elementos da Perkin-Elmer modelo 2400 CHN da série II. A referida amostra foi queimada em um forno de resistência onde C, H e S foram detectados por absorção de infravermelho e N por célula de condutividade térmica. Adicionando um forno de pirólise externo, o Oxigênio também foi medido com precisão por célula de infravermelho. Resultados precisos foram disponibilizados em aproximadamente 3 minutos.

2.2.4.6-Filtração em Sephadex LH-20

O extrato de *Schizolobium parahyba* foi fracionado em uma coluna cromatográfica utilizando como resina Sephadex LH-20. Foram ressuspendidos aproximadamente 0,1g do extrato em 3ml de metanol (MeOH) e adicionados à coluna previamente equilibrada com este mesmo solvente. A amostra foi eluída primeiramente com MeOH a 100%, a seguir com MeOH a 50% em água desionizada e finalmente em água desionizada. Foram coletadas frações contendo um volume e meio de coluna, em temperatura ambiente. As três frações foram passadas no evaporador rotatório TECNAL TE 210 para retirar o solvente orgânico e posteriormente liofilizadas e armazenadas a -20°C.

2.2.5-Estudos de inibição

Os ensaios de inibição dos venenos pelo extrato vegetal foram realizados por testes *in vitro* para as atividades coagulante e fibrinogenolítica. Para cada ensaio foram feitos: controle positivo (na presença apenas de PB), controle negativo (presença apenas de EA ou fração de EA) e tratamentos testes (PB mais EA e PB mais fração de EA) .

As amostras de PB mais EA não eram incubadas antes de adiciona-las ao substrato. Eram misturadas e imediatamente testadas no plasma bovino ou fibrinogênio. A quantidade de PB a ser utilizada iniciou sempre com 10µg de proteínas para a atividade coagulante e 5µg para a atividade fibrinogenolítica. As relações PB + EA e PB + fração de EA foram fixadas em proporção massa/massa e podem ser visualizadas nos resultados.

2.2.6-Atividade coagulante sobre o plasma bovino

Os testes de coagulação (Assakura et al., 1992) foram realizados em aparelho coagulômetro Quick Timer (DRAKE LTDA) que determina o tempo de coagulação de uma amostra (150µl), até um tempo máximo de 120s, utilizando um sistema óptico que detecta a variação brusca da densidade ótica da amostra no instante da coagulação. Inicialmente 100 µl de plasma bovino foram incubados a 37°C. A seguir, 10µg de PB foram dissolvidos em solução salina até um volume final de 50µl para cada ensaio e adicionados ao plasma. O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi medido em segundos e apontado imediatamente pelo aparelho, sendo que a inibição da atividade foi observada de acordo com o aumento do tempo de coagulação em relação ao controle positivo.

2.2.7-Atividade fibrinogenolítica

Segundo a metodologia de EDGAR & PRENTICE, 1973; modificado por OLIVEIRA, 1999, soluções de 50 µl de fibrinogênio em salina (1,5mg/ml) foram incubadas com 5 µg de PB a 37°C por duas horas. A reação foi interrompida após o tempo determinado por adição de um volume de STOP (solução de Tris-HCl 0,06M pH 6,8 contendo glicérol a 10% e azul de Bromofenol a 0,001%) equivalente à metade do volume da amostra, e um volume de β-Mercaptoetanol equivalente a 10% do volume da amostra mais o STOP. Em seguida, todo esse conjunto foi aquecido a 100°C em

banho-maria por 3 minutos, sendo retirados 10 a 20µl que eram aplicados em gel de poliacrilamida a 14% com agente desnaturante (PAGE SDS).

2.2.8-Eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (PAGE SDS)

Segundo Laemmli, 1970, a eletroforese foi realizada em SDS apresentando gel de separação a 14% e gel de empilhamento a 5%, com tampão dos eletrodos composto por Tris-HCl 0,1M pH 8,3, EDTA 7,8mM, glicina 0,77M e SDS 0,3% submetidos a uma corrente elétrica de 25mA por aproximadamente 40 minutos conforme descrito abaixo:

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

Após a corrida das amostras, o gel foi corado em Coomassie Blue R-250 a 0,1% (m/v), dissolvido em água desionizada: metanol: ácido acético glacial (40: 50: 10 v/v) e descorado em água desionizada: etanol: ácido acético (60: 30: 10 v/v). Em seguida secado em papel celofane.

2.2.9-Testes estatísticos

Os resultados da atividade coagulante foram submetidos aos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov, para ver se a distribuição seguia uma curva normal. Teste de Kruskal-Wallis, para analisar se existia diferença significativa nos tempos de coagulação entre os tratamentos, e teste de Tukey-tipe (comparações múltiplas) para verificar entre quais tratamentos foram significantes essas diferenças (ZAR, 1999).

3-RESULTADOS E DISCUSSÕES

As figuras 1 e 2 mostram o efeito de EA de *Schizolobium parahyba* sobre a atividade fibrinogenolítica das peçonhas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*, respectivamente. Levando em conta que as peçonhas botrópicas apresentam toxinas com diferentes especificidades de hidrólise do substrato, o que pode ser visualizado pelos produtos de degradação do fibrinogênio obtidos após incubação a 37°C por duas horas com as respectivas peçonhas, notamos hidrólise total das cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio, causada pela PB (linhas 2). Quando o fibrinogênio, PB e EA eram incubados, em concentrações crescentes de EA, observou-se um aumento da proteção da cadeia Bβ do fibrinogênio até a proporção de 1:10 (linhas 3, 4 e 5). Note nas linhas 5 a cadeias Bβ intacta e resquícios da Aα. Em contrapartida, nas proporções acima de 1:10 não houve contínuo aumento da proteção das cadeias do fibrinogênio como numa curva dose resposta, mas sim uma diminuição das intensidades das bandas marcadas na eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (PAGE SDS) (linhas 6, 7, 8 e 9).

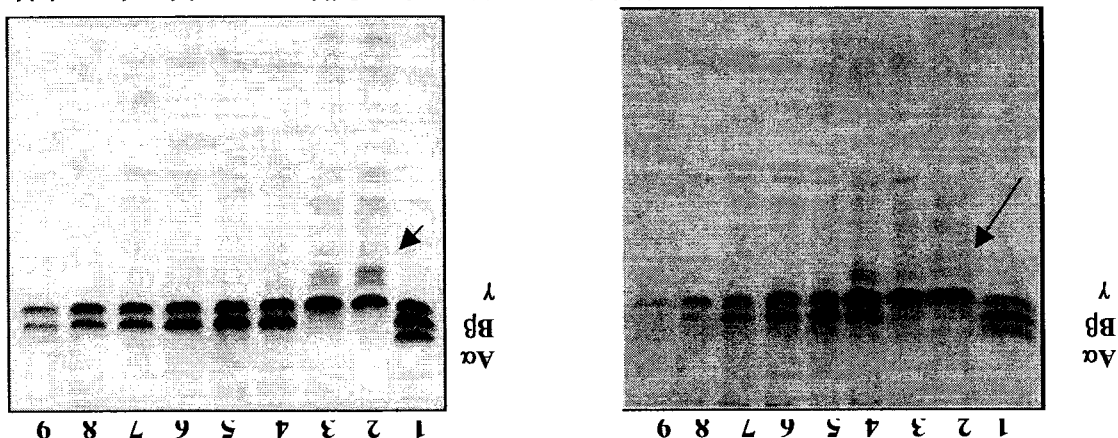
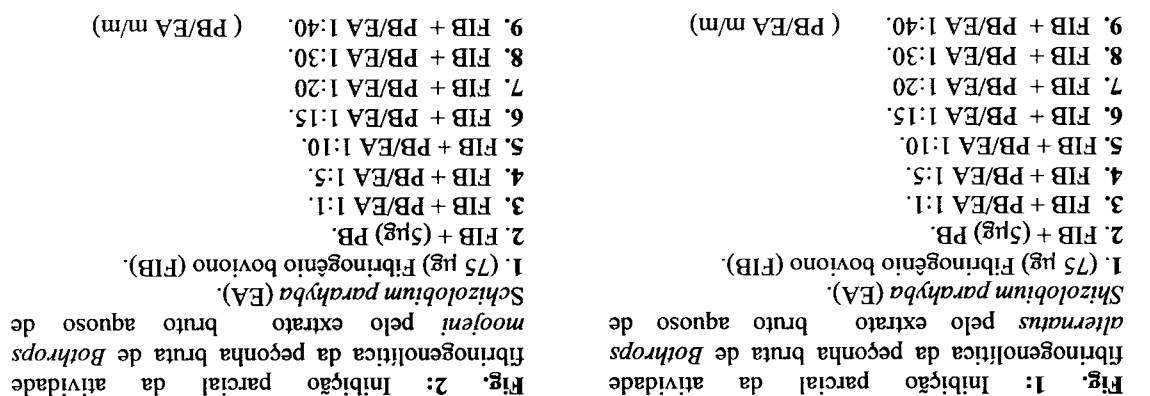
De modo geral, independentemente da peçonha estudada, sugere-se proteção total da cadeia Bβ e parcial da cadeia Aα do fibrinogênio bovino, na proporção 1:10 (m/m; PB/EA). A partir dessa concentração as cadeias do fibrinogênio começam a desaparecer, inclusive a cadeia γ que não é afetada pela PB como mostra o controle positivo (linhas 2). No entanto, o desaparecimento dessas bandas não é acompanhado pelo aparecimento de bandas minoritárias, como indicado pelas setas nas figuras 1 e 2, que representam produtos de degradação das cadeias do fibrinogênio. Esse desaparecimento das cadeias do fibrinogênio em doses elevadas de EA (melhor visualizado na figura 1) parece ser efeito da precipitação de proteínas causado por taninos que possuem a habilidade de se complexar com macromoléculas (Simões et al., 2003), uma vez que as bandas de degradação não

A figura 3 mostra o efeito de concentrações crescentes do EA de *Schizolobium parahyba* sobre o fibrinogênio. Na linha 1 temos as cadeias do fibrinogênio intactas como um controle. Nas

moléculas tais como proteínas e polissacarídeos (Haslam, 1998 apud Simões et al., 2003).

2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e 3) habilidade de complexar com outras complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis: 1) atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais urinário e processos inflamatórios em geral (Dufrasne & Farnworth, 2001). Acredita-se que as problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas

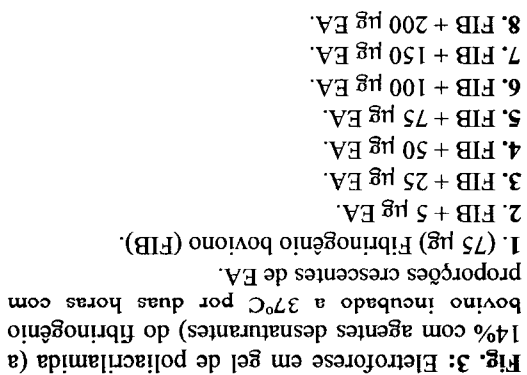
fibrinogênio a partir daí não mais poderia ser observada. aumentando o efeito de precipitação das proteínas do ensaio. Assim, a proteção das cadeias do da concentração de EA estaríamos então atingindo uma melhor razão taninos, proteínas, apresentam quantidades significativas de taninos solubilizados (Simões et al., 2003). Com o aumento são mais observadas como no controle positivo e que extratos aquosos de plantas geralmente



habilidade em solubilizar-se em outros solventes q
podemos inferir que o EA deve apresentar quantidade
mais solúveis quanto maior a polaridade do solvente
apresentam elevada polaridade como algumas classes
et al., 2003) que podem estar presentes no EA.

et al., 2003) que podem estar presentes no EA.

	H ₂ O destilada	MeOH	Etanol	Acetona	Cloroformo	Hexano
Solvel	X					
Parcialmente solvel		X	X			
Pouco solvel				X		
Insolvel					X	X



As figuras 4 e 5 mostram os espectros de RMN do ^1H e do ^{13}C do EA em D_2O . Nota-se que EA está constituído fundamentalmente por substâncias ricas em carbonos hidroxilados (região entre 3 a 4 ppm na figura 4 e 60 a 90 ppm na figura 5), indicando a presença de carboidratos. Sinais de carbonos aromáticos são pouco significativos. Sabemos que saponinas são substâncias que possuem estas características. Elas representam um grupo de glicosídeos que se dissolvem em água diminuindo a tensão superficial desta e que por hidrólise liberam carboidratos e uma aglicona chamada genericamente de sapogenina a qual possui um esqueleto esteroide com um número variável de insaturações, hidroxilas, grupos cetônicos e outros grupos oxigenados ligados (Domingues, X. A., 1973). Assim apresentam estruturas com um número variado de açúcares em forma de cadeias lineares ou ramificadas e ainda uma parte hidrofóbica (triterpeno ou esteróide) (Simões et al., 2003).

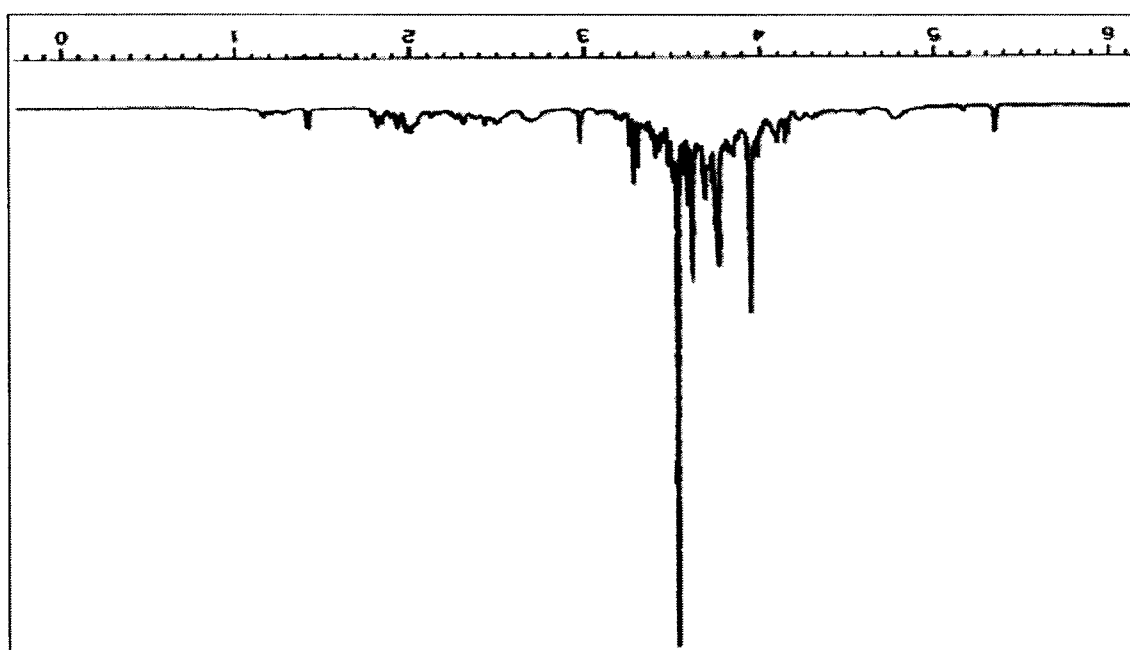


Fig. 4: Espectro de RMN do ^1H do extrato aquoso de *Shizolobium parahyba* em D_2O . Amostra de 1,0 mg do extrato liofilizado foi dissolvida em água deuterada e aplicado ao aparelho espectrofotômetro da marca Bruker modelo AVANCE DRX-400 de 400 MHz do LAREMAR, do Departamento de Química da UFMG.

Os resultados para a análise elementar de CHNSO do EA estão representados na tabela 2. Eles são concordantes com os resultados da RMN pois indicaram quantidades significativas de carbono, oxigênio e hidrogênio.

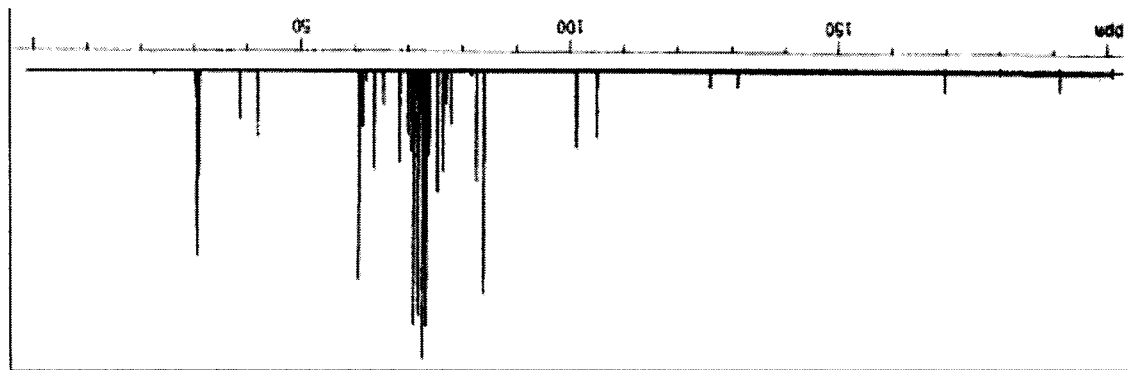


Fig. 5: Espectro de RMN do ^{13}C do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* em D_2O . Amostra de 1,0 mg do extrato liofilizado foi dissolvida em água deuterada e aplicado ao aparelho espectrofotômetro da marca Bruker modelo AVANCE DRX-400 de 400 MHz do LAREMAR, do Departamento de Química da UFMG.

Tabela 2. Resultado da análise elementar de CHNSO do EA de *Schizolobium parahyba*.

	Porcentagem de átomos numa amostra de 1mg do EA
Carbono	40,0
Hidrogênio	5,00
Nitrogênio	0,80
Enxofre	0,60
Oxigênio	53,6

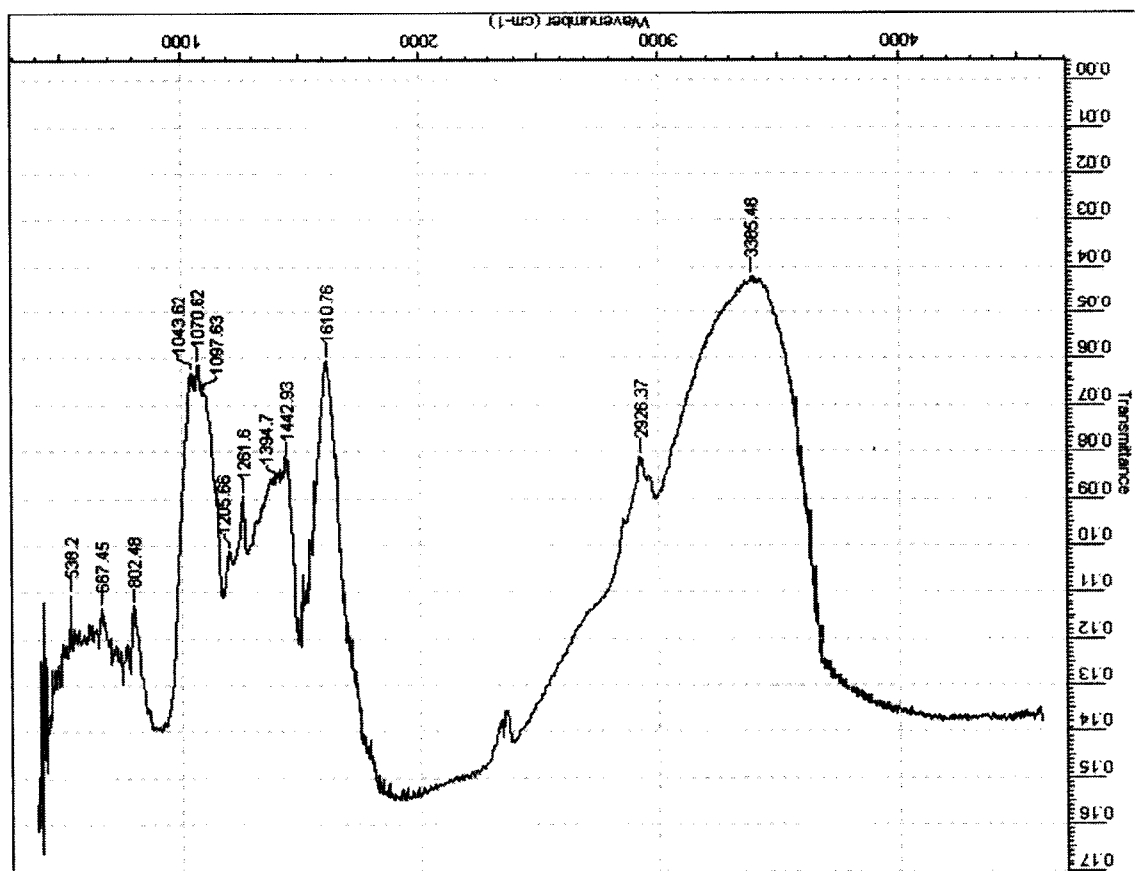
A figura 6 apresenta o espectro de IV do EA, o qual é muito parecido com o de algumas saponinas pela presença dos picos $3385,48\text{ cm}^{-1}$ (característico dos estiramentos de hidroxilas), $2926,37\text{ cm}^{-1}$ (estiramento característico de ligação carbono hidrogênio) e dos numerosos picos na região entre $1250\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ (Domingues, X. A., 1973).

Após efetuar uma corrida no espectrofotômetro do UV-Vis de 190nm até 800nm de uma amostra aquosa do EA foi observado que este não apresentou absorção da luz visível, mas sim na região do UV. Dessa forma foi realizada uma nova corrida da mesma amostra apenas na região do UV e os resultados obtidos estão apresentados na figura 7. Esses resultados reforçam muito a suposição de que o EA é grandemente constituído por saponinas, que apresentam pico de absorção entre 203nm e 210nm, no qual as insaturações dos núcleos agliconas são os grandes responsáveis (Simões, et al., 2003), uma vez que o espectro de UV do referido experimento apresentou um pico

de absorção da luz ultravioleta em 205nm. Ademais, não se pode descartar a presença de compostos fenólicos, que como as saponinas sempre estão presentes em extratos aquosos, e que apresentam grande absorção da luz na faixa do UV, embora os testes de ressonância magnética nuclear não tenham identificado fortes traços de carbonos aromáticos.

Assim, com a junção desses resultados de análises químicas sofisticadas, que foram se completando, conseguimos chegar a uma hipótese bem mais segura do constituinte majoritário do EA que demonstrou ser grandemente composto por saponinas pois foram estas que sempre deram sinais de presença em todas as análises, embora não possamos afirmar que seja esse grupo de substância que pode estar apresentando atividade contra as enzimas proteolíticas do veneno de algumas serpentes. É claro que a espectroscopia de UV-vis, somente, por exemplo, não seria

Fig. 6: Espectro de IV do extrato aquoso de *Shizolobium parahyba*. O extrato liofilizado foi misturado com brometo de potássio na proporção de 1:99, triturado e prensado em uma prensa hidráulica a uma pressão de 2500Kg/m² por 20 segundos. Posteriormente a amostra foi colocada no suporte próprio do aparelho espectrofotômetro de infravermelho da marca Shimadzu modelo DR-8001/FTIR-81 para análise.



suficiente para chegarmos a essa hipótese assim como a RMN também não. Foi de extrema importância a utilização dos dados dos quatro tipos de análises realizadas.

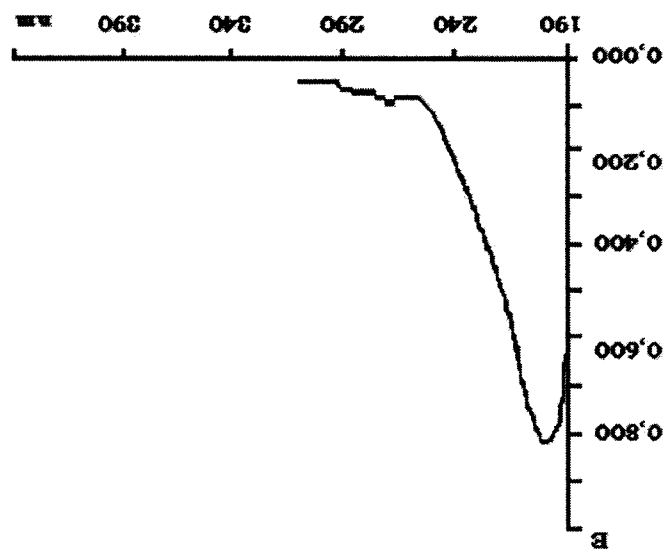


Fig. 7: Espectro do UV do extrato aquoso de *Shizolobium parahyba* (EA). Aliquota de 1,5 µl de uma solução aquosa do EASP numa concentração de 1mg/44ml foi submetido a análise em espectrofotômetro marca Hitachi modelo U-2000 do Laboratório de Produtos Naturais e Química da Madeira do Instituto de Química da UFU.

As saponinas possuem comportamento anfílico e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membrana o que determina um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando sua destruição; ação hipocolesterolêmica e atividade antiviral e antiinflamatória. Estas duas últimas por ação específica sobre proteínas, como por exemplo a glicirizina, isolada do extrato de *Glycyrrhiza glabra*, uma saponina conhecida por ação antiinflamatória por inibir a enzima 11 β -hidróxi-esterol-desidrogenase (Simões, et al., 2003).

Essas substâncias podem ser extraídas a quente ou a frio, sendo que as saponinas e os carboidratos a elas ligados são mais facilmente separados por hidrólise com enzimas de origem microbiana ou por ação de ácidos fortes como o ácido clorídrico ou sulfúrico (Domingues, X. A., 1973) mas hidrotérólise pode ocorrer em temperaturas muito elevadas (Simões, et al., 2003).

A tabela 3 mostra o resultado do fracionamento de EA em resina Sephadex LH-20. A qual foi justamente utilizada por sua grande habilidade em separar produtos naturais como esteróides,

terpenos, lípidos e peptídeos de baixo peso molecular, por meio de suas propriedades de separação por peso, partição e adsorção (Pharmacia Biotech). Mas segundo Waterman (1987) apud Chang (2000) uma das desvantagens dessa resina é o fato de alguns taninos poderem ficar adsorvidos definitivamente na coluna.

Tabela-3: Resultados do fracionamento de EA em resina Sephadex LH-20.

Frações	Solvente	Volume
F1	MeOH 100%	125 ml
F2	MeOH 50%	125 ml
F3	H ₂ O	125 ml
Desionizada		

As figuras 8 e 9 mostram o efeito inibidor que F1 apresentou diante da atividade fibrinogenolítica da PB de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*, respectivamente. Esses resultados evidenciam o grande poder protetor que F1 possui contra a degradação do fibrinogênio causada pelo veneno bruto das duas espécies de jararacas. Note nas linhas 2 a hidrólise das cadeias causada pelo fibrinogênio causadas pela PB e nas linhas 3, 4, 5 e 6 a crescente proteção de todas as Aα e Bβ do fibrinogênio causadas pela PB. Também fica claro que F1 não interage com cadeias à medida que se aumenta a concentração de F1. Também fica claro que F1 não interage com

Fig. 8: Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* pelo fração F1 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*.
1. (75 µg) Fibrinogênio (FIB) (Padrão.
2. FIB + (5µg) PB.
3. FIB + PB/F1 1:5.
4. FIB + PB/F1 1:50.
5. FIB + PB/F1 1:150.
6. FIB + PB/F1 1:250.
7. FIB + 1,25 mg de F1 (controle negativo).
(PB/F1 m/m).

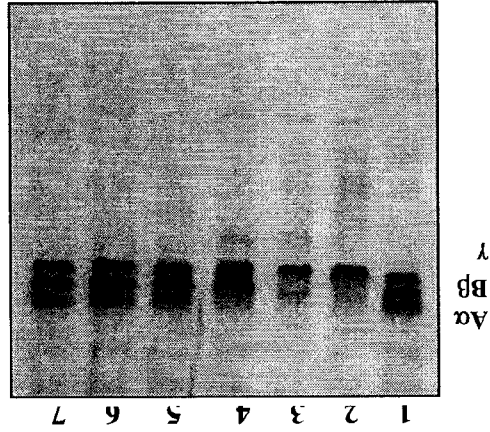
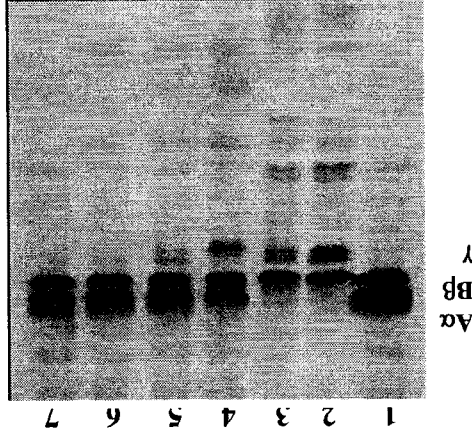


Fig. 9: Inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* pelo fração F1 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*.
1. (75 µg) Padrão de Fibrinogênio (FIB).
2. FIB + (5µg) PB.
3. FIB + PB/F1 1:5.
4. FIB + PB/F1 1:50.
5. FIB + PB/F1 1:150.
6. FIB + PB/F1 1:250.
7. FIB + 1,25 mg de F1 (controle negativo).
(PB/F1 m/m).



o fibrinogênio como evidenciado pelo controle negativo que contém a maior proporção de F1 (linha 7).

Assim essa fração demonstrou inibir proteases de venenos botrópicos, os quais são constituídos em sua maioria por uma mistura de substâncias tóxicas sobretudo de natureza protéica (90 a 95% do seu peso seco), com grande variedade de enzimas proteolíticas que causam disfunções no sistema de coagulação sanguínea, hemorragias, edemas e necrose local (MOURA-DA-SILVA et al., 1991; MARKLAND, 1998; SMOLKA et al., 1998).

Provavelmente a fração F1 possui compostos mais termoe estáveis solúveis em metanol como saponinas considerando que esta fração foi secada em rotoevaporador, o que pode estar diminuindo a concentração de compostos fenólicos pela oxidação via temperatura. Sabemos que os métodos de secagem que empregam calor, como a secagem ao sol ou em estufa com temperaturas acima de 70°C, diminuem muito a concentração de taninos e de outras substâncias fenólicas. Mesmo a secagem ao ar, à sombra e à temperatura ambiente, pode alterar os teores de taninos, mas em menor proporção (Simões et al., 2003). Estes provavelmente não seriam os responsáveis pelo efeito protetor observado, mesmo por que não foi detectada nenhuma precipitação do fibrinogênio (linhas 7).

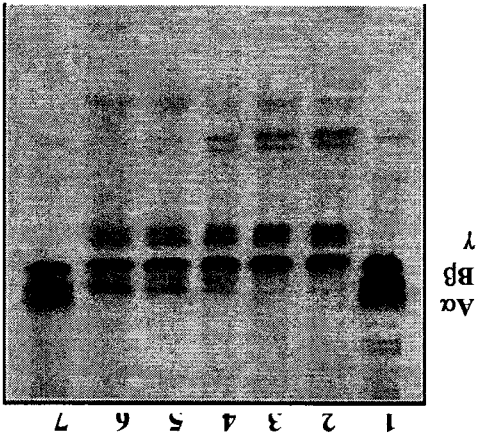
As figuras 10 e 11 por sua vez mostram o perfil eletroforético da fração F2 na proteção da atividade fibrinogenolítica das peçonhas. F2 até a proporção de 1:250 (m/m; veneno/fração) protegeu somente a cadeia BF (linhas 3 a 6) e também não precipitou o fibrinogênio (linha 7). Assim esta fração apresentou efeitos parecidos com a fração anterior, diferindo apenas numa menor proteção da cadeia BF e não proteção da cadeia Aα.

As figuras 12 e 13 mostram o efeito da fração F3 na atividade fibrinogenolítica induzida pelos venenos de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*, respectivamente. Note nas linhas 3 a 9 que não há praticamente proteção efetiva das cadeias do fibrinogênio e o surgimento novamente, como no EA, do efeito de interação com esse substrato. Percebemos também diminuição das intensidades das cadeias do fibrinogênio e das bandas de degradação advindas da ação proteolítica da PB. Esse fato corrobora com nossas inferências de que essa fração possa ser composta por taninos que suportaram a ação do calor do processo de sua obtenção sendo que alguns podem estar atuando de forma seletiva ligando especificamente a certos domínios do substrato (Zhu et al., 1997 apud Simões et al., 2003). Segundo o nosso perfil cromatográfico os taninos foram eluídos em ordem crescente de polaridade e tamanho: monômeros→dímeros→trímeros→oligômeros→polímeros, nos quais estes últimos, por serem em sua maioria taninos condensados, são mais termocestáveis em relação aos primeiros, os taninos hidrolisáveis.

Fig.10: Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* pela fração F2 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*.
1. (75 µg) Padrão de Fibrinogênio (FIB).
2. FIB + 5µg PB.
3. FIB + PB/F2 1:5.
4. FIB + PB/F2 1:50.
5. FIB + PB/F2 1:150.
6. FIB + PB/F2 1:250.
7. FIB + 1,25 mg de F2 (controle negativo). (PB/F2 m/m).



Fig.11: Inibição parcial da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* pela fração F2 do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba*.
1. (75 µg) Fibrinogênio (FIB) Padrão.
2. FIB + (5µg) PB.
3. FIB + PB/F2 1:5.
4. FIB + PB/F2 1:50.
5. FIB + PB/F2 1:150.
6. FIB + PB/F2 1:250.
7. FIB + 1,25 mg de F2 (controle negativo). (PB/F2 m/m).



Os complexos formados entre taninos e proteínas podem ser reversíveis ou irreversíveis. Os reversíveis são estabelecidos via pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que os irreversíveis ocorrem em condições oxidativas via ligações covalentes. As pontes de hidrogênio são provavelmente formadas entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os grupamentos amidas das proteínas. As interações hidrofóbicas ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos protéicos (Sticher, 1999 apud Simões et al., 2003). Acredita-se que as interações hidrofóbicas atuam como forças de atração inicial na complexação em meio aquoso entre taninos e proteínas. Essa associação inicial é reforçada numa segunda etapa com a formação de uma rede polifuncional de pontes de hidrogênio, nas quais cada molécula de tanino pode fazer várias ligações com a proteína, atuando, assim, como um ligante polidentado (Luck et al., 1994 apud Simões et al., 2003).

Fig. 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino resultante da ação da pecoanha de *Bothrops alternatus* combinada com F3.

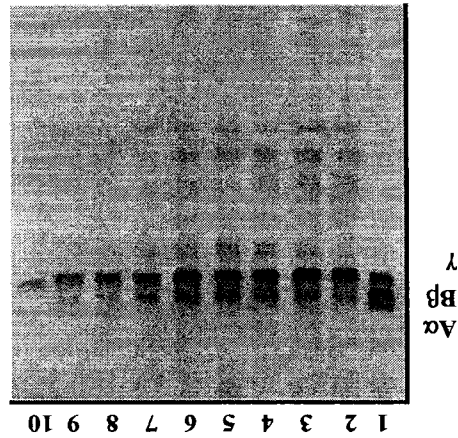
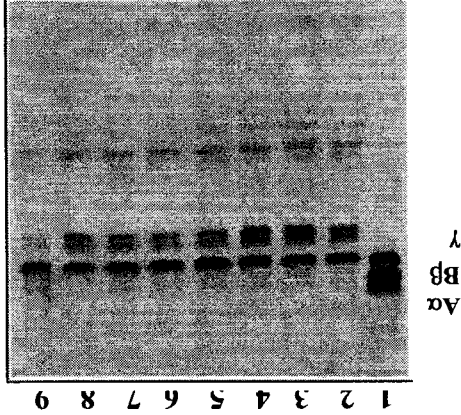


Fig. 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida, a 14% com agentes desnaturantes, dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino resultante da ação da pecoanha de *Bothrops moojeni* combinada com a fração F3 de *Schizolobium parahyba*.



Hagerman e colaboradores (1998) observaram uma correlação entre a polaridade de alguns taninos e o tipo de interação com proteínas. Moléculas menos polares interagem com proteínas predominantemente através de forças hidrofóbicas, enquanto que, as moléculas mais polares como polímeros de taninos condensados, interagem, principalmente, por pontes de hidrogênio.

A capacidade dos diversos taninos de se complexar com proteínas varia conforme a sua estrutura química. Foi observado que o peso molecular e a flexibilidade da molécula são fatores importantes no processo de complexação (McManus et al., 1985). Vários estudos comparando as afinidades relativas dos grupos galoila-ésteres (éster de 1,2,3 trihidroxyciclobenzeno) com várias proteínas demonstraram a tendência decrescente na sequência penta- > tetra- > tri- > di- > mono-galoil-glicose, ou seja, quanto maior o número de grupos galoila maior a afinidade pelas proteínas (Bacon & Rhodes, 2000). Por outro lado, fatores na estrutura das proteínas tais como conformação e tamanho do polímero também influenciam na afinidade dessas moléculas com os taninos (Hagerman & Butler, 1981 apud Simões, 2003). Vários estudos mostram a grande afinidade dos taninos, condensados e hidrolisáveis, por proteínas ricas em prolina, tais como as proteínas presentes na saliva de mamíferos (Baxter et al., 1997; Bacon & Rhodes, 2000 apud Simões et al., 2003)

As figuras 14 e 15 mostram o efeito do EA, F1, F2 e F3 de *Schizolobium parahyba* sobre a atividade coagulante das peçonhas brutas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops alternatus* respectivamente. O teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov revelou que todos os tratamentos da atividade coagulante não seguem uma curva normal. Assim utilizamos o teste estatístico de KRUSKAL-WALLIS e subsequentemente o teste Tukey-type.

Nota-se que para os ensaios com EA com ambas as peçonhas, houve um aumento muito significativo no tempo de coagulação do plasma bovino atingindo o tempo limite de 120s numa proporção baixa de 1:5 (PB/EA m/m) (tratamentos 3) em relação ao controle positivo (tratamentos 1). E de acordo com os testes estatísticos de KRUSKAL-WALLIS existem diferenças significativas no tempo de coagulação entre os tratamentos de EA em relação ao tratamento controle (H=12,727, P=0,002 para atividade coagulante com PB de *Bothrops moojeni* e H = 12,590, P = 0,002 para *Bothrops alternatus*). Mas, com a subsequente aplicação do teste estatístico de comparações múltiplas, foi observado que essa diferença é significativa apenas para os tratamentos 3 (q testado > q tabelado) em relação aos outros tratamentos 1 e 2 (q testado < q tabelado).

As frações F1, F2 e F3 foram testadas estatisticamente em relação ao tratamento 3 exatamente para ver se não apresentavam diferença no tempo de coagulação em relação a esse ensaio. O resultado foi que todas diferiram do tratamento 3 mostrando que realmente não

apresentaram o mesmo desempenho que esse tratamento na inibição da atividade coagulante. KRUSKAL-WALLIS: F1, F2 e F3 na atividade coagulante com *B. moojeni*: H = 11,723, P = 0,008; H = 11,550, P = 0,009; H = 17,358 e P = 0,001 respectivamente. E KRUSKAL-WALLIS: F1, F2 e F3 na atividade coagulante com *B. alternatus*: H = 10,823, P = 0,013; H = 11,325, P = 0,010; H = 17,649 e P = 0,001 respectivamente.

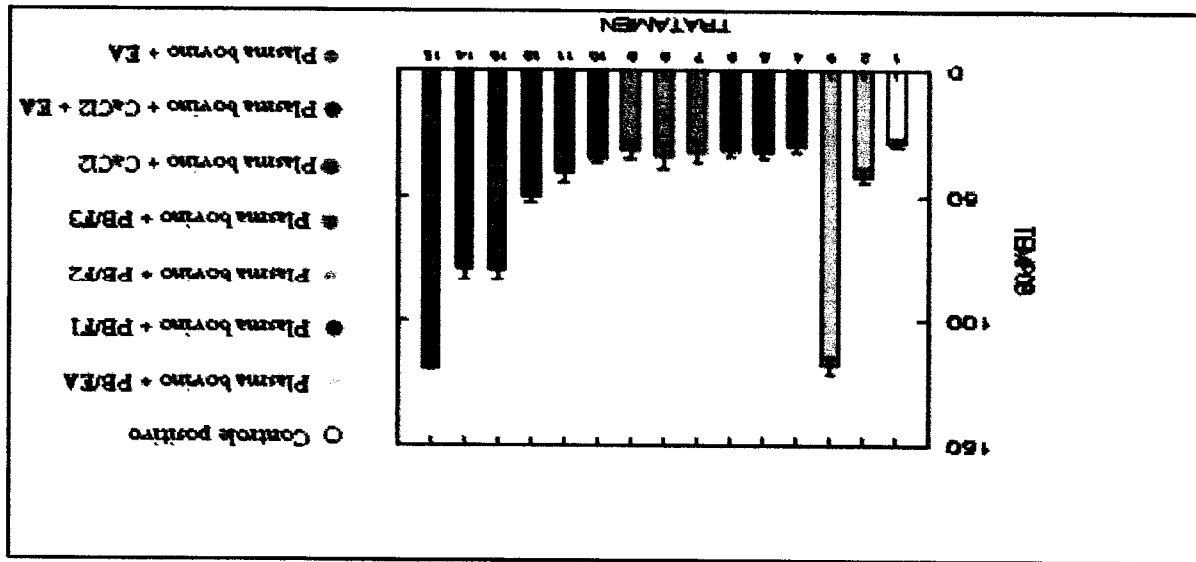


Fig. 14: Inibição da atividade coagulante sobre o plasma bovino da peconha bruta de *Bothrops alternatus* na presença de EA, F1, F2 e F3 de *Schizolobium parahyba*. Os resultados apresentados representam uma média de 5 tratamentos. Plasma bovino = Pla

1. Controle positivo (apenas PB + Pla).
2. Pla. + PB/EA 1:1.
3. Pla. + PB/EA 1:5.
4. Pla. + PB/F1 1:1.
5. Pla. + PB/F1 1:5.
6. Pla. + PB/F1 1:50.
7. Pla. + PB/F2 1:1.
8. Pla. + PB/F2 1:5.

Proporção PB/EA; F1; F2; F3 m/m

As frações também foram testadas estatisticamente em relação ao tratamento 1 para saber se obtiveram significância no aumento do tempo de coagulação. As frações F1 e F2 não obtiveram essa significância. KRUSKAL-WALLIS: F1, F2 na atividade coagulante com *B. moojeni*: H = 5,429, P = 0,143; H = 4,979, P = 0,173; respectivamente. E KRUSKAL-WALLIS: F1, F2 e na atividade

coagulante com *B. alternatus*: $H = 1.108$, $P = 0.775$; $H = 2.128$, $P = 0.546$ respectivamente. Mas a fração F3 apresentou significância no aumento do tempo de coagulação, sendo que o teste de Tukey-Type indicou essa significância para o tratamento 12 em relação ao controle positivo. KRUSKAL-WALLIS: F3 na atividade coagulante com *B. mojejnti*: $H = 17.227$, $P = 0.001$ e F3 atividade coagulante com *B. alternatus*: $H = 16.382$, $P = 0.001$.

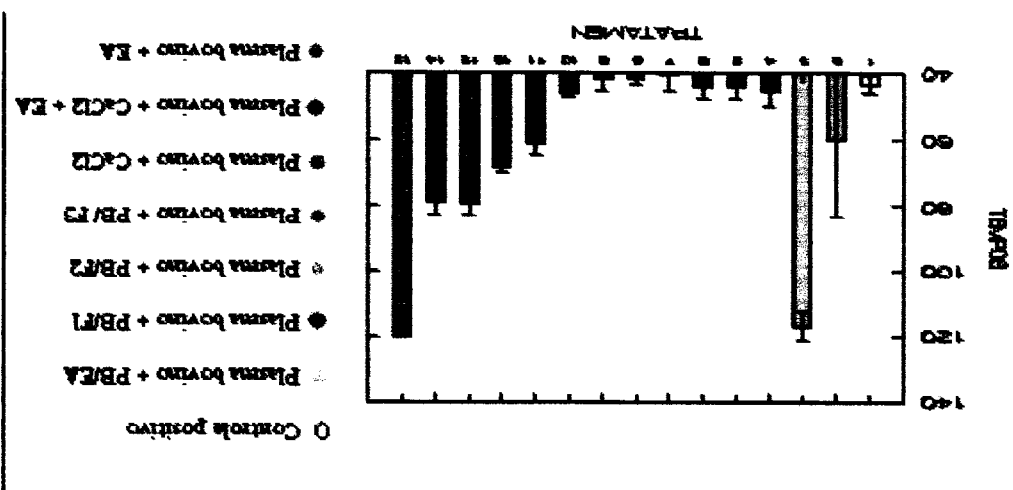


Fig. 15: Inibição da atividade coagulante sobre o plasma bovino da peconha bruta de *Bothrops moojejnti* na presença de EA, F1, F2 e F3 de *Schizolobium paranyba*. Os resultados apresentados representam uma média de

5 tratamentos. Plasma bovino = Pla
 1. Controle positivo (apenas PB + Pla)
 2. Pla + PB/EA 1:1
 3. Pla + PB/EA 1:5
 4. Pla + PB/F1 1:1
 5. Pla + PB/F1 1:5
 6. Pla + PB/F1 1:50
 7. Pla + PB/F2 1:1
 8. Pla + PB/F2 1:5
 9. Pla + PB/F2 1:50
 10. Pla + PB/F3 1:1
 11. Pla + PB/F3 1:5
 12. Pla + PB/F3 1:50
 13. Pla + 45µl CaCl₂ (0,5 M)
 14. Pla + 45µl CaCl₂ (0,5 M) + 0,5 mg EA;
 15. Pla + 0,5 mg EA
 Proporção PB/EA; F1; F2; F3 m/m

Em relação ao controle negativo (tratamento 15) não foi observada coagulação e nem efeito de precipitação do plasma bovino para EA. O tratamento 13 é um controle com cloreto de cálcio, e tratamento 14 um controle de cloreto de cálcio + EA para demonstrar que este extrato não possui efeito quelante de cálcio, apesar de alguns taninos poderem em maior ou em menor grau também complexar-se com íons metálicos como a maioria dos alcalóides (Haslam, 1998 apud Simões et al., 2003).

Assim, a proporção de 1:50 de EA e a proporção 1:50 de F3 mostraram-se significantes no aumento do tempo de coagulação do plasma bovino. Apesar de EA e F3 apresentarem atividade de precipitação do fibrinogênio, o que poderia estar elevando o tempo de coagulação do plasma, como observado anteriormente, esse efeito de precipitação não foi observado para a atividade coagulante. Isso provavelmente é devido ao fato de a atividade coagulante apresentar concentrações protéicas muito elevadas. É certo que a adição de pequenas quantidades de proteína a uma solução de tanino produz um precipitado mas que é dissolvido com a adição de mais proteína (Simões et al., 2003). O máximo de precipitação ocorre então quando existe uma proporção ótima entre tanino e proteína (Luck et al., 1994 apud Simões et al., 2003), que é, no entanto, dependente da quantidade de sítios ligantes como grupos galactose e hidroxilas fenólicas, presentes nos taninos (Kawamoto et al., 1996). A ação de inibição estaria sendo beneficiada pela grande quantidade de proteína do teste que torna solúvel os taninos e propicia a ação específica desses. Dessa forma o efeito inibitório de EA e F3 pode ter ocorrido por complexação seletiva entre os taninos presentes e as enzimas da PB, pois apesar das características em comum, os taninos podem atuar de forma seletiva como foi comprovado em estudos realizados com 20 compostos puros e 16 receptores, onde alguns se ligaram especificamente a certos receptores (Zhu et al., 1997).

Este resultado é bastante relevante pois mostra um grande poder inibitório de EA e abre uma perspectiva para a obtenção de uma fração inibidora de proteases coagulantes de peçonhas botrópicas. O fato da proporção de 1:50 de EA ter sido eficaz na inibição da atividade coagulante também é muito importante pelo fato de ser muito baixa. Em outros estudos, como o de FREITAS, (2002) a inibição significativa da atividade coagulante da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* na presença do extrato aquoso de *Casuaria grandiflora* foi observada somente a partir da proporção de 1:10. Também, IZIDORO, (2001) obteve resultado significativo na inibição da atividade coagulante de PB de *Bothrops neuwiedi pauloensis* usando o extrato aquoso de *Casuaria maritima* na mesma proporção de 1:10. Os pesquisadores que procuram inibidores para as mais variadas toxinas estão testando várias proporções até achar aquela que possa surtir efeito, como no caso de ESMERALDINO, (1998) que para inibir parcialmente a atividade hemorrágica causada pela PB de *Bothrops jararaca* pelo extrato aquoso de *Tabernaemontana cathartensis* chegou à proporção de 1:1.428 (m/m).

Percebemos então que o princípio ativo que inibe a atividade coagulante nos testes com EA e F3 deve fazer parte de um grupo de compostos fenólicos estáveis, de razoável oxidação e de polaridade elevada, próxima a da água. Falamos de compostos fenólicos pois sabemos que extratos

polares solubilizam muitos grupos desses compostos, como fenóis simples, xantonas flavonóides e taninos (Simões et al., 2003). Talvez a alta temperatura no processo de obtenção das frações (50°C por 90 min. no rotoevaporador) possa ter oxidado muitos constituintes diminuindo sua quantidade e consequentemente sua ação biológica, já que F3 para inibir a atividade coagulante significativamente, precisou de uma proporção de 1:50. Assim para estes constituintes do FA a metodologia para sua obtenção não foi muito eficiente.

4-CONCLUSÃO

Os resultados dos ensaios de inibição das atividades fibrinogenolítica e coagulante induzidas pela peçonha bruta com o extrato aquoso (EA) de *Schizolobium parahyba* revelaram-se semelhantes para ambas as peçonhas.

EA inibiu significativamente a coagulação do plasma descalcificada pela peçonha bruta tanto de *Bothrops alternatus* como de *Bothrops moojeni* na proporção de 1:5 (PB/EA m/m), fato esse bastante relevante pois essa proporção é relativamente baixa.

Numa massa de 50µg, EA, inibiu totalmente a hidrólise da cadeia Bβ e parcialmente a da cadeia Aα do fibrinogênio induzida por 5µg da peçonha de ambas as serpentes, e acima desta concentração, apresentou efeito de precipitação do fibrinogênio.

De acordo com os testes de análises químicas o EA parece ser grandemente constituído por saponinas e apesar de a análise espectroscópica de RMN ter indicado sinais pouco significativos de anéis aromáticos, os ensaios enzimáticos da atividade fibrinogenolítica revelaram efeito de precipitação do substrato (ensaios com EA e fração F3), o que nos leva a pensar que EA também seja constituído por taninos.

O EA foi totalmente solúvel apenas em água desionizada e parcialmente solúvel em metanol e etanol.

A cromatografia em resina Sephadex LH 20 do EA foi eficiente, pois obtivemos uma fração potente em inibir a atividade fibrinogenolítica que não apresentou ação de precipitação do fibrinogênio e uma outra fração que demonstrou inibição da atividade coagulante e efeito de precipitação do fibrinogênio.

Os resultados dos ensaios de inibição com as frações de *Schizolobium parahyba* revelaram-

se, também, semelhantes para ambas as peçonhas.

A fração F1 apresentou inibição total da ação fibrinogenolítica dos venenos numa proporção de 1:250, sem precipita-las. Essa fração é termooestável e parece ser constituída por saponinas. Pode ser inferido, então, que F1 ficou livre dos agentes reativos que diminuíam a intensidade das bandas do fibrinogênio, ao mesmo tempo que conservou aquele grupo de substâncias capaz de proteger efetivamente a degradação desse substrato pelas enzimas proteolíticas das peçonhas.

F2 mostrou efeitos parecidos com de F1 diferindo apenas na não inibição da cadeia Aα do fibrinogênio.

A fração F3, por sua vez, mostrou inibição significativa da atividade coagulante na proporção de 1:50. Mas ao ser comparado esse resultado com os do ensaio do EA, para esta atividade, F3 não reproduziu um bom resultado. Isso deve-se, talvez, pelo fato de F3 ser composta por um concentrado de taninos (substâncias termolábeis) que perderam muito da sua atividade com o tratamento desta fração ao ser concentrada no rotoevaporador.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M. I.; AUDDY, B.; GOMES, A. Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the indian medicinal plant sarsaparilla (*Hemidesmus indicus* R. Br.) *Toxicon*, Inglaterra, v.32, p.1551-1557, 1994.
- ALLINGER, N. L. et al. *Química Orgânica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1976.
- BACON, J. R.; RHODES, M J.C. Binding affinity of hydrolysable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, v.48, p. 838-843, 2000.
- BARRAVEIRA, B. (1994). Venenos Animais: Uma visão integrada 1ª ed. RJ. Ed. De Publicações Científicas.
- BORGES, M. H. Inibição dos principais efeitos tóxicos causados por venenos animais pelo extrato vegetal de *Casuaria sylvestris* (Flacourtiaceae), 1998. 71f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1998.
- CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L. and ZINGALI R. B. Bothroaltermín, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* v. 36, p. 1903-1912, 1998.

- CIRELLI, A. F.; DELUCA, M. E. **Aprendiendo química orgánica: estructura y reactividad.** Buenos Aires: Eudeba, 1995.
- CHANG, R. **Análise dos compostos fenólicos da madeira do *E. grandis* e do *E. urophilla* do triângulo mineiro.** 2000. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.
- DAOUD, E.; TU, A. T. and EL-ASMAR, M. F. Isolation and characterization of an anticoagulant proteinase cerastase F-4, from *Cerastes cerastes* (Egyptian Sand Viper) venom. **Tromb. Res.** V.42, p. 52-58, 1986.
- DA SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, Inglaterra, v. 41, p.251-255, 2003.
- DEMUNER, A. J.; MALTHA, C. R. A.; BARBOSA, L. C. A.; PERES, V. **Experimentos de Química Orgânica.** Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2000. 69p.
- DE-SOUZA-ELIZABETH; TELES-ROZINI, C. L.; DE-A-SIQUEIRA-EGLE-M; DE-FREITAS-SONIA-M. Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Shizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **J. of Protein chemistry**, Inglaterra, v.19, n. 6, p. 507-513, 2000.
- DOMÍNGUEZ, X. A. **Métodos de investigación fitoquímica.** 1. ed. Monterrey/Nuevo León (México): Editora Limusa S. A., 1973. 281 p.
- DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 404-421, 2001.
- EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancoed on human fibrinogen and it's polypeptide chains. **Tromb. Res.**, v. 2, p. 85-89, 1973.

- ESMERALDINO, L.M. Avaliação da ação do extrato aquoso de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae) sobre a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*. 1998.88 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 1998.
- FERREIRA, L. A. F. HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITRAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMehl, G. G. and DE MORAES, V. L. G. Antivenom and biological effects of Arturmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon* v.30, p. 1211-1218, 1992.
- FRANÇA, F. O. S. Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan, SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* V. 31, p.187-190, 1998.
- FREITAS, F. G. Neutralização dos principais efeitos tóxicos de peçonhas botrópicas (*B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) pelo extrato aquoso de *Casearia grandiflora* (Facourtiaceae). 2002. 112 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2002.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G. and DERDAS, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the Bushmaster. *Toxicon*. Inglaterra, v. 25, p. 713-720, 1987.
- HAGERMAN, A. E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *Journal of Chemistry and Ecology*, v.14, p.453-461, 1998.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A microburet method for stimulating proteins. *Analytical Biochemistry*, v. 9, p. 401-410, 1964.
- IWANAGA, S. and SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 52, p. 61-158, 1979.

- IZIDORO, L. F. M. Estudos de neutralização dos principais efeitos tóxicos da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* pelo extrato aquoso de *Casearia maritimensis* (Flacourtiaceae). 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2001.
- KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. Stoichiometric studies of tannin-protein co precipitation. *Phytochemistry*, v. 41, p. 1427-1431, 1996.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEWIS, G. P. *Legumes of Bahia*. 1. ed. Inglaterra: Royal botanic Gardens, 1987. 369 p.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAHIR, M. S.; HYNND, J. W.; FLUTE, P. T.; DORMAND, J. A. Effects of defibrinigenation on the early potency rate experimental small calibre arterial grafts. *Br. J. Surg.* v. 749, p. 508-510, 1987.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system: review paper. *Toxicon*, Inglaterra, v. 36, p. 1749-1800, Jan. 1998.
- MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, Inglaterra, v. 30, p. 1131-1142, 1992.
- MCMANUS, J. P.; DAVIS, K. G.; BEART, J. E.; GAFFNEY, S. H.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol interactions. Part I. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans II*, p. 1429-1438, 1995.

MENDES, M. M.; VALE, L. H. F.; GEBRIM, L. C. P.; IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralização das atividades hemorrágica e fosfolipásica da peçonha de *Bothrops moojeni* pelo extrato de *Shizolobium parahyba* (Cesalpinoideae). In: CONGRESSO DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 17., 2002, Salvador. **Anais eletrônicos...** Salvador: FESBE, 2002. Disponível em: <http://www.fesbe.org.br>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-SECRETARIA NACIONAL DE AÇÕES BÁSICAS DE DA SAÚDE- Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, 1986.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G. and THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated venoms of different species of *Bothrops* snake. **Toxicon**. Inglaterra, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.

NASCIMENTO, C. J. do.; BLOCH Jr, C. Ressonância magnética: gradus primus. **Biotechnologia ciência e desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n 21, p. 52-61, jul./ago. 2001.

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

OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R. and ODELL, G. V. In vivo ability of antimitoxin a serum plus polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon**. Inglaterra, v. 24, p. 197-200, 1986.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon** v. 38, p.1087-1100, 2000.

PHARMACIA BIOTHEC. **Sephadex LH-20**, Manual do Usuário.

PHARMACIA BIOTHEC. Sephadex LH-20: Chromatography in organics solvents, Manual do Usuário.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Inglaterra, v. 39, p.603-613, 2001.

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

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SA, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of newwidae, a non hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *B. newwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* v.381, p. 213-224, 2000.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in south America. In: *Venoms Animals and their venoms* v. 2, p. 345-403, 1971.

SCHERY, R. W. Leguminosae-Caesalpinoidea. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, Missouri, v. 38, n. 1, p. 1-94, 1951.

SIIGUR, J.; TÖNISMAGI, K.; TU, A. T. SIIGUR, E. Cross reactivities of polyclonal antibodies against lebetese, fibrinolytic enzyme of levanine viper (*Vipera labetina*) venom. *Toxicon* v. 34, p. 608-613, 1996.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. 1102 p.

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

- SOUZA, G. H. B.; CARVALHO, J. C. T.; UJIKAWA, K. and NETO, J. J. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas utilizadas na medicina popular brasileira. III Jornada Paulista de Plantas Medicinais: p. 92-93, 1997.
- STANDLEY, P. C. & STEYERMARK, J. A. Leguminosae. *Fieldiana Bot.*, Filadelfia, v. 24, n. 5, p. 1-425, 1946.
- SOTCKER, K. and MEIER, J. Thrombin-like snake venom enzyme. In *Hemostasis and Animal Venoms 7* (Pirkle, H.; Markland, F. S.; Jr Edds). New York: Marcel Dekker, 1988.
- TELES-ROZENI, C. L.; GREITAS, S. M.; KAWANO, Y.; DE-SOUSA-ELIZABETH, M. T.; AREAS-ELIZABETH, P. G. Vibrational spectroscopic analysis of a chymotrypsin inhibitor isolated from *Schizolobium parhyba*. *Science direct*, v. 55, n. 6, p. 1279-1289, 1999.
- VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; IZIDORO, L. F. M.; GERIM, L. C. P.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Efeitos dos extratos de *Schizolobium parhyba* e *Xanthoxylum subessertatum* sobre peçonha bruta e fosfolipase (PLA2) ácida de *Bothrops moojeni*. In: CONGRESSO DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 17., 2002, Salvador. *Anais eletrônicos...*. Salvador: FESBE, 2002. Disponível em: <http://www.fesbe.org.br>.
- VALE, L. H. F.; HAMAGUCHI, A.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; VELOSO, D. P.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Análise química e efeito do extrato aquoso de *Schizolobium parhyba* na inibição da atividade fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 43., 2003, Ouro Preto. *Resumos...* Ouro Preto: ABQ, 2003, p. 628-628.
- ZAR, J. H.. *Bioestatistical analysis*, 4 ed. Prentice Hall p. 208 a 228. 1999.
- YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIZOMI S.; MATSUMURA, N.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; HORI, K.; YMAHARA, J.; Medicinal foostuffs VII on the saponin constituents with glucose and alcohol absorption-inhibitory activity from a food granish

“Tonburi” the fruit of Japanese *Kochia scoparia* (L.). **Chem. Pharm. Bull.** V. 45, p. 1300-1305, 1997.