

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA

RAFAEL CISNE DE PAULA

EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DA
SERPENTE *Lachesis muta*

ORIENTADOR: Prof. Dr. André Lopes Fuly



NITERÓI
2009

RAFAEL CISNE DE PAULA

EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DA
SERPENTE *Lachesis muta*

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Venenos e Toxinas de Animais e
Avaliação de Inibidores (LAVENOTOXI) do Departamento de Biologia Celular e
Molecular do Instituto de Biologia, sala 310, da Universidade Federal
Fluminense

Dissertação submetida à Universidade
Federal Fluminense visando à obtenção do
grau de Mestre em Neuroimunologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. André Lopes Fuly

**NITERÓI
2009**

RAFAEL CISNE DE PAULA

EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DA
SERPENTE *Lachesis muta*

Dissertação submetida à Universidade
Federal Fluminense visando à obtenção do
grau de Mestre em Neuroimunologia

Banca Examinadora

Dra. Elizabeth Giestal de Araújo - UFF

Dr. Luis Roberto Leão-Ferreira - UFF

Dr. Paulo de Assis Melo - UFRJ

Dra. Helena Carla Castro Cardoso de Almeida - UFF (Revisor e suplente)

NITERÓI
2009

de Paula, Rafael Cisne

Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente

Lachesis muta / Rafael Cisne de Paula. – Niterói [s. n.], 2009.

77 folhas

Dissertação (Mestre em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2009.

Orientador: André Lopes Fuly

1. *Lachesis muta*. 2. Veneno de serpente. 3. Extratos vegetais. 4. Neutralização. 5. Antiofídico. 6. Soroterapia.

“Pro scientiae in Deo cor meus”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida, mesmo quando não consigo senti-lo e, aos inúmeros companheiros espirituais que me conduzem e fortalecem minhas intuições a cada momento.

Agradeço aos meus pais, Luzia e Sandro, por todos os esforços e pela enorme luta para me ofertar tudo de melhor em termos de educação e conforto. Este trabalho representa um fruto do trabalho deles.

Aos meus irmãos Márcio e Roberto, pela grande vivência que me ajuda a crescer todos os dias, por me apoiarem nesse caminho que foge aos olhos materiais da nossa sociedade.

Aos meus inúmeros amigos pelo enorme apoio ao ver meu o esforço em procurar a ciência como meio de vida, mesmo sem saber, muitas vezes, corretamente os seus fins.

Ao meu orientador André, por ter acreditado em meu potencial, desde que me conheceu na graduação, me ensinando sempre com muita paciência todos os passos e etapas que deveria seguir. Sua dedicação e amor a ciência foram e serão sempre exemplos para a minha trajetória.

Aos meus colegas do laboratório, alunos de iniciação científica e de pós graduação, técnicos e equipe da limpeza que estiveram auxiliando e me acompanhando durante este período.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Neuroimunologia e aos professores deste programa pelo constante apoio.

Agradeço aos professores da banca examinadora e a revisora da tese por terem aceitado o convite.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	IX
Lista de figuras e tabelas	X
Resumo	XI
Abstract	XII
1. Introdução	1
1.1 Considerações	2
1.2 Epidemiologia	3
1.3 Características das serpentes e dos gêneros	8
1.3.1 <i>Gênero Bothrops</i>	9
1.3.2 <i>Gênero Crotalus</i>	10
1.3.3 <i>Gênero Micrurus</i>	10
1.3.4 <i>Gênero Lachesis</i>	11
1.4 Função e composição do veneno	13
1.4.1 Desintegrinas	17
1.4.2 Lectina C	17
1.4.3 L- amino oxidases	18
1.4.4 Serinoprotease	18
1.4.5 Metaloproteases	19
1.4.6 Fosfolipases A ₂	20
1.5 Agentes antiofídicos	21
1.5.1 Soroterapia	21
1.5.2 Potencial antiofídico de extratos vegetais	22
1.5.3 <i>Eclipta alba</i>	25
1.5.4 <i>Mandevilla velluntina</i>	25
1.5.5 <i>Sapindus sapindus</i>	25
1.5.6 <i>Mikania glomerata</i>	26
1.5.7 <i>Jatropha elliptica</i>	26
1.5.8 <i>Stryphnodendron barbatiman</i>	26
1.5.9 <i>Tibouchina stenocarpa</i>	27
1.5.10 Gênero Miconia	27
1.5.11 <i>Casearia sylvestris</i>	27

2. Objetivos	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. Material e métodos	30
3.1 Material	31
3.2 Obtenção do veneno de <i>Lachesis muta</i>	31
3.3 Animais	31
3.4 Extratos vegetais	31
3.5 Protocolo de neutralização	33
3.6 Atividades biológicas	33
3.6.1 Hemólise indireta	33
3.6.2 Hemorrágica	34
3.6.3 Coagulante	35
3.6.4 Proteolítica	36
3.7 Análise estatística	36
4. Resultados	37
4.1 Hemólise indireta	38
4.2 Atividade coagulante	41
4.3 Atividade hemorrágica	44
4.4 Atividade proteolítica	49
4.5 Tratamento térmico	52
4.6 Comparativo do efeito dos extratos vegetais	53
5. Discussão	56
6. Conclusões	62
7. Referências bibliográficas	65
8. Anexos	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.c.- antes cristo

ADP – Adenosina difosfato

Arg - Arginina

CE – Concentração Efetiva

COBEA – Colégio Brasileira de Experimentação Animal

DMC – Dose Mínima Coagulante

DMH – Dose Mínima Hemorrágica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

Gly - Glicina

GP - Glicoproteína

GPS - Global System Positionment

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

i.d. - intradérmico

IB – Instituto Butantan

IVB – Instituto Vital Brasil

Kda - Kilodalton

LAAO – L-aminoacido oxidase

Lys - Lisina

mm – milímetros

MS – Ministério da Saúde

NAL – Núcleo Animais de Laboratório

°C – graus Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

PLA₂ - Fosfolipase A₂

RPM – rotação por minuto

SD – desvio padrão

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TCA – ácido tricloroacético

Tris-HCl - Hidroximetil aminometano neutralizado com ácido clorídrico

v/v – volume/volume

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Acidentes com animais peçonhentos no Brasil.	3
Figura 2- Acidentes ofídicos por gênero de serpente no Brasil	4
Figura 3- Distribuição dos acidentes ofídicos por estados e regiões.	5
Figura 4: Distribuição dos casos confirmados de acidentes ofídicos.	6
Figura 5: Percentual de óbitos e de acidentes ofídicos.	7
Figura 6: Divisão filogenética das serpentes.	9
Figura 7: Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil.	12
Figura 8: Índice de letalidade nos acidentes ofídicos.	13
Figura 9: Componentes encontrados na peçonha das serpentes.	15
Figura 10. Atividade hemolítica do veneno bruto de <i>L. muta</i> .	38
Figura 11: Efeitos dos extratos vegetais na atividade hemolítica de <i>L. muta</i> .	40
Figura 12: Efeito coagulante do veneno bruto de <i>L. muta</i> .	41
Figura 13. Efeito dos extratos aquosos na atividade coagulante de <i>L. muta</i> .	43
Figura 14. Atividade hemorrágica do veneno de <i>L. muta</i> .	44
Figura 15. Imagem da pele dos camundongos na atividade hemorrágica	46
Figura 16- Efeito dos extratos vegetais na atividade hemorrágica de <i>L. muta</i> .	48
Figura 17. Atividade proteolítica do veneno de <i>L. muta</i> .	49
Figura 18. Efeito dos extratos aquosos na atividade proteolítica de <i>L. muta</i> .	51
Tabela 1: Relação dos extratos vegetais utilizados.	32
Tabela 2: Efeito do tratamento térmico do extrato aquoso na atividade hemorrágica de <i>L. muta</i> .	53
Tabela 3: Comparação dos efeitos dos extratos vegetais sobre o veneno de <i>L. muta</i> .	54

Resumo

Acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública em muitos países com uma incidência mundial de acidentes de 2,5 milhões por ano. Antivenenos convencionais usados nos acidentes ofídicos neutralizam eficientemente os efeitos tóxicos sistêmicos provocados pelo envenenamento, mas não neutralizam os danos teciduais locais. Vários autores têm apresentado diversos estudos sobre plantas com propriedades antiofídicas. *Lachesis muta* é a maior serpente encontrada nas florestas da América do Sul, e o seu veneno tem um alto índice de letalidade. No presente trabalho doze plantas encontradas na flora brasileira foram avaliadas como antiofídicas frente as atividades: hemolítica, coagulante, hemorrágica e proteolítica do veneno de *L. muta*. Os extratos vegetais de *Mikania glomerata*, *Jatropha ellyptica* e *Casearia sylvestris* mostraram uma inibição cerca de 30% sobre grande parte das atividades testadas. Contudo, os extratos de *Eclipta Alba*, *Miconia fallax*, *Miconia selowiana*, *Miconia albicans* e *Tibouchina stenoscarpa* mostraram inibição superior a 30% frente a três das quatro atividades testadas. Vale à pena enfatizar que o extrato de *Stryphnodendron barbatiman* neutralizou eficientemente todas as atividades avaliadas, diferente do extrato aquoso de *Sapindus sapindus* que não fora capaz de neutralizá-las. Desta forma, os extratos vegetais que apresentaram um perfil ativo poderiam ser utilizados como fonte alternativa no envenenamento causado pela serpente *L. muta*, pois tais extratos são fontes ricas de moléculas com propriedades antiofídicas.

Abstract

Snakebites are a health problem in many countries and the global incidence exceed 2.5 million per year. Antivenoms widely used in snake bite may neutralize efficiently the systemic toxic effects caused by poisoning, but do not neutralize the local tissue damage. Many authors have been showed several plants as an alternative over antiophidian therapy. *Lachesis muta* is the bigger snake found in South America forests, and its envenomation has a high rate of death. In the present work, aqueous extract prepared from twelve Brazilian plants have been analyzed as antiophidian properties against *L. muta* venom's biological activities, such as hemolytic, coagulant, hemorrhagic and proteolytic ones. The plant extracts *Mikania glomerata*, *Jatropha ellyptica* and *Casearia sylvestris* showed an inhibition up to 30% on those biological activities studied. However, *Eclipta alba*, *Miconia fallax*, *Miconia selowiana*, *Miconia albicans* and *Tibouchina stenoscarpa* showed a strong pattern over 30% against three of four activities tested, but with different potencies. It is worth emphasizing that the extract of *Stryphnodendron barbatiman* neutralized all the biological activities studied, on the other hand, the extract of *Sapindus sapindus* did not.

In this way, some plant extracts may be also used as an alternative treatment on envenomations caused by *L. muta* snake venom, since they are a promising source of natural molecules with antiophidian properties.

INTRODUÇÃO

1.1. Considerações

O homem sempre sofreu envenenamento causado por animais peçonhentos. Tais acidentes não constituem doença transmissível, porém têm sido abordados juntamente com as zoonoses, uma vez que se trata de agravo, no qual ocorre a agressão por um animal e quadro clínico resultante da ação de toxinas inoculadas pela picada (CHIPPAUX E COL, 1998). As serpentes, escorpiões e aranhas são os principais agentes causadores de envenenamentos. Mais recentemente, acidentes com lagartas do gênero *Lonomia* e envenenamentos causados por abelhas têm merecido atenção devido à gravidade e a alta letalidade. Mas, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos e Notificações (SINAN), o acidente ofídico é o principal deles, devido a sua freqüência e gravidade (Figura 1) (FUNASA, 2001).

As serpentes têm sido tema de fascínio, medo e mitos ao longo da história humana. Este fascínio decorre de características próprias e também da enorme diversidade de cores, de efeitos biológicos, tamanhos e comportamentos observados nesses animais. No antigo Egito as cobras eram adoradas; na antiga Roma sua réplica era utilizada para decorar a coroa dos imperadores romanos e no antigo mundo Grego, o Deus da medicina possuía uma serpente ligada ao seu corpo. Atualmente, as serpentes representam os símbolos dos cursos de graduação de medicina e farmácia (KOH E COL, 2006). Esses animais, até hoje estão ligados a diversas fábulas ou ficções e desde a antiguidade o homem enfrenta problemas na convivência com esses animais.

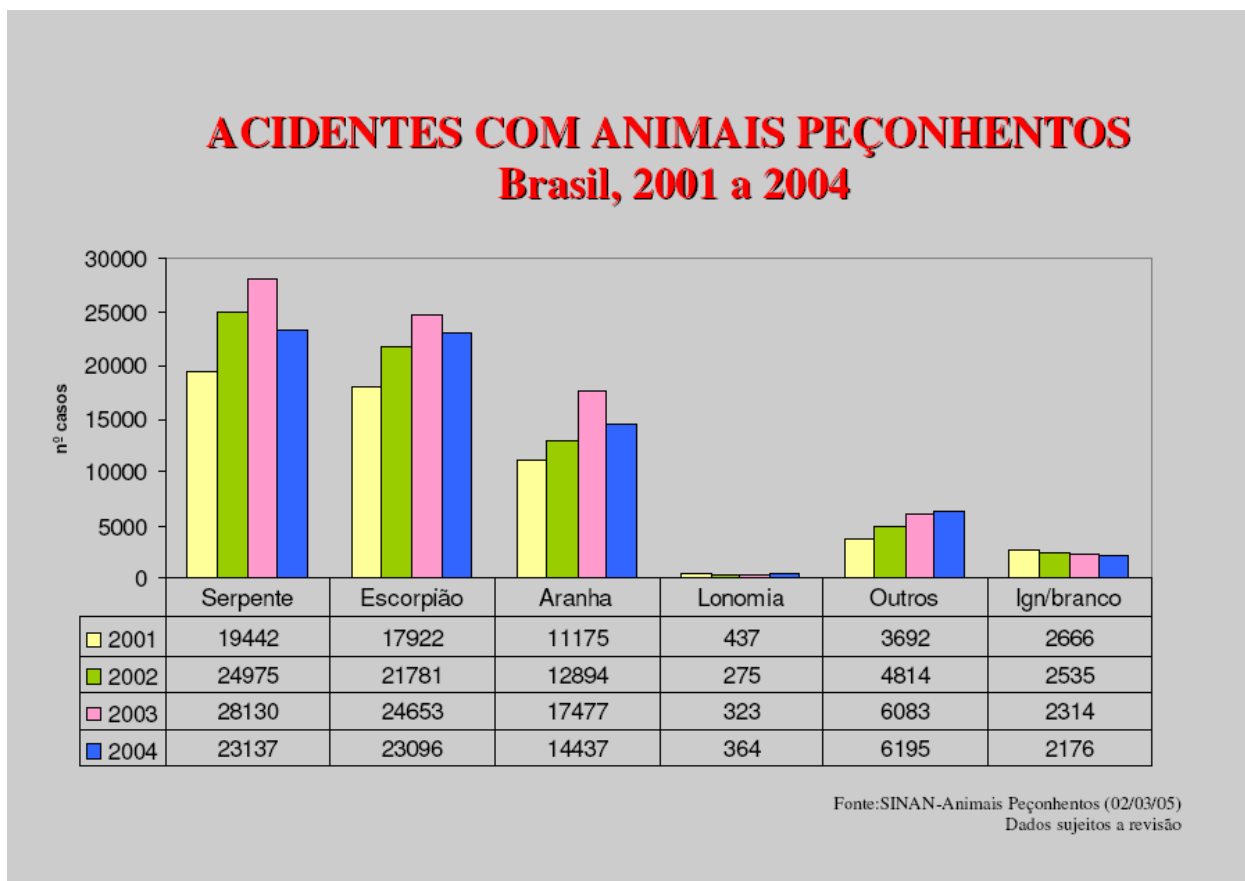


Figura 1: Acidentes com animais peçonhentos no Brasil.

1.2. Epidemiologia

Apesar da tecnologia disponível atualmente, vivemos ainda em um período de carência de informações sobre incidência de acidentes ofídicos e morbidades provenientes destes envenenamentos. Isto é demonstrado pelo número reduzido de estudos nacionais acerca do assunto e o fato do Ministério da Saúde (MS) publicar um trabalho em 1998, que foi atualizado somente em 2004 com dados referentes aos períodos de 1990 a 1993 e 2001 a 2004 (CHIPPAUX E COL, 1998) (Figura 2).

tipo de acidente	1990-3		2001-4	
	n	%	n	%
botrópico	59.619	73,1	65.697	68,7
crotálico	5.072	6,2	6.959	7,3
laquétrico	939	1,2	2.170	2,3
elapídico	281	0,3	486	0,5
não-peçonhento	2.361	2,9	2.160	2,3
ignorado	13.339	16,3	18.212	19,0
total	81.611	100,0	95.684	100,0

Figura 2 - Acidentes ofídicos por gênero de serpente no Brasil nos períodos entre 1990-1993 e 2001-2004. Fonte: Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA, 2001.

Resultados obtidos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) revelaram um perfil de distribuição dos acidentes ofídicos por unidades federadas (Figura 3). A distribuição dos acidentes ofídicos no país indica maior incidência nas regiões Centro-Oeste e Norte, apesar do número absoluto de casos ser maior na região Sudeste. Estes acidentes apresentam uma sazonalidade no qual que os acidentes ofídicos têm predomínio nos meses quentes e chuvosos. Nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, observam-se um incremento do número de acidentes no período de setembro a março. Entretanto, na região Nordeste este incremento ocorre no período de Janeiro a Maio, enquanto na região Norte, não se observa um período crítico, ocorrendo os acidentes uniformemente durante todos os períodos do ano (MS/FUNASA, 2001).

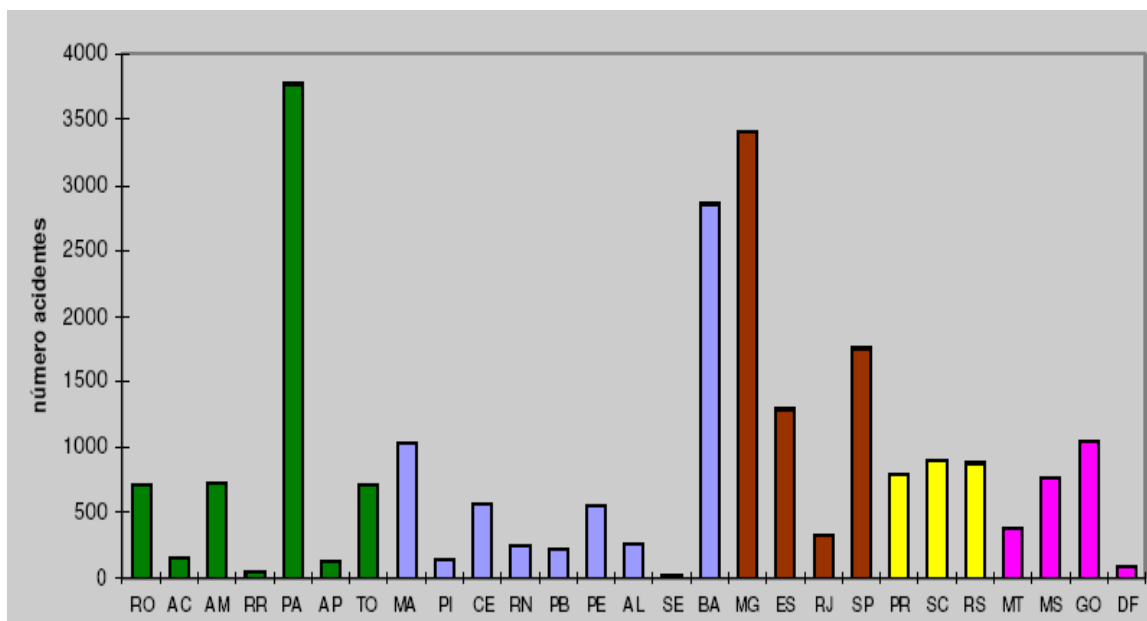


Figura 3 - Distribuição dos acidentes ofídicos por estados e regiões (verde: Norte; azul: Nordeste; Marrom: Sudeste; amarelo: Sul; rosa: Centro-oeste). Fonte: Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA, 2001.

De fato, a ocorrência de acidentes ofídicos está, em geral, relacionada com fatores climáticos e aumento de atividade humana nos trabalhos no campo. A maior parte das morbidades e mortalidades ocorre nas áreas tropicais (KOH E COL., 2006). A interferência humana sobre o meio ambiente muito provavelmente resulta no incremento dos acidentes ofídicos ao longo dos anos (Figura 4), apesar do crescente processo de urbanização. Isto sugere uma possível aproximação e adaptação das serpentes às periferias das cidades, pois as precárias condições de saneamento básico propiciam a proliferação de roedores, que servem de alimento para esses animais.

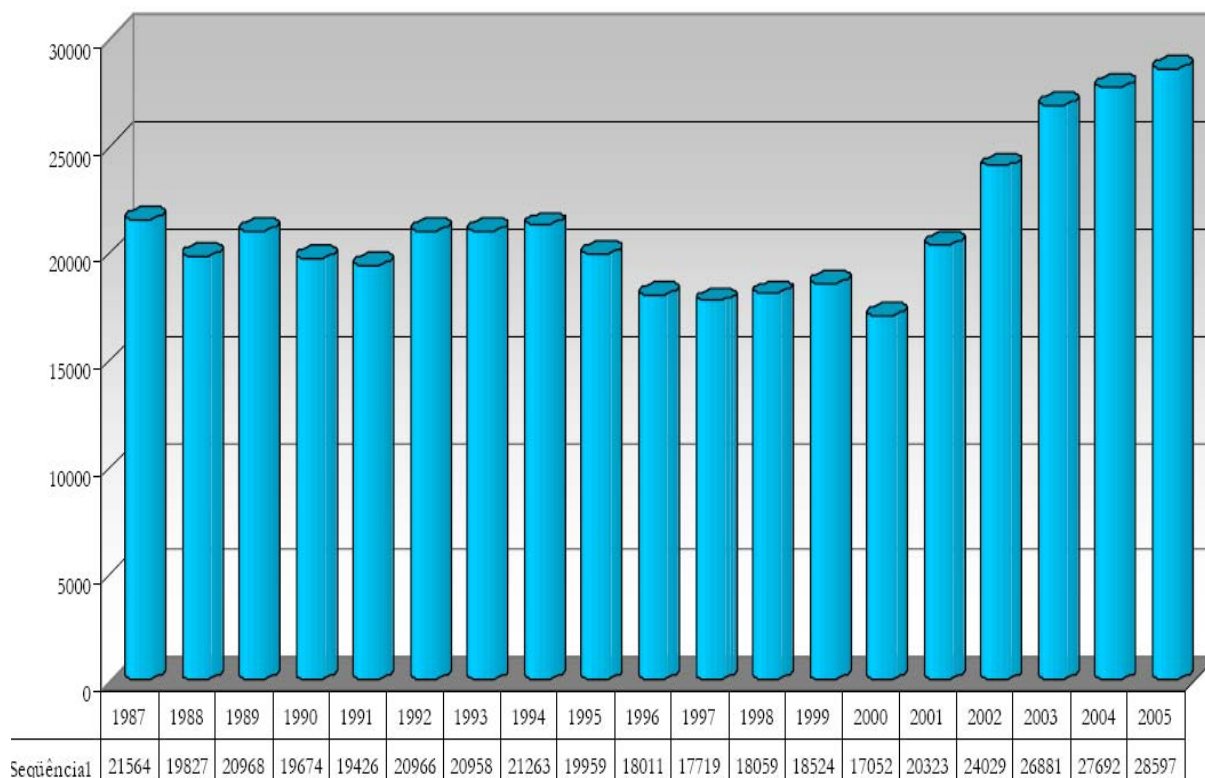


Figura 4: Distribuição dos casos confirmados de acidentes ofídicos.
 Fonte: Dados da FUNASA (2001/2006).

Anualmente, cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo são vítimas de picada de cobra, dos quais 100.000 perdem suas vidas (KOH E COL., 2004). No Brasil, um levantamento feito pela FUNASA/MS durante os anos de 2001 a 2006 revelou a ocorrência de 49.650 casos de acidentes ofídicos (média de 22.000 por ano e 13,5 acidentes para cada 100.000 habitantes), sendo 1.200 fatais, o que representa 0,25% (Figura 5).

Apesar do índice baixo de letalidade há um grande índice de sequelas deixadas por estes acidentes (PINHO E PEREIRA, 2001). Portanto, há que se considerar que o resultado do acidente ofídico não é somente o óbito.

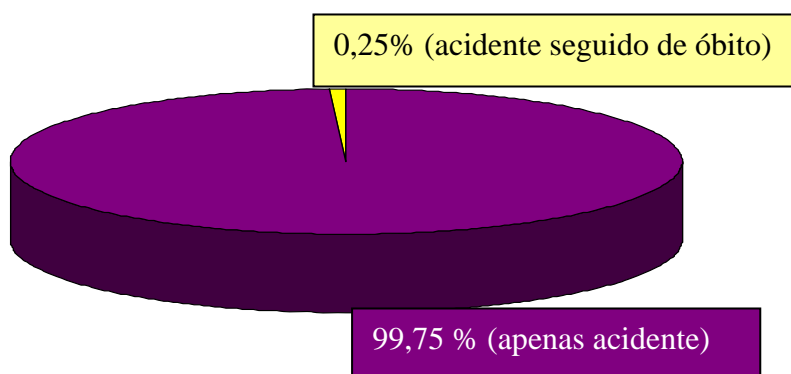


Figura 5: Percentual de óbitos e de acidentes ofídicos. Fonte: Dados da FUNASA (2001/2006).

A epidemiologia ofídica revela um perfil que se mantém ao longo dos últimos 100 anos no Brasil, onde estes ocorrem com maior frequência no período de setembro a março, pois coincide com o aumento de trabalho no campo (KOH E COL, 2006). Indivíduos do sexo masculino, com idade variando entre 15 e 49 anos, são preferencialmente acometidos. Os membros inferiores são atingidos em 70,8% dos casos, enquanto que os membros superiores em 13,4% dos acidentes (STRUCHINER, 2003). A utilização de equipamentos de proteção individual como sapatos, botas e luvas poderiam evitar tais acidentes, reduzindo assim as estatísticas de mortalidade e comorbidades.

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública grave em países tropicais, tornando a pesquisa por agentes antiofídicos e conhecimentos de seus efeitos tóxico-farmacológicos de grande relevância. Este problema também leva a um transtorno sócio-econômico ao País, pois muitas vezes o trabalhador atingido por uma mordedura de serpente não sobrevive, ou quando sobrevive pode ficar com seqüelas que o impede de continuar sua jornada vital de trabalho, deixando sua família sem proventos, já

que muitas vezes essa família e/ou comunidade depende de sua força de trabalho (KOH E COL, 2006).

1.3. Características das serpentes e gêneros

No mundo existem por volta de 3.000 espécies de cobras ou serpentes dos quais 15% são consideradas peçonhentas. As serpentes venenosas possuem dentes inoculadores desenvolvidos e fosseta loreal, um orifício que se localiza entre a narina e os olhos, com função sensorial de termorrecepção. A presença da fosse loreal indica com segurança que a serpente é venenosa (CARDOSO, 2003).

As serpentes são divididas em três superfamílias, a Scolecophidia (Typhlopoidea), a Henophidia (Boidea) e a Caenophidia (Xenophidia), como mostrado na Figura 6 (GRAHAM E COL., 2008). O Brasil abriga 353 delas (10% do total), distribuídas em nove famílias, onde quatro delas tem importância epidemiológica e médica no território nacional, que são: Colubridae (262 espécies), a Boidae (9 espécies) e as peçonhentas representadas pelas famílias Elapidae (27 espécies) e Viperidae (27 espécies), em destaque para os gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus* (GRAHAM E COL, 2008).

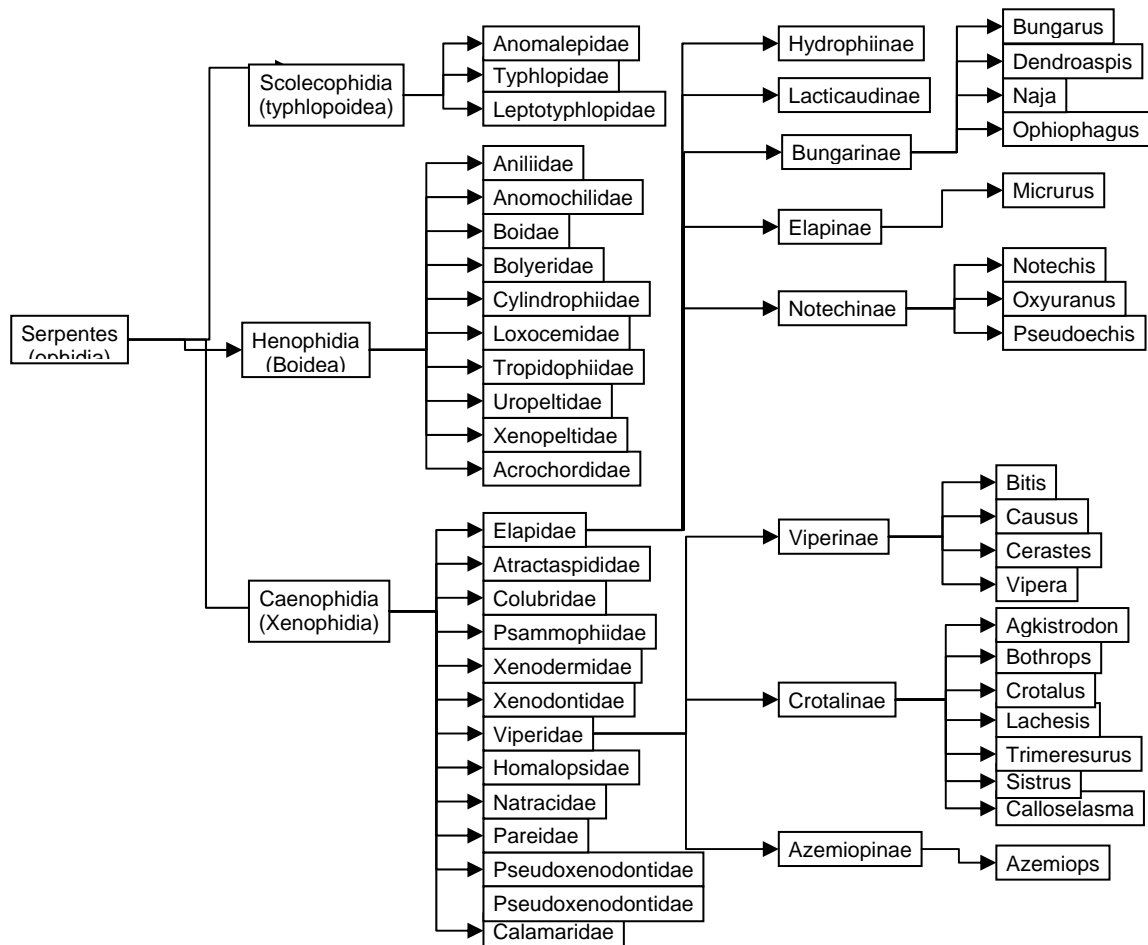


Figura 6: Divisão filogenética das serpentes. (Adaptado por GRAHAM E COL, 2008).

1.3.1. Gênero *Bothrops*

Este gênero é constituído por 25 espécies e possui grande relevância epidemiológica, já que os acidentes causados por estas espécies estão em torno de 90 % (Figura 7). Estão distribuídas em todo território nacional, e algumas serpentes se destacam pelo expressivo índice nestes acidentes, como por exemplo: *Bothrops jararaca* (99%). O veneno destas serpentes age principalmente no sistema cardiovascular e hemostático. Estas serpentes possuem cauda lisa e suas cores variam muito dependendo da espécie e região onde se encontram, apresentando hábitos preferencialmente noturnos e/ou crepusculares (ARAÚJO; MARTINS, 2007).

1.3.2. Gênero *Crotalus*

Popularmente conhecidas como cascavéis, cascavel-quatro-ventas, maracambóia, maracá dentre outras, essas serpentes são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas. Estas ocorrem raramente na faixa litorânea, sendo ausentes em florestas. O gênero *Crotalus* compreende várias subespécies, pertencentes a espécie *Crotalus durissus*, como a *Crotalus durissus durissus*, *Crotalus durissus terrificus*. Elas representam 7 % dos acidentes ofídicos no país (Figura 7). Estas serpentes emitem um som característico do seu guizo, podendo ser ouvido a dezenas de metros.

1.3.3. Gênero *Micrurus*

O gênero *Micrurus* compreende 18 espécies distribuídas em todo território nacional. São animais de pequeno e médio porte com cerca de 1 metro de comprimento e são conhecidas popularmente como coral, coral verdadeira ou boicorá. Os acidentes com estas serpentes ficam em torno de 0,5 % do total de casos (Figura 7). Estas serpentes apresentam anéis vermelhos, brancos e pretos em qualquer tipo de combinação. Em todo território do Brasil existem serpentes com a mesma coloração das corais verdadeiras, porém desprovidas de dentes inoculadores, sendo denominadas “falsas-corais”.

1.3.4. Gênero *Lachesis*

O gênero *Lachesis* apresenta somente uma espécie, a *Lachesis muta*. Esta serpente também é conhecida popularmente como surucucu, surucucu pico-de-jaca, surucutinga ou malha-de-fogo, sendo a maior serpente venenosa das Américas podendo alcançar até três metros de comprimento. Alguns relatos de literatura listam exemplares alcançando até quatro metros de comprimento. Elas são serpentes de hábitos noturnos, que vivem em locais preferencialmente úmidos e apresentam comportamento agressivo quando ameaçadas. Apresentam ampla distribuição no território brasileiro, estando presentes na região Amazônica, regiões da mata Atlântica e algumas florestas da Região Nordeste (HOGE E ROMANO-HOGE, 1978/1979). *L. muta* é a única serpente ovípara dentre as *Viperidae*.

Como mostrado na Figura 7, encontramos um baixo índice de acidentes ofídicos para estas serpentes, cerca 1,5%, porém com um alto índice de letalidade 0,95%, o que demonstra a severidade de seu envenenamento (Figura 9). Este elevado índice de óbito pode ser compreendido pela quantidade de veneno inoculado e/ou pela grande gama de componentes tóxicos presentes na sua secreção venenosa. Os sintomas e sinais decorrentes de seu envenenamento são caracterizados por intensa dor local, choque (hipotensão), bradicardia, diarreia, hemorragia, dentre outros. Vários sintomas observados são semelhantes aos produzidos por serpentes do gênero *Bothrops*. Observações clínicas sugerem uma atividade nefrotóxica (HAAD, 1980).

Diversas atividades biológicas distintas foram relatadas para o veneno bruto desta serpente, como atividade hidrolásica (SILVA E COL., 1985),

hemorrágica (SANCHEZ E COL., 1987), neurotóxica (DA SILVA E COL., 1989), “trombina-simile” (YARLEQUE E COL., 1989), hemolítica, coagulante (FULY E COL, 1993; MAGALHÃES COL., 2003).

Os três principais gêneros de serpentes peçonhentas brasileiras pertencem à família Viperidae, sendo esta responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil. O gênero *Bothrops* representa 90 % dos acidentes, enquanto os gêneros *Lachesis* e *Crotalus* 1 % e 7 %, respectivamente. (NISHIOKA E SILVEIRA, 1992) (Figura 7).

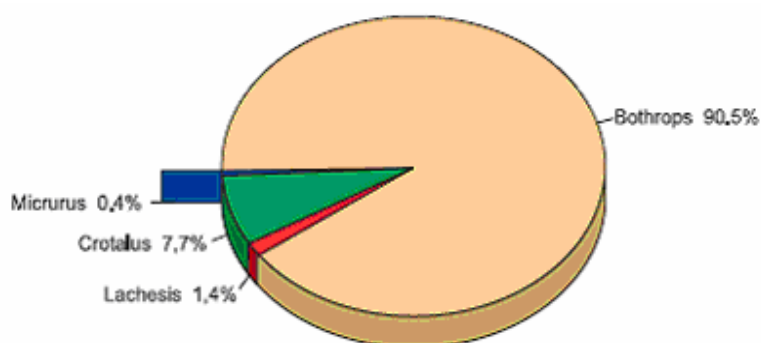


Figura 7: Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil (1990 – 1993).

No Brasil, os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública significativo. Apesar do elevado índice de acidentes com o gênero *Bothrops*, o gênero *Lachesis* apresenta uma letalidade mais expressiva (Figura 8). Dados comparando os acidentes laquéticos e botrópicos apontam para um aumento nos acidentes deste primeiro gênero, ressaltando a importância nos estudos de agentes antiofídicos para o tratamento dos envenenamentos causados por essas serpentes (Figura 2).

NÚMERO DE ÓBITOS E LETALIDADE por tipo de acidente, 1990-3 e 2001-4

acidente	1990-3			2001-4		
	óbito	total	letalidade	óbito	total	letalidade
botrópico	185	59.619	0,31	243	65.697	0,37
crotálico	95	5.072	1,87	70	6.959	1,01
laquético	9	939	0,96	22	2.170	1,01
elapídico	1	281	0,36	1	486	0,21
não peç.	0	2.361	0,00	0	2.160	0,00
ign	69	13.339	0,52	75	18.212	0,41
Total	359	81.611	0,45	411	95.684	0,43

Fonte: SINAN-Animais Peçonhentos (02/03/05)

Figura 8: Índice de letalidade nos acidentes ofídicos, 1990-3 e 2001-4.
Fonte: Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA, 2001.

1.4. Função e composição do veneno

Os venenos das serpentes servem tanto como armamento ofensivo para capturar e digerir suas presas, como defesa na luta contra predadores, bem como atuam na higiene oral (FLETCHER E COL, 1997).

O veneno das serpentes é produzido por um par de glândulas exócrinas localizadas junto à margem inferior da mandíbula superior destes animais, sendo esta secreção composta por uma mistura complexa de moléculas de diferentes naturezas químicas. Os mecanismos que regulam a produção de peçonha nestas glândulas são desconhecidos, sabendo-se apenas que sua produção depende da concentração de material protéico armazenado no lúmen glandular (JUNQUERIA DE AZEVEDO, 2002). A quantidade de veneno

inoculado vai depender do porte da serpente, assim como se ela atacou outra presa recentemente, e o próprio tamanho da presa (OLIVEIRA E COL., 2003).

Tais secreções venenosas são formadas por uma mistura complexa de substâncias que agem em diversos sistemas biológicos. Os componentes dessas secreções variam entre as diferentes famílias, gêneros, espécies, idade e distribuição geográfica das serpentes, causando assim efeitos próprios de envenenamentos (HIDER E COL, 1991; CHIPPAUX, 1998).

Os componentes do veneno podem ser divididos em uma parte protéica e uma não-protéica (Figura 9). A parte não-protéica representa cerca de 0,5 a 1 % do peso seco do veneno e é formada por material inorgânico (sódio, potássio, cálcio, zinco, magnésio, ferro, cobalto) e orgânicos (citrato, lipídios, carboidratos, nucleotídeos e aminas vasoativas). A parte protéica é constituída por uma gama de proteínas com ou sem atividade enzimática e peptídeos, sendo esta responsável pelos efeitos biológicos produzidos no envenenamento, apresentando com isso maior relevância.

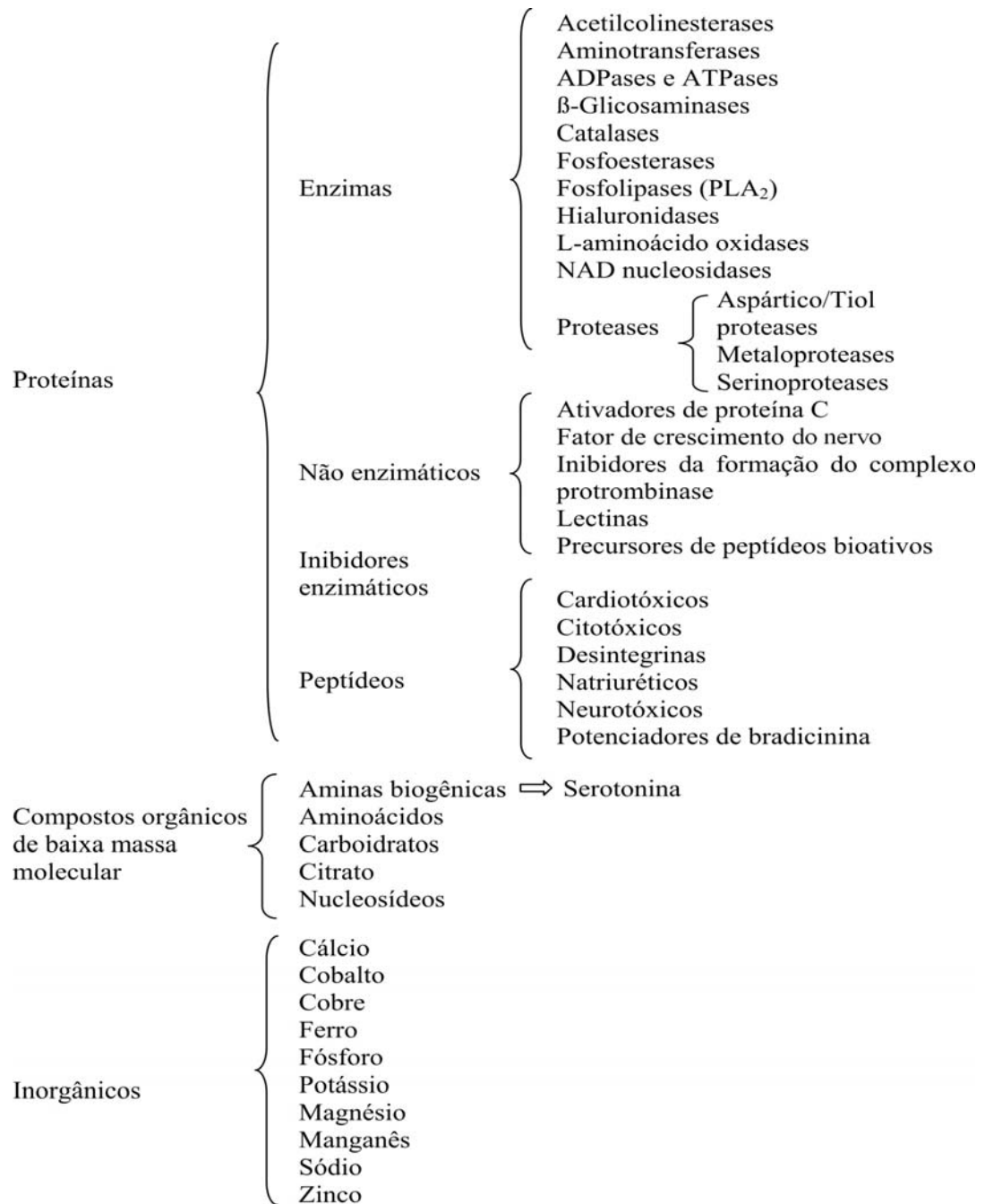


Figura 9: Componentes encontrados na peçonha das serpentes.
(Adaptado de RAMOS, 2001).

Atualmente observa-se um esforço significativo no intuito de isolar e caracterizar essas proteínas. Esta identificação irá contribuir no entendimento

da toxicidade dos venenos, resultando em uma melhor abordagem terapêutica e desenvolvimento de novos fármacos a partir desses compostos.

Os acidentes ofídicos causam efeitos sistêmicos como também reações locais no local da mordedura. Os efeitos sistêmicos compreendem alterações em diferentes sistemas como: cardiovascular, hemostático, respiratório, urinário e nervoso, que resulta em distúrbios na coagulação, hemorragia, hematúria, hipotensão e choque. Os efeitos locais incluem edema, equimose, necrose tecidual e hemorragia local, além de reação inflamatória e dor.

Embora seja possível associar os diferentes efeitos do veneno aos componentes específicos dos mesmos, deve-se salientar o fato que diferentes toxinas podem agir em sinergismo, produzindo um único efeito, assim como, uma única toxina pode apresentar mais de uma atividade biológica, participando, portanto, em mais de um efeito farmacológico. Estas toxinas alcançam e atuam em diferentes partes dos sistemas biológicos, conduzindo à mudanças na homeostasia, ora estimulando ou inibindo processos fisiológicos (MARKLAND, 1998).

Os sintomas e lesões também variam com a espécie da serpente. Os venenos das serpentes do gênero *Crotalus* e *Micrurus*, que são ricos em neurotoxinas, praticamente não lesam os tecidos locais, todavia induzem sintomas neurológicos graves, muitas vezes irreversíveis, causado pela ação desses componentes nas sinapses nervosas (FUNASA, 2001). Os venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, são ricos em enzimas de largo espectro de especificidade que causam lesões e até mesmo necrose nos tecidos locais (produzindo lesões teciduais intensas no local da picada), seguidas por sintomas sistêmicos decorrentes de complexas alterações no

sistema de coagulação, cardiovascular, do complemento e das paredes vasculares.

Dentre as proteínas presentes em venenos de serpentes podemos destacar: fosfolipases A_2 , nucleotidases L-aminoácido oxidases, metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, lectinas tipo C, dentre outras (Figura 9).

1.4.1. Desintegrinas

As desintegrinas compõem uma pequena família de polipeptídios (40–100 resíduos de aminoácidos) ricos em cisteína, e estão divididas em 5 grupos de acordo com o tamanho da cadeia polipeptídica e número de ligações dissulfeto (HUANG E COL., 1987). Desintegrinas apresentam uma seqüência tripeptídica, (Arg-Gly-Lys ou RGD), que é responsável pela inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP, através da competição com integrinas, em particular os receptores plaquetários GPIIb/IIIa (HUANG E COL., 1987).

1.4.2. Lectinas tipo C

As lectinas são um grupo protéico que se ligam a açúcares, porém no veneno da serpente encontramos as lectinas tipo C, que ligam-se seletivamente em proteínas de membrana das plaquetas ou em fatores de coagulação sanguínea. Estas são proteínas de aproximadamente 30 kDa, que consistem de associações covalentes de duas cadeias polipeptídicas idênticas ou homólogas e que podem apresentar um domínio rico em açúcar (KINI E EVANS, 1990).

1.4.3. L-aminoácido oxidases

As enzimas L-aminoácido-oxidases (LAAO) possuem entre 50-70 kDa de massa molecular, aproximadamente. A função dessas proteínas no veneno de serpentes não está completamente definida, porém trabalhos demonstram ação delas como indutoras de apoptose, inibindo ou ativando a agregação plaquetária, sendo postuladas como tóxicas (LI E COL, 1994). A ação destas enzimas nestes sistemas biológicos está associada à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois a adição de catalase abole tais efeitos (LI E COL, 1994).

1.4.4. Serinoproteases

As serinoproteases são importantes para a ação do veneno e algumas são denominadas “thrombin-like”, pois atuam catalisando a conversão direta do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem a necessidade da participação da trombina endógena. Estas enzimas possuem cerca de 30 kDa a 60 kDa e em função desta atividade catalítica agem no sistema de coagulação sanguínea promovendo alterações na hemostasia, o que pode contribuir para uma hemorragia local e sistêmica. Elas participam da ativação do fator V da cascata de coagulação, na fibrinogenólise, na ativação de plasminogênio e indução de agregação plaquetária (SERRANO E MAROUN, 2005). Além disso, algumas dessas emzimas têm sido utilizadas como agente anticoagulante na área médica clínica e cirúrgica e como reagente em testes de coagulação (MARSH E WILLIANS, 2005).

1.4.5. Metaloproteases

As metaloproteases são toxinas hemorrágicas do veneno e compartilham um domínio proteásico (metaloproteásico) que contém um átomo de zinco no seu sítio ativo. Estas enzimas, por induzirem hemorragia, são frequentemente chamadas de fatores hemorrágicos ou hemorraginas. As hemorraginas são classificadas de acordo com suas massas moleculares, em quatro grupos (FOX E SERRANO, 2008): 1) hemorraginas do tipo I (P-I) contém apenas o domínio metaloprotease, com massa molecular variando entre 20 Kda a 30 Kda; 2) hemorraginas do tipo II (P-II), contém dois domínios, o metaloproteásico e um domínio do “tipo-desintegrina”, com massas moleculares variando de 30 kDa a 60 kDa; 3) hemorraginas do tipo III (P-III), contém três domínios, o metaloproteasico, o “tipo-desintegrina” e um domínio com alto conteúdo de resíduos de cisteína, com massa variando de 60 kDa a 90 kDa; 4) hemorraginas do tipo IV (P-IV), com massa superior a 90 kDa e, possuindo em adição aos três domínios anteriormente citados, domínios lectina do tipo C (BJARNASON & FOX, 1995). As metaloproteases de venenos de serpentes agem lesando a parede vascular e produzindo hemorragia por dois mecanismos distintos: diretamente sobre proteínas (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) da parede vascular (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987), (BJARNASON & FOX, 1995) e indiretamente, por ação de metaloproteases endógenas, cujos zimogênios seriam ativados pelas metaloprotases presentes nos venenos de serpentes.

1.4.6. Fosfolipase A₂

As fosfolipases são enzimas encontradas em mamíferos e em veneno de vertebrados e invertebrados. São capazes de hidrolisar substratos específicos, em geral um fosfolipídio. Estas enzimas são classificadas em 4 diferentes grupos (fosfolipase A₁, A₂, C e D) de acordo com o sítio de hidrólise neste substrato (FULTON E COL., 1997). Dada a sua relevância nos sistemas biológicos e sua ubíqua distribuição na natureza, as fosfolipases do tipo A₂ estão entre as mais estudadas (DE PAULA E COL., 2009). As PLA₂ podem ser encontradas na forma intracelular ou extracelular, com especificidade de hidrólise do fosfolipídeo na posição 2 da cadeia do glicerol, formando ácidos graxos e a lisolecitina, também denominada de lisofosfolipídeo. Entre os substratos das PLA₂ podemos destacar: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol (KUDO E COL., 1993). As PLA₂ de venenos apresentam massas moleculares em torno de 14 kDa e uma grande quantidade de ligações dissulfeto, que lhes conferem estabilidade funcional. A sua função nos mamíferos ainda não está totalmente definida, mas a sua distribuição sugere que ela esteja envolvida com processos de sinalização celular, em processos inflamatórios, no sistema complemento e sistema imune. Nos mamíferos, elas estão presentes em vários tecidos e secreções glandulares (SIX E DENNIS, 2000). Diferentemente das PLA₂ encontradas nos mamíferos que não apresentam atividade tóxica, muitas PLA₂ encontradas em peçonhas são tóxicas e apresentam um largo espectro de efeitos biológicos alterando assim diversos processos fisiológicos (DENNIS, 1997; DE PAULA E COL., 2009). As PLA₂ estão envolvidas em diferentes

processos biológicos e patológicos: como na fertilização (FRY E COL., 1992) e proliferação celular (ARITA E COL., 1991), contração do músculo liso (NAKAJIMA E COL., 1992; SOMMERS E COL.,1992) e em doenças inflamatórias crônicas (VADAS E COL, 1993; VADAS E PRUZANSKI, 1986). Além disso, PLA_{2s} produzem diversos efeitos tóxico-farmacológicos deletério, como neurotóxicos (pré e pós sináptica), miotóxicos (mionecrose local e/ou sistêmica), cardiotoxicos, anticoagulante, pró-agregante e inibitório plaquetária, hipotensores, hemolíticos, hemorrágicos, convulsivantes, indutores de edema e destruidores de órgãos e tecidos, dentre outras (FULY E COL, 1997; 2001).

1.5. Agentes antiofídicos

1.5.1. Soroterapia

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para os acidentes ofídicos é a administração endovenosa de soro antiofídico de acordo com a gravidade do envenenamento. A produção do soro antiofídico começou a ser realizada no Brasil a partir de 1901, no Instituto Butantã, São Paulo, pelo pesquisador Vital Brazil (BRAZIL, 1907). Foi este pesquisador também que desenvolveu o soro antiofídico polivalente. Atualmente diversos estudos são realizados com o objetivo de padronização dos testes de eficácia para o soro. No Brasil, há três grandes centros produtores do soro antiofídico, que são: Instituto Vital Brazil (IVB, Niterói, RJ), Instituto Butantan (São Paulo, SP) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG). Contudo trabalhos mostram que existem diferenças na capacidade neutralizante dos soros produzidos por estes centros (DA SILVA E COL, 2007). A produção dos soros

monovalente ou polivalente ainda é baseada nos métodos originalmente descritos por Vital Brazil, que imunizou cavalos com venenos das espécies *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* observou que o soro hiperimunizado desses animais podia neutralizar os efeitos biológicos do envenenamento dessas espécies em seres humanos.

Apesar de a soroterapia reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito, ela apresenta algumas desvantagens como uma série de efeitos colaterais na vítima (reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), ineficiência no combate dos efeitos locais do veneno (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingindo) e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade (CARDOSO E COL, 2003). Além disso, existem inconvenientes para essa terapia como a indisponibilidade do soro para algumas regiões do país e sua ineficiência em neutralizar alguns efeitos tóxicos em alguns casos de envenenamento (WEN, 2003; DA SILVA E COL, 2007).

Portanto, torna-se importante a busca por novos tratamentos que possam complementar e/ou ser uma alternativa a atual soroterapia para neutralização dos efeitos biológicos e toxicológicos do veneno nas vítimas de acidentes com serpentes peçonhentas.

1.5.2. Potencial antiofídico de extratos vegetais

A utilização de plantas como medicamento decorre ao longo da história do homem. Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas adquiriram fundamental importância na medicina popular. Sabe-se que os egípcios,

assírios e hebreus (2.300 a.c.) cultivavam e utilizavam diversas ervas em suas atividades diárias, como embalsamento de múmias.

A flora brasileira é considerada uma das mais ricas fontes de material com potencial farmacológico e biotecnológico do mundo devido à diversidade de espécies e aos conhecimentos oriundos da medicina tradicional. É cada vez maior o interesse pelas plantas medicinais nativas do Brasil, especialmente pelas empresas de outros países (DE FÁTIMA, E COL., 2002).

As plantas medicinais constituem uma alternativa para tratar diversas enfermidades. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), por causa da pobreza e da falta de acesso a medicamentos industrializados, aproximadamente 65 a 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas para os primeiros cuidados de saúde (ARANTES E COL., 2005).

O uso de plantas no combate aos efeitos dos acidentes ofídicos tem sido largamente utilizado por populações nativas em todo o mundo. Estes povos utilizam o sulco proveniente da maceração destas plantas aplicando-o sobre o local da picada ou mesmo fazendo ingestão oral. O uso de extratos de plantas em acidentes ofídicos também é comum em regiões onde o acesso à soroterapia é restrito ou nulo. Do conhecimento destes povos, surgiram evidências científicas sobre as propriedades antiofídicas destes extratos. Porém, apenas nos últimos vinte anos, o tema tem merecido atenção dos meios científicos (MARTZ, 1992; RIZZINI E COL., 1988; PEREIRA E COL., 1984).

Diversas plantas das mais diferentes regiões do planeta são capazes de neutralizar os venenos de diversas serpentes, porém poucos autores atribuem

esta propriedade a uma determinada classe de substâncias (PEREIRA E COL.,1984) havendo poucos relatos sobre o possível mecanismo de ação (SILVA E COL., 2004). O potencial terapêutico destas plantas é tradicionalmente atribuído a classes de constituintes ativos, incluindo flavonóides, alcalóides, ligninas, taninos e outras.

Dessa forma, extratos vegetais surgem como uma alternativa no tratamento ofídico, por conter uma gama de componentes químicos com diversas propriedades farmacológicas de interesse medicinal (MARIANO E COL., 2005). Um grande número de extratos tem sido testado e demonstrado excelente atividade antiofídica (SOARES E COL., 2004; MELO E COL., 1994, OLIVEIRA E COL., 2005). O extrato aquoso de *Mandevilla velutina* foi capaz de inibir atividades farmacológicas de diversos venenos de serpentes (BIONDO E COL, 2003) bem como de *Mikonia glomerata*, que também demonstrou ação antiofídica (MAIORANO E COL., 2005).

Segundo diversos autores cerca de 578 plantas apresentam potencial terapêutico antiofídico, distribuídas em 94 famílias, principalmente Asteraceae (9%), Leguminosae (7,8%) e Euphorbiaceae (4,5%) (MARCUSSE E COL, 2007). Atualmente, 152 espécies de plantas com potencial terapêutico são utilizadas com foco medicinal no Brasil (SOARES E COL., 2004). Destas, apenas 18 espécies (12%) possuem validação científica mostrando assim, apenas uma pequena fração de plantas documentadas cientificamente. Por isso, maiores investigações para isolamento e caracterização dos princípios ativos presentes nos extratos vegetais são necessários para a utilização destas como agentes terapêuticos. Em destaque, alguns extratos de plantas e seus princípios ativos com propriedades antiofídicas (MARCUSSE E COL, 2007).

1.5.3. *Eclipta Alba*

Eclipta alba é conhecida popularmente como “agrião do beijo”, “erva-botão” ou “erva cidreira”, e pertence à família Asteraceae. Diversos estudos apontam propriedades farmacológicas dessa planta como antiagressiva (LOBO E COL., 2008), ação na memória e aprendizagem (BANJI E COL., 2007); antimalária (BAPNA E COL., 2007), ação diurética e hipotensiva e hipocolesterolêmica (RANGINENI, 2007), ações tônicas e estimulantes do fígado, imuno estimulante (CHRISTYBAPITA E COL., 2007) e antiofídica (DIOGO, E COL., 2009).

1.5.4. *Mandevilla velutina*

Mandevilla velutina pertence à família Apocynaceae e é encontrada na Mata Atlântica e sudoeste do Brasil. Possui efeitos medicinais descritos como: antiedematogênico (MATTOS E COL, 2006); antiofídica, possivelmente por inibir a atividade da PLA₂ (BIONDO E COL, 2003), antiinflamatório (MORS E COL, 1991). É conhecida popularmente como “jalapa-rósea”, “rosa do campo” e “purga do campo”.

1.5.5. *Sapindus Sapindus*

Pertence à família Sapindaceae, e ao gênero *Sapindus*. O nome do gênero significa “sabonete de índios”. É conhecida popularmente como “fruta de sabão”, “pau de sabão”, “sabão de macaco”, “sabonete de soldado”, “salta Martim”, dentre outras. Diversas propriedades farmacológicas são atribuídas a

este gênero como: bactericida (IBRAHIM E COL., 2006), antifúngico (TSUZUKI E COL., 2007), inibidor de agregação plaquetária (HUANG E COL., 2007).

1.5.6. *Mikania glomerata*

Mikania glomerata é conhecida popularmente como “guaco” originária da América do Sul sendo encontrado no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai. Pertence à família Asteraceae e o seu gênero possui cerca de 430 espécies. Diversos efeitos medicinais são descritos para essa espécie como: broncodilatadora (SOARES E COL., 2002), antifúngica (DUARTE E COL., 2005), bactericida (BETONI E COL., 2006), antialérgica (DOS SANTOS E COL., 2006), antiinflamatória (RUPPELT E COL., 1991) e antiofídica (MARIANO E COL., 2005).

1.5.7. *Jatropha Elliptica*

Jatropha elliptica é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae e conhecida popularmente como “purga de lagarto”, “batata de tiu”, “jalapão” e “raiz de cobra” (AMUI E COL., 2003). É característica do cerrado brasileiro, sendo amplamente utilizada na medicina popular da Baixada Cuiabana, em Mato Grosso. Seus efeitos farmacológicos descritos são: bactericida (DE LIMA E COL., 2006), antiofídica (AMUI E COL., 2003).

1.5.8. *Stryphnodendron barbatiman*

Stryphnodendron barbatiman pertence à família Leguminosae, e é conhecida popularmente como “barbatimão”, “barba-de-timão” “casca da virgindade”, “ubatima”, entre outros. Sua árvore pode medir entre 4 e 6 metros

de altura. Possui algumas atividades terapêuticas descritas como cicatrizante, anti-hemorrágica, antimicrobiana (REICHER E COL., 1992).

1.5.9. *Tibouchina stenocarpa*

É uma espécie que pertence à família Melastomataceae. Encontrada em alguns países da América do Sul, sendo no Brasil, Bolívia, Peru e Paraguai e conhecida popularmente como “pé de gigante” (MORAES E COL., 2003).

1.5.10. Gênero *Miconia*

O gênero *Miconia* é o maior representante da família Melastomataceae com cerca de 1.000 espécies, das quais 250 encontram-se no Brasil. Estas espécies têm sido descritas com atividades tripanocida (CUNHA E COL., 2003), analgesia (ANDRADE E COL., 2002), antiinflamatória (VASCONCELOS E COL., 2006) e antiofídica (NISHIJIMA E COL., 2009).

1.5.11. *Casearia Sylvestris*

Pertence a família Flacourtiaceae, sendo conhecida popularmente como “guaçatonga”. Possui diversos efeitos terapêuticos listados como: tripanocida (MESQUITA E COL, 2005), antioxidante (MENESES E COL, 2004), anti-PLA₂ (RASLAN E COL, 2002), antiofídico (CINTRA-F. E COL, 2008).

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes extratos aquosos vegetais na neutralização das atividades biológicas (hemorrágica, hemolítica, coagulante e proteolítica) do veneno bruto da serpente *Lachesis muta* analisando seu potencial antiofídico para possível complementação da soroterapia.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de extratos vegetais na neutralização do veneno de *L. muta* quanto a:
 - Atividade *in vitro* hemolítica.
 - Atividade *in vitro* coagulante.
 - Atividade *in vitro* proteolítica.
 - Atividade *in vivo* hemorrágica.
- Identificar a flora brasileira como importante fonte de moléculas com diferentes propriedades antiofídicas e farmacológicas de interesse medicinal.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Azocaseína, EDTA, citrato de sódio, tri-hidroximetil-aminometano (Tris), cloreto de cálcio (CaCl_2), ácido trifluoracético (TCA) foram obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Todos os outros reagentes foram obtidos no mais alto nível de pureza disponível no mercado.

3.2. Obtenção do veneno de *Lachesis muta*

O veneno bruto da serpente *L. muta* liofilizado foi gentilmente cedido pelo Prof. Eládio F. Sanchez, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG e mantido a -20°C até o momento dos ensaios biológicos.

3.3. Animais

Os camundongos machos da linhagem BALB-C pesando cerca de 20g foram provenientes do Núcleo de Animais de Laboratório (NAL) da Universidade Federal Fluminense mantidos sob controle de luminosidade, temperatura e com ração e água filtrada à vontade. Os ensaios seguiram as Normas de Bem-estar Animal do COBEA.

3.4. Extratos vegetais

Os extratos vegetais foram gentilmente cedidos pelo Professor Andreimar M. Soares (Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP, Universidade de São Paulo, USP-RP), e aproximadamente 10 g foram ressuspensos em 1,0 mL salina (0,15 M), aliquotados e mantidos a -20°C até o

momento dos ensaios biológicos. Os extratos foram coletados em Ribeirão Preto, São Carlos e Pedregulho, São Paulo, Brasil. Os espécimes foram depositados na Unidade de Biotecnologia da UNAERP e autenticados pelo Prof. Hermógenes de Freitas Leitão Filho, do Instituto de Biologia da UNICAMP. O ponto de coleta foi marcado utilizando um sistema de posicionamento global “Global System Positionment” (GPS), modelo Garmin legend -79728002.

Os extratos vegetais e a parte do vegetal utilizado estão listados abaixo:

Tabela 1: Relação dos extratos vegetais utilizados com numeração e origem do extrato.

<u>Número</u>	<u>Origem</u>	<u>Extrato vegetal</u>
1	Raiz	<i>Eclipta alba</i>
2	Raiz	<i>Mandevilla velutina</i>
3	Raiz	<i>Mikania glomerata</i>
4	Xilópodio	<i>Jatropha ellyptica</i>
5	Caule	<i>Jatropha ellyptica</i>
6	Não determinado	<i>Miconia fallax</i>
7	Não determinado	<i>Miconia albicans</i>
8	Não determinado	<i>Miconia sellowiana</i>
9	Raiz	<i>Stryphnodendron barbatiman</i>
10	Raiz	<i>Tibouchina stenocarpa</i>
11	Raiz	<i>Casearia sylvestris</i>
12	Não determinado	<i>Sapindus sapindus</i>

3.5. Protocolo de neutralização

Todos os ensaios de neutralização foram feitos usando uma relação veneno:planta de 1:10 e 1:20, com uma preincubação de 30 minutos a 37°C. Após este período, as atividades biológicas hemólise indireta, hemorrágica, coagulante e proteolítica foram realizadas como descrito a seguir, mantendo os seguintes grupos:

Grupo a) Veneno bruto + salina (controle positivo)

Grupo b) Veneno bruto + extrato aquoso

Grupo c) Extrato aquoso + salina (controle negativo)

3.6. Atividades biológicas

3.6.1. Atividade PLA₂ por hemólise indireta

A atividade hemolítica foi determinada através da hemólise indireta usando hemácias lavadas humanas e gema de ovo de galinha como fonte de fosfolípidios aqui denominado de substrato (FULTON E COL, 1997). O substrato da gema de ovo foi diluída em NaCl (0,15 M) 1:1, e em seguida a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 60 minutos a 10°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante contendo os fosfolípidios foi utilizado como substrato no ensaio, que ocorreu em duas etapas: A) incubação do veneno bruto de *L. muta* com o substrato e; B) avaliação da atividade hemolítica através da liberação de hemoglobina através da produção de lisolecitina gerada enzimaticamente na etapa anterior. Inicialmente, as amostras contendo o veneno foram adicionados a um meio de reação contendo CaCl₂ (8 mM, concentração final) e gema de

ovo (50 µL) em um volume final de 250 µL. Após 10 minutos a 37°C, a reação enzimática foi interrompida com adição de EDTA (concentração final, 10 mM). Em seguida, 3,2 mL de NaCl (0,15 M) foram adicionados aos tubos e 1,3 mL de uma suspensão a 2 % (v/v) de hemácias humanas previamente lavadas por centrifugação com NaCl (0,15 M). Após 1 hora de incubação a 37°C, os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm a temperatura ambiente e a hemoglobina liberada no sobrenadante quantificada em A578 nm. A hemólise total (100 %) foi obtida na suspensão de eritrócitos após completa lise com água destilada e comparada com o percentual de hemólise obtido nos tubos contendo veneno ou os extratos de plantas. A quantidade de veneno (µg/mL) que causou 70-80% de hemólise foi usada nos experimentos de neutralização e designada como Concentração Efetiva (CE).

O efeito neutralizante dos extratos vegetais na hemólise foi avaliado pré-incubando os extratos aquosos com uma Concentração Efetiva (CE) do veneno bruto por 30 minutos 37°C, prosseguindo com o ensaio de hemólise como descrito acima.

3.6.2. Hemorrágica

A atividade hemorrágica foi determinada utilizando o método de Kondo e col., (1960) modificado, injetando-se intradermicamente (i.d) na pele do abdômen dos camundongos o veneno bruto de *L. muta* diluído em 150 mM salina em um volume final de 100 µL. Duas horas após a injeção, os animais foram sacrificados por inalação de éter etílico e a pele retirada, estirada e os locais de injeção foram analisados macroscopicamente. A atividade hemorrágica foi quantificada pela formação e mensuração de halo

hemorrágico, em milímetros. Como controle, salina ou extratos vegetais isolados foram injetados separadamente nos animais. Uma Dose Mínima Hemorrágica (DMH) foi determinada como a concentração de veneno (μg veneno/g) que causa um halo hemorrágico de 10 mm.

O efeito neutralizante dos extratos vegetais foi avaliado incubando-os previamente por 30 minutos a 37°C com o veneno bruto antes da injeção nos animais, sendo a hemorragia analisada como descrito acima.

3.6.3. Coagulante

O plasma utilizado foi obtido através de um “pool de plasma” citratado (0,313% v/v, concentração final) de doadores humanos saudáveis. Este plasma (100 μL) foi diluído 1:1 salina e transferido para tubos de vidro previamente siliconizados. Após 1 min a 37°C , alíquotas do veneno de *L. muta* foram misturados ao plasma citratado e o tempo de coagulação (em segundos) observado visualmente através da formação do trombo. O tempo de coagulação máximo observado foi de 10 minutos e com um volume final da reação foi de 200 μL . Uma Dose Mínima Coagulante (DMC) é a concentração de veneno de *L. muta* (μg veneno/ensaio) capaz de coagular o plasma em 1 minuto.

O efeito neutralizante dos extratos vegetais na atividade coagulante do veneno de *L. muta* foi avaliado incubando-os previamente por 30 minutos a 37°C com o veneno bruto. Em seguida a mistura foi adicionada ao plasma e a coagulação monitorada como descrito acima. O tempo máximo de observação foi de 10 minutos e considerado como 100 % de inibição.

3.6.4. Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada usando-se azocaseína como substrato (Garcia e col., 1978), com algumas modificações. Aliquotas do veneno de *L. muta* foram incubadas com 0,2 % azocaseína (p/v) em tampão 200 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂, pH 8,8 por 90 min. a 37°C. O volume final (0,8 mL) da reação foi completado pela adição de 150 mM NaCl. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C e após 90 min. de reação, a atividade foi interrompida com adição de 0,4 mL TCA 10%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos, e ao sobrenadante foi adicionado 0,5 mL NaOH 2 N. A atividade proteolítica foi quantificada em espectrofotômetro com absorvância A₄₂₀ nm e uma Concentração Efetiva (CE) foi designada como a quantidade de veneno (µg/mL) capaz de produzir uma variação de 0,20 em A₄₂₀ nm.

O efeito neutralizante dos extratos vegetais foi avaliado através da pré-incubação dos extratos com o veneno bruto por 30 minutos a 37°C, e em seguida, o método realizado como descrito acima.

3.7. Análise estatística

Os experimentos foram representados graficamente utilizando-se o programa Microcal Origin 6.0 e os valores demonstrados representam a média ± desvio padrão (SD) utilizando Anova e teste T com valores de P<0,05.

RESULTADOS

4.1. Hemólise indireta

O veneno bruto de *L. muta* foi capaz de causar hemólise em hemácias lavadas humanas de maneira concentração-dependente (Figura 10). A concentração de veneno que causou 50% de hemólise (CE₅₀) foi de aproximadamente 10 µg/ensaio e utilizada nos ensaios de neutralização da atividade hemolítica. O veneno bruto de *L. muta* não foi capaz de lisar as hemácias de forma direta, pois não houve hemólise na suspensão das hemácias lavadas sem adição da gema do ovo do meio reacional (dados não mostrados).

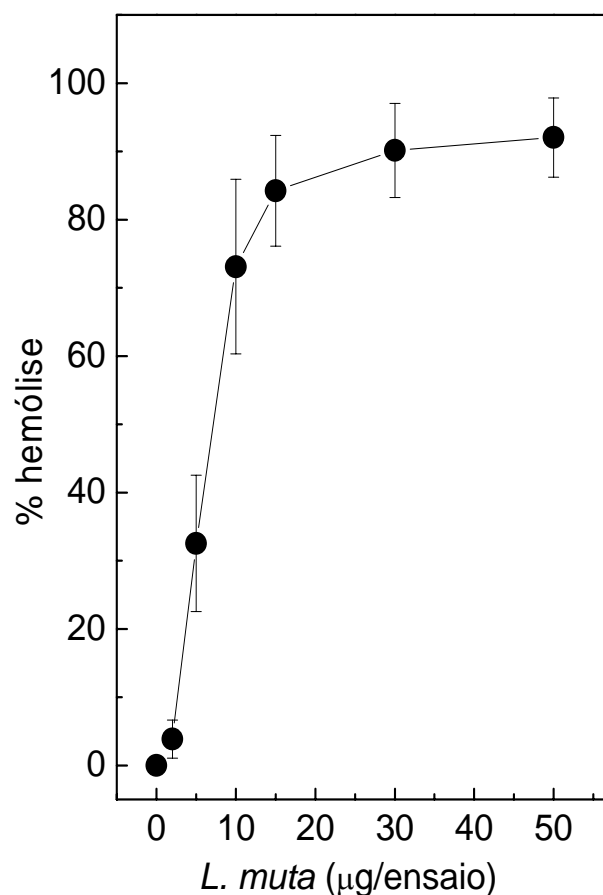


Figura 10. Atividade hemolítica do veneno bruto de *L. muta*. Diferentes concentrações (5-50 µg) do veneno foram adicionadas ao meio de reação e a atividade hemolítica realizada. Os resultados expressam a média ± SD de três experimentos individuais (n= 4).

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos aquosos sobre a atividade hemolítica de *L. muta*, estes foram pré-incubados com o veneno bruto durante 30 minutos a 37°C e, em seguida a atividade hemolítica realizada. Como podemos observar os extratos de vegetais foram capazes de inibir a atividade hemolítica de *L. muta*, variando entre 2% a 100% de inibição (Figura 11). Os extratos aquosos de *E. alba* (coluna 1), *M. veluntina* (coluna 2), *M. fallax* (coluna 6), *M. albicans* (coluna 7), *M. selowiana* (coluna 8) e *T. stenoscarpa* (coluna 10) foram capazes de inibir completamente a atividade hemolítica, enquanto que os extratos de *J. ellyptica* (coluna 5) e *S. barbatiman* (coluna 9) inibiram a hemólise cerca de 75 a 85 % do veneno nas proporções veneno:planta avaliadas (1:10 e 1:20). Entretanto, a inibição da hemólise pelos extratos de *M. glomerata* (coluna 3), *J. ellyptica* (coluna 4) e *C. sylvestris* (coluna 11) variou com as proporções veneno:planta utilizadas. Na proporção 1:10, a inibição não se mostrou eficaz para estes extratos, enquanto que na proporção 1:20, a inibição foi cerca de 65 % (Figura 11). Sendo assim, os extratos de *M. glomerata* e de *C. sylvestris* não obtiveram um percentual de inibição expressivo na proporção 1:10. O extrato de *S. sapindus* (coluna 12) não foi capaz de inibir a hemólise de *L. muta* em ambas as proporções estudadas (Figura 11). De forma similar ao veneno de *L. muta*, os extratos vegetais isoladamente não foram capazes de causar hemólise nas condições experimentais (dados não mostrados).

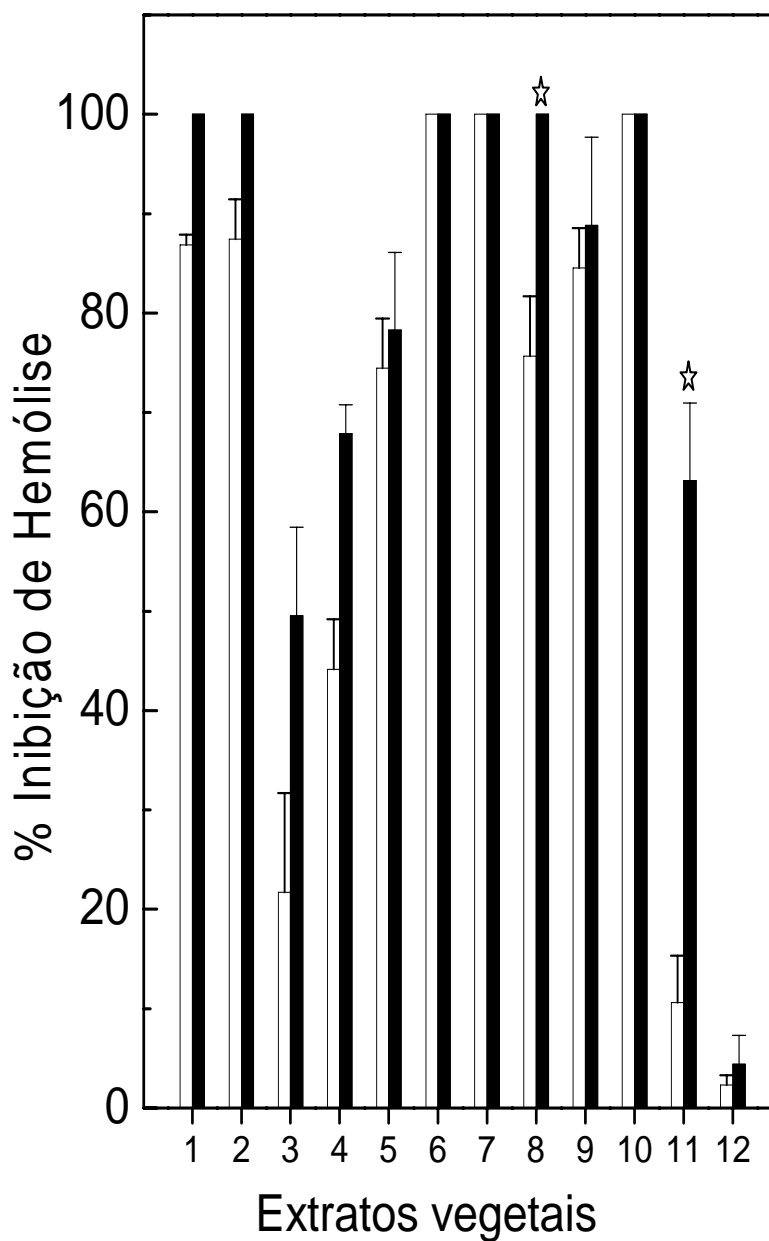


Figura 11: Efeitos dos extratos vegetais na atividade hemolítica de *L. muta*. O veneno e os extratos foram preincubadas durante 30 minutos a 37°C em diferentes proporções veneno:planta (1:10, coluna branca e 1:20, coluna preta). Coluna 1, *E. alba*; coluna 2, *M. velluntina*; coluna 3, *M. glomerata*; coluna 4, *J. ellyptica* (xilópodio); coluna 5, *J. ellyptica* (caule); coluna 6, *M. fallax*; coluna 7, *M. albicans*; coluna 8, *M. sellowiana*; coluna 9, *S. barbatiman*; coluna 10, *T. stenocarpa*; coluna 11, *C. sylvestris* e coluna 12, *S. sapindus*. Os resultados expressam a média \pm SD de três experimentos individuais (n= 3) com $p < 0,05$,* valores estes comparados a proporção 1:10.

4.2. Atividade coagulante

O veneno bruto de *L. muta* foi capaz de coagular o plasma de maneira concentração-dependente (Figura 12). Uma Dose Mínima Coagulante (DMC) foi determinada como a quantidade de veneno de *L. muta* ($\mu\text{g}/\text{ensaio}$) capaz de coagular o plasma em 60 segundos. Como podemos observar, a DMC foi de aproximadamente 12 μg de veneno/ensaio, concentração que fora então utilizada nos ensaios seguintes de neutralização (Figura 12).

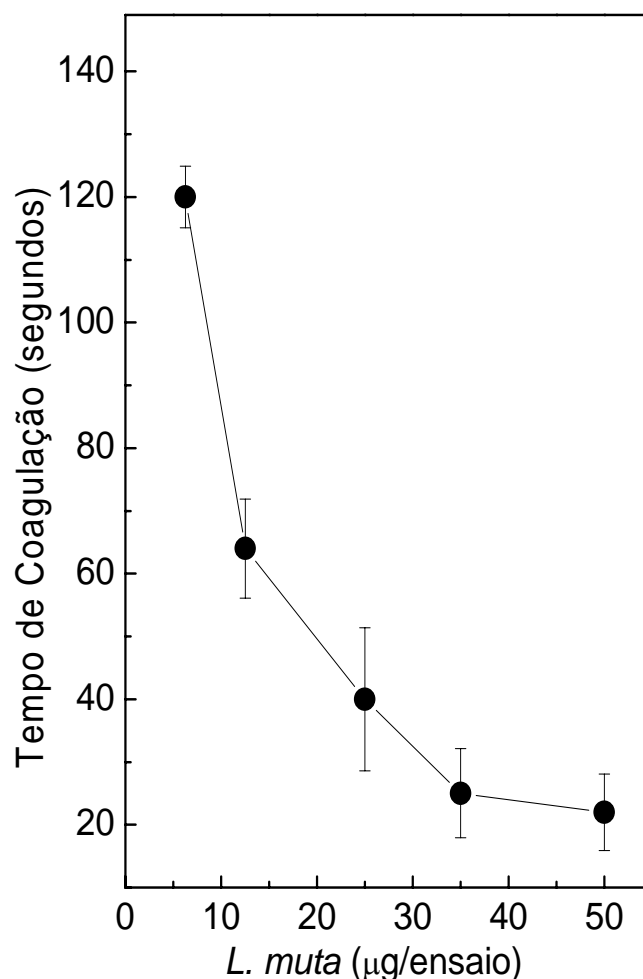


Figura 12: Efeito coagulante do veneno bruto de *L. muta*. Diferentes concentrações (5-50 μg) de veneno de *L. muta* foram adicionadas ao plasma e o tempo de coagulação monitorado. Os resultados expressam a média \pm SD de três experimentos individuais ($n= 4$).

O efeito dos extratos vegetais na atividade coagulante de *L. muta* foi avaliado e mostrado na Figura 13. Os extratos vegetais de *E. alba* (coluna 1), *M. velutina* (coluna 2), *S. barbatiman* (coluna 9) foram capazes de inibir completamente a coagulação causada pelo veneno de *L. muta* em ambas as proporções avaliadas; em contraste com o extrato de *T. stenocarpa* (coluna 10) que, somente a proporção 1:20 impediu este fenômeno de forma eficaz, já que na proporção 1:10, a coagulação observada foi de 6 minutos (Figura 13). Portanto, este extrato foi capaz de prolongar em cerca de 6 vezes a coagulação proporcionada pelo veneno sozinho. Os demais extratos interferiram com um perfil pouco expressivo sobre a coagulação do plasma e, para alguns extratos (*M. albicans*, coluna 7; *M. sellowiana*, coluna 8; e *S. sapindus*, coluna 12) foi observada nenhuma inibição em ambas as proporções ensaiadas (Figura 13).

A adição do veículo (salina) não promoveu a coagulação do plasma bem como os extratos isoladamente (dados não mostrados). O tempo máximo de observação foi de 10 minutos.

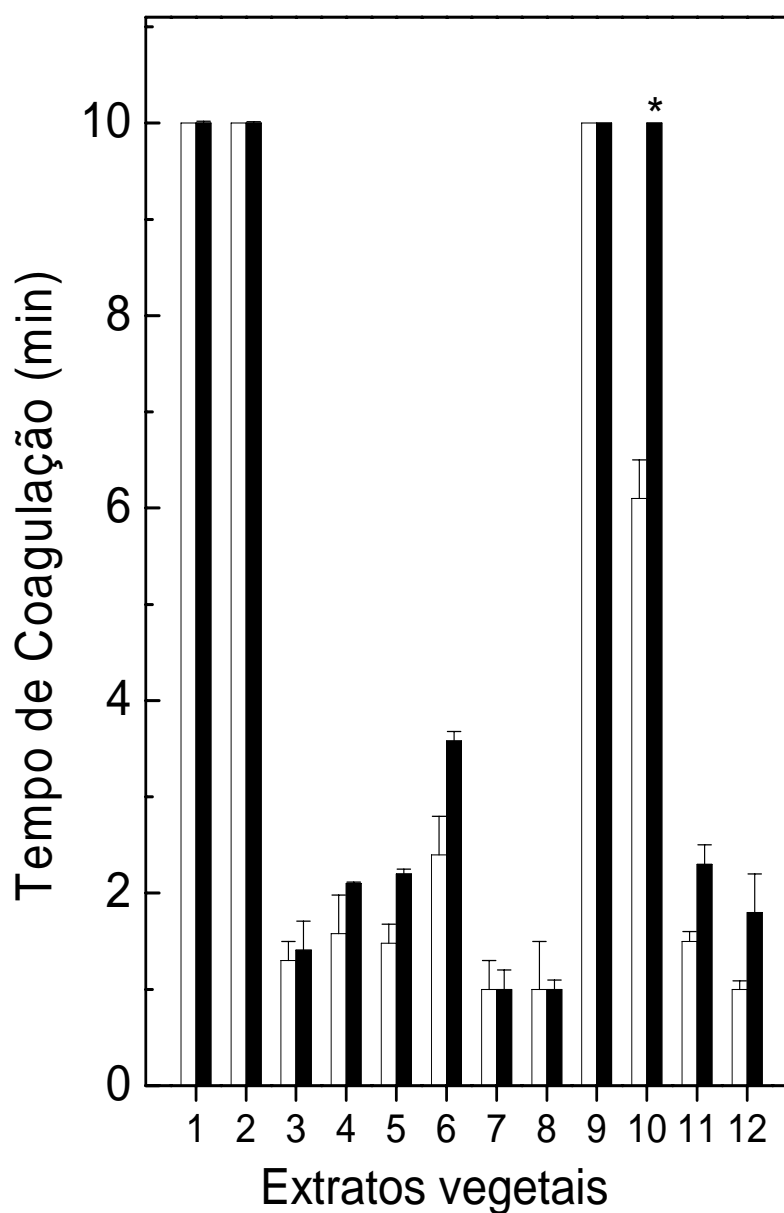


Figura 13. Efeito dos extratos aquosos na atividade coagulante de *L. muta*. O veneno e os extratos foram preincubadas durante 30 minutos a 37°C em diferentes proporções veneno:planta (1:10, coluna branca e 1:20, coluna preta). Coluna 1 *E. Alba*, coluna 2 *M. velluntina*, coluna 3 *M. glomerata*, coluna 4 *J. ellyptica* (xilópodio), coluna 5 *J. ellyptica* (caule), coluna 6 *M. fallax*, coluna 7 *M. albicans*, coluna 8 *M. sellowiana*, coluna 9 *S. barbatiman*, coluna 10 *T. stenocarpa*, coluna 11 *C. sylvestris* e coluna 12 *S. sapindus*. * $P < 0,05$, em relação a proporção 1:10. Os resultados expressam a média \pm SD de quatro experimentos individuais ($n = 4$) com $p < 0,05$, *, valores estes comparados com a proporção 1:10.

4.3. Atividade hemorrágica

A hemorragia causada pela injeção do veneno de *L. muta* em camundongos ocorreu de forma dose-dependente (Figura 14) e uma Dose Mínima Hemorrágica (DMH), foi determinada como a quantidade do veneno capaz de causar a formação de um halo de hemorragia de 10 mm, sendo observado valor experimental de aproximadamente 12,5 $\mu\text{g/g}$. Este valor de DMH foi utilizado nos ensaios de neutralização neste ensaio.

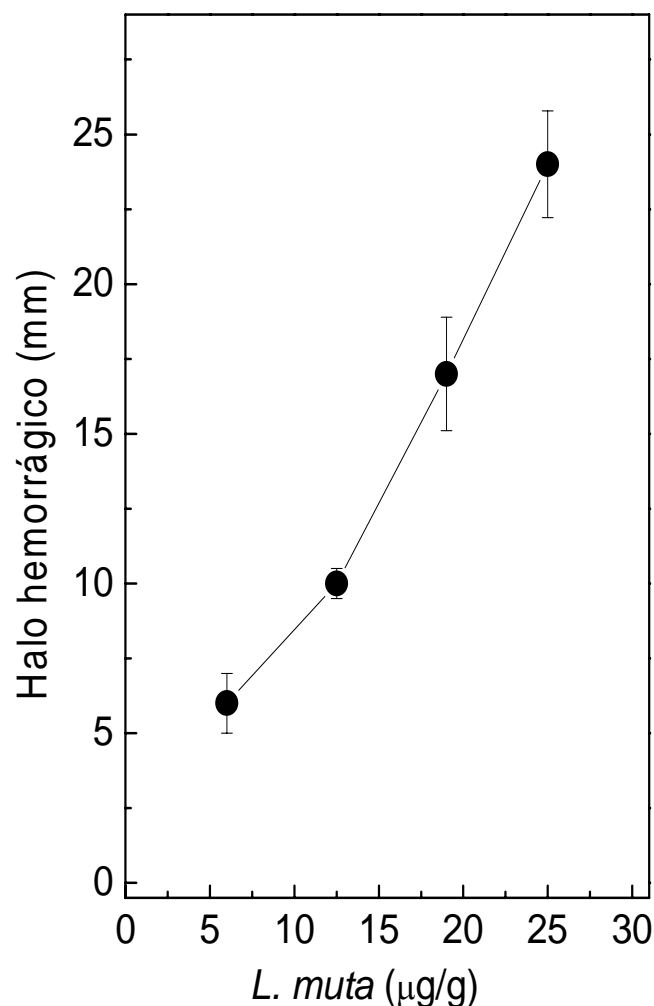


Figura 14. Atividade hemorrágica do veneno de *L. muta*. Diferentes concentrações (5-30 $\mu\text{g/g}$) de veneno de *L. muta* foram injetadas em camundongos e a atividade hemorrágica realizada. Os resultados expressam a média \pm SD de quatro experimentos individuais (n= 4).

Após a injeção do veneno bruto de *L. muta* (30 µg/g) em camundongos, uma intensa hemorragia foi observada (Figura 15, painel B). Em paralelo, a injeção de salina (Figura 15, painel A) ou dos extratos vegetais isoladamente não promoveu hemorragia nas mesmas condições experimentais (dados não mostrados). O painel C ilustra que a injeção do extrato aquoso de *S. barbatiman* não promoveu hemorragia nos camundongos. O tratamento do veneno de *L. muta* com o extrato aquoso de *S. barbatiman* (100 µg) aboliu a hemorragia causada pelo veneno (Figura 15, painel D). Vale ressaltar que esta concentração de veneno (30 µg/g) representa três vezes a DMH.

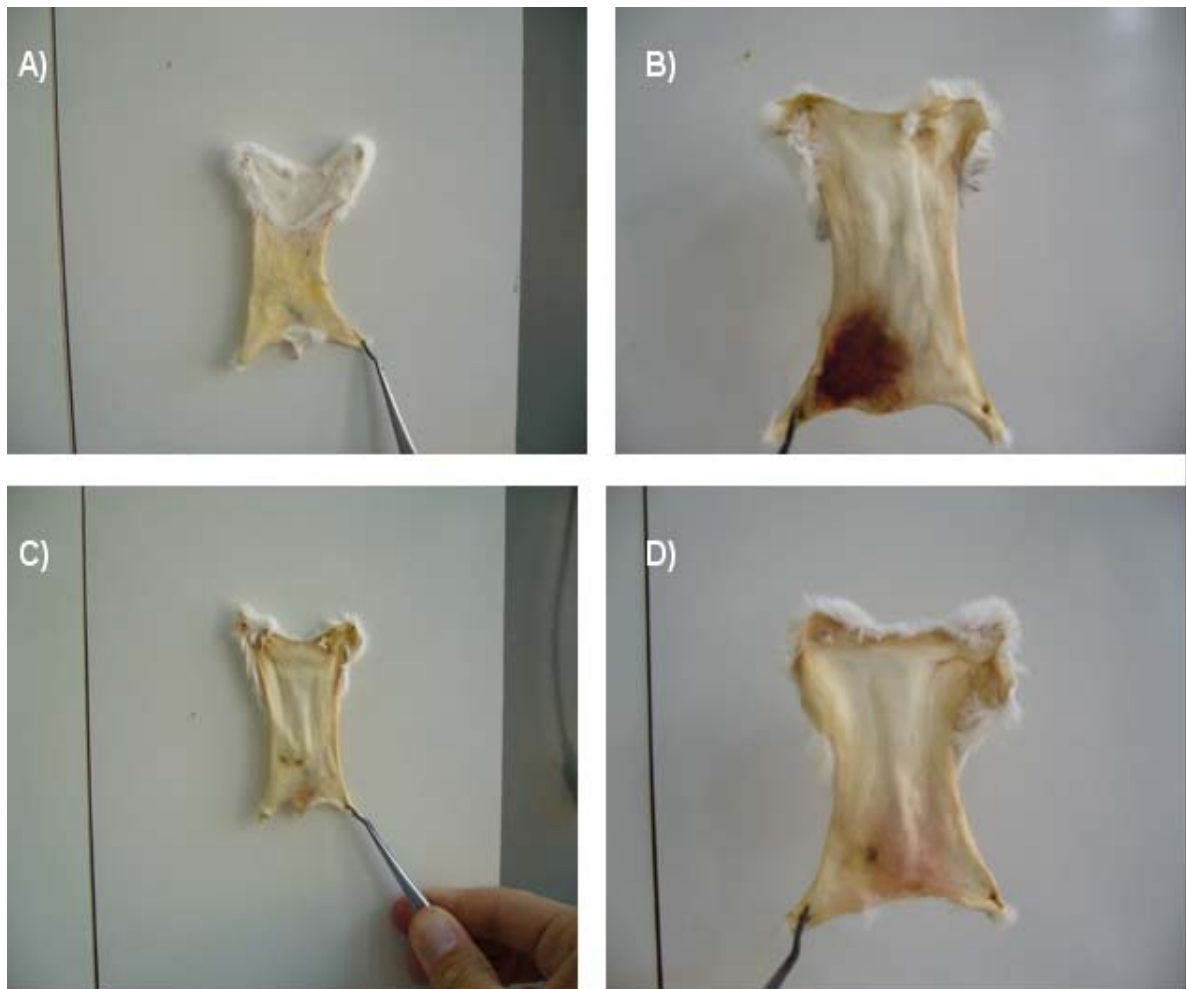


Figura 15. Imagem da pele dos camundongos na atividade hemorrágica. Os animais foram tratados com: A) salina; B) veneno de *L. muta*; C) extrato aquoso de *S. barbatiman*; D) *L. muta* + *S. barbatiman*. A figura ilustra o resultado de três experimentos individuais (n=4).

Em seguida avaliamos o efeito dos extratos vegetais aquosos na capacidade em proteger os camundongos contra a hemorragia causada pelo veneno de *L. muta* utilizando como DMH 10 μ g/g (Figura 16). Como observado na Figura 16, os extratos das plantas *M. glomerata* (coluna 3) e *S. sapindus* (coluna 12) não foram capazes de inibir este efeito. Em contraste, os demais extratos obtiveram um percentual significativo na inibição da hemorragia causada pelo veneno, havendo pouca diferença entre as proporções utilizadas neste ensaio (Figura 16). Vale destacar os extratos das plantas *J. ellyptica*, xilópodio (coluna 4), *M. albicans* (coluna 6), *M. sellowiana* (coluna 8), *S. barbatiman* (coluna 9) e *T. stenoscarpa* (coluna 10) demonstraram inibição total, protegendo assim os camundongos da hemorragia causado pelo veneno de *L. muta*.

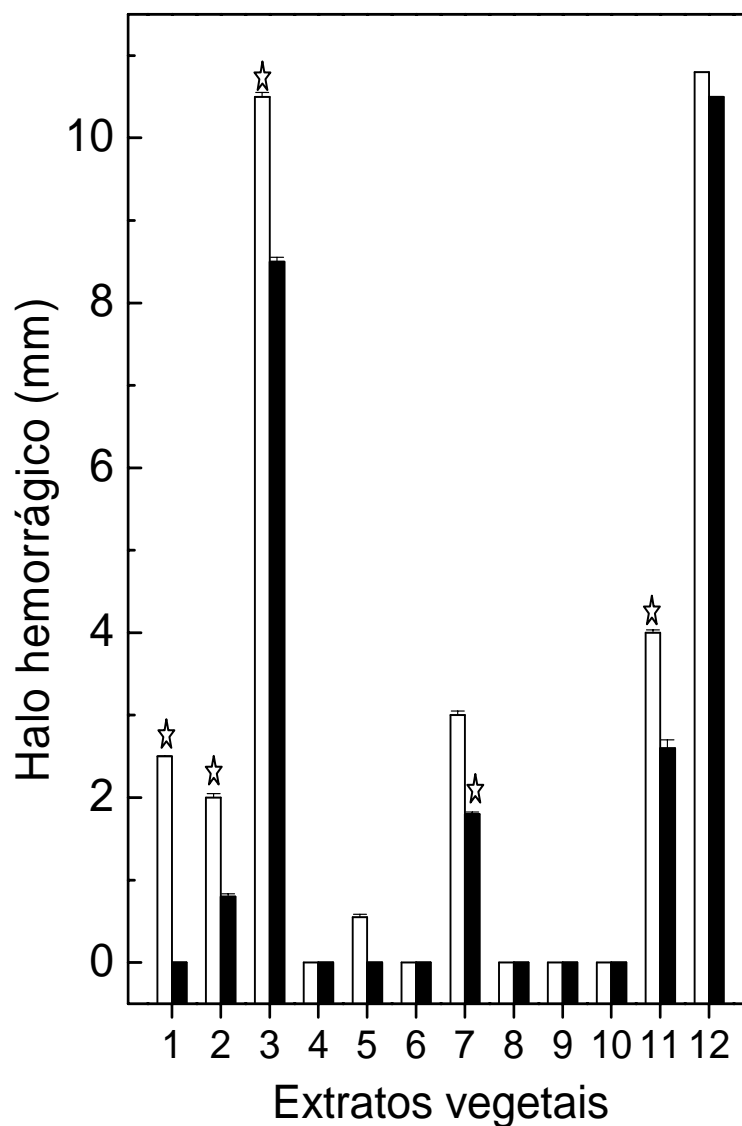


Figura 16 - Efeito dos extratos vegetais na atividade hemorrágica de *L. muta*. O veneno e os extratos foram preincubados durante 30 minutos a 37°C em diferentes proporções veneno:planta (1:10, coluna branca e 1:20, coluna preta). Coluna 1, *E. Alba*; coluna 2, *M. velluntina*; coluna 3, *M glomerata*; coluna 4, *J. ellyptica* (xilópodio); coluna 5, *J. ellyptica* (caule); coluna 6, *M. fallax*; coluna 7, *M. albicans*; coluna 8, *M. sellowiana*; coluna 9, *S. barbatiman*; coluna 10, *T. stenocarpa*; coluna 11, *C. sylvestris* e coluna 12, *S. sapindus*. Os resultados expressam a média \pm SD de quatro experimentos individuais (n= 4), $p < 0,05$, * valores estes comparados a curva controle.

4.4. Atividade proteolítica

O veneno de *L. muta* apresentou uma atividade proteolítica dose-dependente usando azocaseína como substrato. Concentração Efetiva (CE) obtida foi de aproximadamente 7 μg de veneno (Figura 17), que foi utilizada nos ensaios de neutralização.

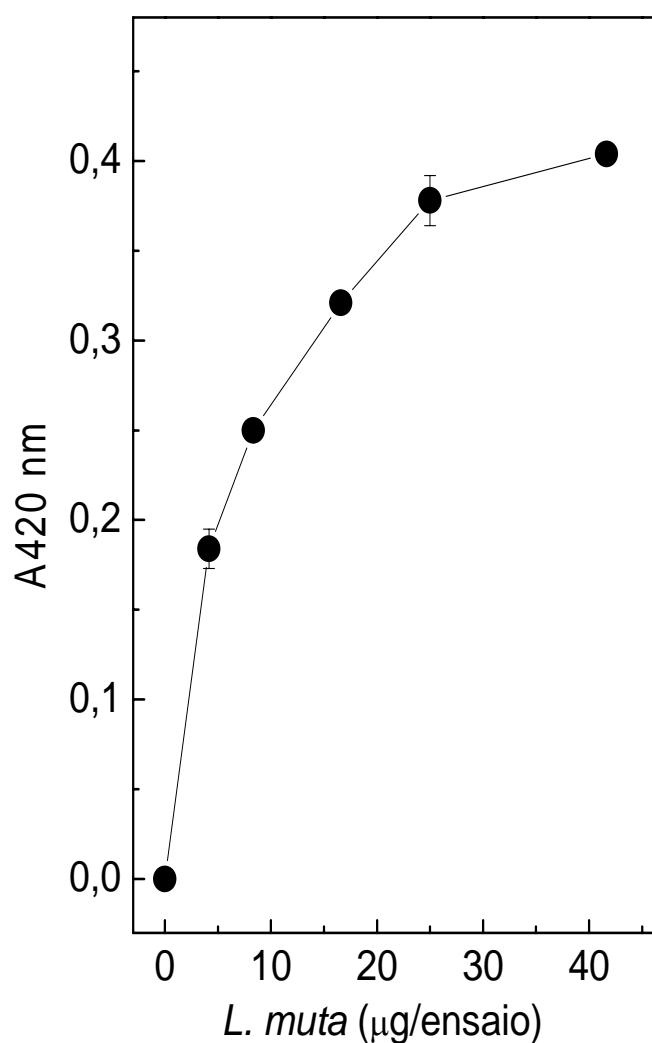


Figura 17. Atividade proteolítica do veneno de *L. muta*. Diferentes concentrações de veneno de *L. muta* (5-45 μg) foram adicionadas no meio de reação e a atividade proteolítica realizada. Resultados expressam a média \pm SD de três experimentos individuais (n= 3).

Como observado na figura 18, os extratos aquosos dos vegetais interferiram na atividade proteolítica do veneno de *L. muta* com percentuais de inibição variados (Figura 18). Apenas os extratos de *M. veluntina* (coluna 2) e *M. glomerata* (coluna 3) não foram capazes de inibir a atividade completamente. Enquanto o extrato de *S. sapindus* (coluna 12) não foi capaz de atuar sobre a atividade proteolítica de *L. muta*. Curiosamente, o extrato de *C. sylvestris* na proporção 1:20 obteve um percentual de inibição menor do que na proporção de 1:10 (Figura 18, coluna 11). Os extratos vegetais quando testados na ausência do veneno de *L.muta* não foram capazes de hidrolisar a azocaseína (dados não mostrados).

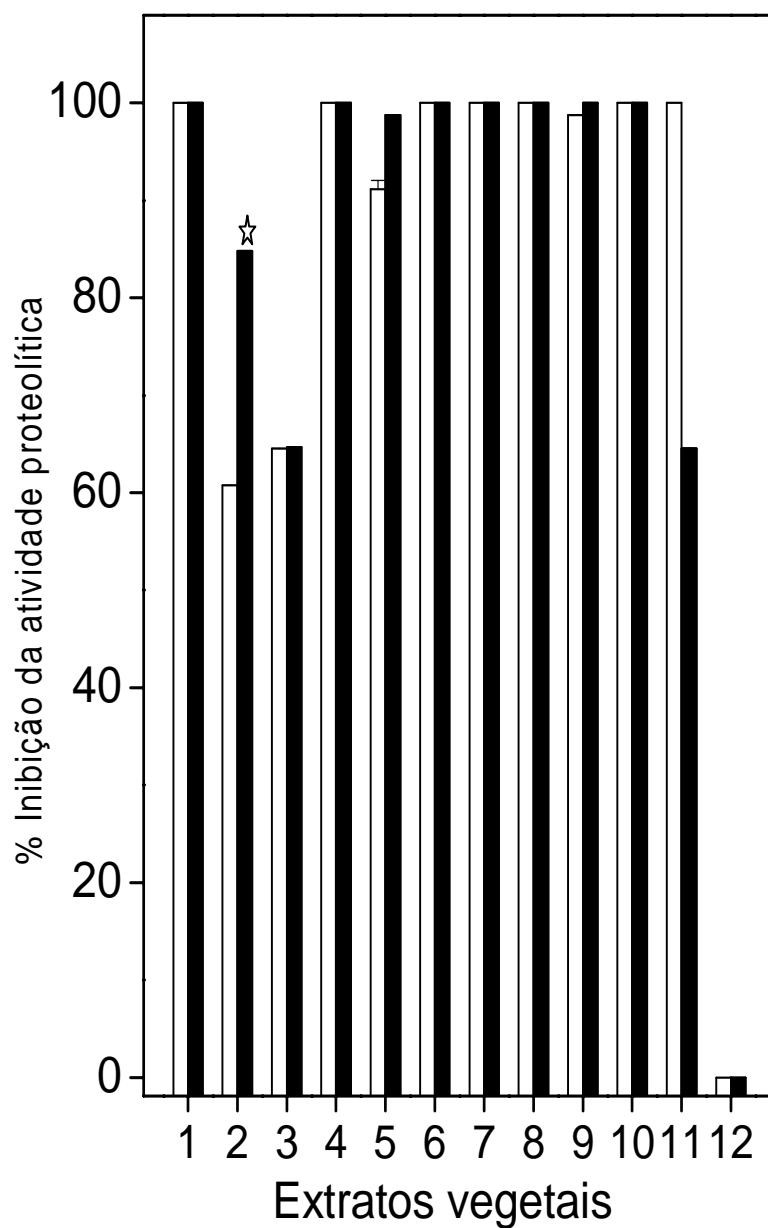


Figura 18. Efeito dos extratos aquosos na atividade proteolítica de *L. muta*. O veneno e os extratos foram preincubados durante 30 minutos a 37°C em diferentes proporções veneno:planta (1:10, coluna branca e 1:20, coluna preta). Coluna 1, *E. Alba*; coluna 2, *M. velluntina*; coluna 3, *M. glomerata*; coluna 4, *J. ellyptica* (xilópodio); coluna 5, *J. ellyptica* (caule); coluna 6, *M. fallax*; coluna 7, *M. albicans*; coluna 8, *M. sellowiana*; coluna 9, *S. barbatiman*; coluna 10, *T. stenocarpa*; coluna 11, *C. sylvestris* e coluna 12, *S. sapindus*. Os resultados expressam a média \pm SD de três experimentos individuais (n= 3), $p < 0,05$ ☆, valores estes comparados com a coluna da proporção 1:10.

4.5. Tratamento térmico do extrato aquoso *S. barbatiman*

Como observado na Figura 18 (coluna 12), o extrato aquoso de *S. barbatiman* inibiu completamente a hemorragia induzida pelo veneno de *L. muta*. Com o objetivo de investigar a natureza química do princípio ativo deste extrato referente a esta proteção, o extrato aquoso foi aquecido durante 30 min. a 80°C (temperatura esta utilizada na síntese de chá) e, em seguida o material utilizado para a atividade hemorrágica, segundo a metodologia descrita anteriormente. De acordo com a Tabela 2, o extrato de *S. barbatiman* que foi submetido ao processo de aquecimento manteve sua capacidade inibitória da hemorragia causada pelo veneno de *L. muta*. Da mesma maneira, o extrato de *S. barbatiman* que não fora submetido ao aquecimento também inibiu a hemorragia causada por *L. muta* (Tabela 2).

Este resultado nos leva a crer que os componentes deste extrato vegetal que foram responsáveis pela inibição das proteínas hemorrágicas (provavelmente metaloproteases) do veneno de *L. muta* são termo estáveis.

Tabela 2: Efeito do tratamento térmico do extrato aquoso na atividade hemorrágica de *L. muta*.

Tratamento	Atividade hemorrágica (%)*
<i>L. muta</i> + Salina ^(a)	100
<i>L. muta</i> + Extrato aquoso ^(b)	0
<i>L. muta</i> + Extrato aquoso ^(c)	0

*O veneno bruto de *L. muta* (10 µg/g) foi préincubado com o extrato aquoso de *S. barbatiman* (100 µg/mL), ou seja, na proporção 1:10 por 30 minutos a 25°C^(b) e a 80°C^(c) e, em seguida a atividade hemorrágica realizada. Em paralelo, *L. muta* foi preincubado nas mesmas condições com salina^(a). Resultados expressam a média ± SD de dois experimentos individuais (n= 4). O halo produzido pela injeção do veneno de *L. muta* (que corresponde a DMH) produziu um halo hemorrágico de cerca de 10 mm e foi designado como 100 % de atividade hemorrágica.

4.6. Comparativo dos efeitos dos extratos vegetais sobre o veneno de *L. muta*

A tabela 3 mostra o percentual de neutralização dos extratos vegetais testados sobre as atividades biológicas do veneno de *L. muta*. Os valores da tabela são referentes aos ensaios biológicos realizados na proporção veneno/planta de 1:10.

Tabela 3: Comparação dos efeitos dos extratos vegetais sobre o veneno de *L. muta*.

Atividades Biológicas (%)*				
Extratos vegetal	Hemólise indireta ^a	Hemorrágica ^b	Coagulação ^c	Proteolítica ^d
<i>E. alba</i>	100	75	100	100
<i>M. velluntina</i>	86,67	80,77	100	60,76
<i>M. glomerata</i>	21,7	0	15	64,56
<i>J. ellyptica</i> (folhas)	44,16	0	20	100
<i>J. ellyptica</i> (entrecasca)	74,47	94,72	18,33	91,14
<i>M. fallax</i>	100	100	33,33	100
<i>M. albicans</i>	75,68	100	0	100
<i>M. selowiana</i>	100	71,16	0	100
<i>S. barbatiman</i>	84,16	100	100	98,74
<i>T. stenoscarpa</i>	100	100	61,66	100
<i>C. sylvestris</i>	10,62	61,54	18,33	100
<i>S. sapindus</i>	0	0	0	0

*Os extratos vegetais foram preincubados com o veneno de *L. muta* na proporção veneno: planta 1:10 e ensaiados para as diferentes atividades biológicas. Os valores representam o percentual de inibição (%) em relação a: quantidade de veneno que foi capaz de hemolisar 100 % da suspensão de hemácias^a (CE); produzir um halo hemorrágico de cerca de 10 mm^b (DMH); coagulação do plasma em 60 segundos^c (DMC); e produz uma variação de 0.2 nm A420^d (CE).

De acordo com os resultados obtidos podemos observar que o extrato aquoso de *S. sapindus* não foi capaz de neutralizar nenhum dos ensaios biológicos elicitados pelo veneno de *L. muta*. Entretanto, os extratos aquosos de *M. glomerata*, *J. ellyptica* (folhas e entrecasca) e *C. sylvestris* apresentaram variação no perfil e no percentual inibitório entre as atividades biológicas avaliadas. Como observado, este perfil inibitório varia de acordo com o ensaio biológico realizado, ou seja, onde para um mesmo extrato vegetal observamos uma variação na capacidade de inibição para as atividades biológicas (Tabela 3). Alguns extratos apresentaram percentual de inibição expressivo (cerca de

100 %) em pelo menos três das atividades biológicas testadas do veneno de *L. muta*, como por exemplo, os extratos de *E. alba*, *M. fallax*, *M. selowiana*, *M. albicans*, *T. stenoscarpa*. Todos os extratos vegetais avaliados interferiram na atividade hemolítica e proteolítica, porém com percentuais diferentes. Em contraste, para a atividade hemorrágica e coagulante, alguns extratos não influenciaram tais efeitos de *L. muta*. Esta observação não se aplica ao extrato de *S. sapindus* (Tabela 3). Ainda de acordo com a tabela 3, somente o extrato de *S. barbatiman* foi capaz de inibir de forma significativa, com percentual acima de 80 % para todas as atividades biológicas testadas.

DISCUSSÃO

O envenenamento ofídico representa um problema grave de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. A administração de antivenenos, baseados em anticorpos heterólogos constitui ainda o único método preconizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento destes acidentes ofídicos (DA SILVA E COL, 2007). Entretanto, a soroterapia possui um custo de produção elevado, além disso, muitas vezes não é capaz de inibir os efeitos biológicos locais produzidos pelo veneno, aumentando assim o surgimento de morbidades como o amputamento de membros, e também podendo causar efeitos colaterais nos pacientes como hipersensibilidade as proteínas heterólogas do antiveneno (choque anafilático), que inclusive pode levar o indivíduo a óbito. Somado a isso, os principais centros produtores estão localizados nos grandes centros, o que dificulta a distribuição para as áreas rurais distantes encarecendo mais ainda o processo.

Dados de literatura mostraram que os antisoros produzidos pelos três centros (Instituto Vital Brazil, Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias) apresentam limitações na neutralização das atividades hemorrágica e miotóxica do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* (DA SILVA E COL, 2007). Além desta baixa proteção, a dose utilizada regularmente na clínica não reverteu e/ou impediu a ação miotóxica do veneno destas serpentes (DA SILVA E COL, 2007). Este trabalho demonstrou claramente, que o efeito protetor pode variar de acordo com o centro produtor. Necessitando assim, de uma padronização no método de produção e nos testes de potência para os antisoros, feito por tais centros produtores de antisoros. É sabido que a proteção dada pelos antisoros está relacionada à antigenicidade das proteínas presentes nos venenos. Com isso, as atividades biológicas que não são

inibidas de forma eficaz se devem ao fato destas enzimas não induzem antagonicamente a produção de anticorpos suficientes para neutralizá-las.

Desta forma, a procura por inibidores ofídicos de origem vegetal e/ou sintética torna-se importante a fim de complementar à tradicional soroterapia, particularmente contra os efeitos locais do envenenamento, que contribuem para o aumento no índice de morbidades (DA SILVA E COL, 2005; OLIVEIRA E COL., 2005; BIONDO E COL., 2003). As plantas medicinais constituíram durante muito tempo a base da terapêutica de vários povos indígenas e orientais e, atualmente, cerca de 25% dos medicamentos usados na alopatia e homeopatia são de origem vegetal; enquanto 50% são de origem sintética. Estes efeitos estão relacionados aos princípios ativos isolados de plantas medicinais. A utilização crescente de plantas se deve, em parte, a grande variabilidade de espécies de plantas existentes (250-500 mil) na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas e farmacológicas (TEKLEHAYMANOT, 2009; SAMY E COL, 2008).

Alguns autores já demonstraram diversas propriedades de alguns extratos vegetais como antiinflamatório (MURARI E COL., 2005; BORGI E COL., 2007), anticoncepcional (ASONGALEM, 2008), analgésico (BORGI E COL., 2007), antibactericida, neuroprotetor (CHUN E COL, 2008), anticancerígeno (THOLE E COL., 2006), antiofídico (BIONDO E COL., 2003; DA SILVA e col., 2005; OLIVEIRA E COL., 2005; MARIANO E COL., 2005; BIONDO E COL., 2004), dentre diversas outras propriedades. A Organização Mundial da Saúde já enfatizou a utilização e desenvolvimento de drogas a partir de plantas em benefício da saúde mundial, em termos de custo e efeitos colaterais (WHO, 2002).

O uso de plantas para neutralizar os efeitos biológicos de acidentes ofídicos é amplamente utilizado por habitantes de regiões distantes e periféricas, onde a soroterapia torna-se de difícil acesso, como na Amazônia. A população local utiliza o extrato macerado das plantas sobre o local da picada (DA SILVA E COL, 2005) e/ou através de chás. É importante relevar o fato de não terem sido encontrados na literatura dados revelando potencial antiofídico de extratos aquosos sobre as atividades biológicas do veneno de *L. muta*, como mostra a presente dissertação, apesar do elevado índice de óbitos decorrente do acidente laquétrico. Entretanto, várias serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* foram exploradas quanto ao potencial antiofídico de extratos vegetais.

Mariano e colaboradores (2005) avaliaram o extrato aquoso da raiz, caule e folhas de *Mikania glomerata* contra os efeitos tóxicos de *C. d. terrificus*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu*. O extrato testado foi capaz de inibir a atividade PLA₂ e edematogênica induzida pelo veneno de *C. d. terrificus*. Em paralelo, o efeito hemorrágico do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* fora também inibido com a utilização desta planta, bem como a atividade coagulante. Estes resultados corroboram parcialmente com o nosso trabalho, onde o extrato da raiz de *M. glomerata* foi capaz de inibir parcialmente a coagulação, a hemólise indireta e a atividade proteolítica do veneno de *L. muta*. Embora, para a atividade hemorrágica nenhuma proteção fora observada.

Biondo e colaboradores (2003) testaram o extrato aquoso de *M. veluntina* contra alguns efeitos tóxicos do veneno das serpentes *C. d. terrificus* e novamente do gênero *Bothrops*. O extrato demonstrou efeito inibitório nas

atividades fofolipásica e hemorrágica, uma parcial inibição da atividade proteolítica; mas não sobre a atividade fibrinolítica. Em contrapartida, em nosso trabalho a mesma planta inibiu a atividade coagulante de *L. muta* e obteve parcial inibição das atividades hemolítica, hemorrágica e proteolítica.

Em nosso trabalho o extrato aquoso de *C. sylvestris* obteve inibição parcial sobre a hemólise indireta, coagulação e hemorragia, porém inibição completa sobre a atividade proteolítica. Quando utilizamos a proporção veneno/planta 1:20, a inibição da atividade hemolítica foi cerca de 60 %, valor este, que se aproxima de dados da literatura para veneno de serpentes de outros gêneros (BORGES E COL., 2000). Este trabalho demonstrou que *C. sylvestris* foi capaz de inibir a enzima PLA₂ das serpentes *C. d. terrificus* (75,7 %), *B. moojeni* (76,5%) e *B. jararacussu* (62,5%).

Estes trabalhos surgem mostrando os extratos vegetais são capazes de neutralizar os efeitos biológicos do envenenamento ofídico por diferentes gêneros, porém este mecanismo de ação antiofídico ainda permanece obscuro. Sabemos que metaloproteases e fosfolipases são importantes no envenenamento e necessitam de íons divalentes para sua ação, como zinco e cálcio, respectivamente. Sendo assim, é sugerido que extratos vegetais possam se ligar a estes íons, causando a inibição destas enzimas (DA SILVA E COL., 2005).

A fim de verificar características importantes dos componentes presentes no extrato vegetal essencial para a neutralização dos efeitos biológicos do veneno de *L. muta*, o extrato de *S. barbatiman* foi aquecido. Contudo, apesar do tratamento verificamos ainda uma inibição da hemorragia causada por *L. muta* neste extrato submetido a altas temperaturas. Por isso,

podemos inferir que o(s) componente(s) desta planta com propriedade antiofídica não seja de natureza protéica. Este resultado corrobora com dados de literatura que mostram que princípios ativos presentes em plantas capazes de neutralizar as enzimas do veneno são geralmente de natureza não-protéica, como xantonas, isoflavonas, pterocarpanos (REYES-CHILPA E COL., 1994; DE ARAÚJO E COL., 2009; MARANGONI E COL., 2009).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a eficácia de alguns extratos aquosos em neutralizar as atividades biológicas de *L. muta*. Esses resultados vão de acordo com dados de literatura. Contudo, ressaltamos que o extrato da planta *S. barbatiman* foi capaz de inibir todas as atividades biológicas de *L. muta* testadas. Outros extratos também se destacam como *T. stenoscarpa*, *M. velluntina* e *E. alba* por neutralizarem a maioria das atividades biológicas testadas. Alguns extratos foram capazes de inibir alguma ou nenhuma atividade, como mostra a tabela 3. A parte do vegetal também influencia a eficácia em neutralizar o veneno de *L. muta*, como pode ser observado para o extrato *J. ellyptica*. A parte folha deste extrato não protege camundongos do efeito hemorrágico, enquanto o tratamento com a parte entrecasca foi capaz de protegê-los. Sendo assim, para diferentes partes do vegetal *J. ellyptica*, observamos diferenças significativas na eficácia de suas propriedades antiofídicas. Entretanto, se compararmos o gênero *Miconia* nenhuma diferença significativa fora observada para as espécies *M. albicans* e *M. selowiana*.

Apesar da capacidade observada neste trabalho de alguns extratos vegetais na neutralizarem as atividades hemorrágica, coagulante, hemolítica e proteolítica do veneno de *L. muta*, sabe-se que este veneno apresenta outras

atividades biológicas (miotóxica, edematogênica, letã, dentre outras), que devem ser ainda exploradas e observadas a eficácia desta neutralização. Estes dados em conjunto mostram e revelam a possibilidade de desenvolvimento de um antisoro levando-se em consideração o potencial da flora brasileira. Este procedimento poderia resultar na diminuição do número de óbitos e, principalmente na morbidade que o acidente ofídico pode gerar. Este sinergismo de ações (antisoro juntamente com extratos vegetais) poderia acelerar a recuperação do paciente diminuindo os custos desta internação hospitalar. Em paralelo, poderíamos especular que os extratos vegetais poderiam ser utilizados em diversas patologias onde enzimas do tipo fosfolipase A₂, hemorraginas ou outras proteases estão envolvidas, como processos inflamatórios, doenças musculares, cardíacas e/ou distúrbios de coagulação e agregação plaquetária. Desta forma as plantas poderiam ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de moléculas com potencial antiofídico.

Para tanto, devemos levar em consideração e atentar para o fato de que a composição dos venenos de serpentes é influenciada por diferentes fatores inerentes as próprias serpentes (sexo, idade, local, estação do ano) bem como as substâncias que as plantas produzem que da mesma forma podem sofrer influências similares. Este conjunto de fatores pode de alguma forma interferir na capacidade neutralizante dos extratos vegetais, ou seja, nas suas propriedades antiofídicas.

CONCLUSÕES

- A preincubação dos extratos vegetais com o veneno bruto de *L. muta* resultou na neutralização de diferentes atividades biológicas deste veneno incluindo as atividades hemorrágica, coagulante, hemolítica e proteolítica do veneno de *L. muta*

- A neutralização das atividades biológicas de *L. muta* pelos extratos vegetais ocorreu com percentuais diferenciados, revelando diferentes perfis do potencial antiofídico;

- O extrato vegetal *S. barbatiman* foi o único que neutralizou todas as atividades biológicas de *L. muta* avaliadas em contraste ao extrato de *S. sapindus* que foi o único incapaz de neutralizar qualquer atividade analisada.

- Os resultados da neutralização utilizando os extratos vegetais sugerem que a utilização dos antisoros em conjunto com extratos vegetais poderia aumentar a eficácia na neutralização dos efeitos dos venenos de serpentes;

- Estudos posteriores a fim de identificar e isolar os componentes dos extratos vegetais responsáveis por estes efeitos neutralizantes nas atividades biológicas do veneno de *L. muta*, deveram ser realizados a fim de compreender melhor o mecanismo de ação destes extratos sobre as proteínas tóxicas do veneno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUI, SF; MARCUSSI, S; URZÊDA MÁRCIO A; SILVEIRA, LB; FERNANDES, VC; COELHO, MFB; PEREIRA, AMS; FRANÇA, SC; SOARES, AM (2003). Atividade antiofídica de extratos de *Jatropha elliptica*. In: VI JOFAERP - *Jornada Farmacêutica da UNAERP*.

ANDRADE E SILVA, ML; CUNHA, WR; PEDRO, C; APARECIDA GARCIA, P; MARTINS, C (2002). Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extract of *Miconia fallax*. *Boll. Chim. Farm.*, 141(2): 158-160.

ARAUJO, MS; MARTINS, M (2007). The defensive strike of five species of lanceheads of the genus *Bothrops* (Viperiadae). *Braz. J. Biol.*, 67(2): 327-332.

ARITA, H; HANASAKI, K; NAKAMO, T; OKA, S; TERAOKA, H; MATSUMOTO, K (1991). Novel proliferative effect of phospholipase A₂ in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *J. Biol. Chem.*, 266, 139-141.

ASONGALEM, EA; NANA, P; FOYET, HS; DIMO, T; KAMTCHOUING, P (2008). Antifertility and fetotoxic activities of *Acanthus montanus* aqueous extract in Wistar rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 30(7): 521-528.

BANJI, O; BANJI, D; ANNAMALAI, AR; MANAVALAN, R (2007). Investigation on the effect of *Eclipta alba* on animal models of learning and memory. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 51(3): 274-278.

BAPNA, S; ADSULE, S; SHIRSHAT MAHENDRA, S; JADHAV, S; PATIL, LS; DESHMUKH, RA (2007). Anti-malarial activity of *Eclipta alba* against *Plasmodium berghei* infection in mice. *J. Commun. Dis.*, 39(2): 91-94.

BETONI, JE; MANTOVANI, RP; BARBOSA, LN; DI STASI, LC; FERNANDES JUNIOR, A (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(4): 387-390.

BIONDO, R; PEREIRA, AM; MARCUSSI, S; PEREIRA, PS; FRANÇA, SC; SOARES, AM (2003). Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Biochimie*, 85(10): 1017-1025.

BIONDO, R; SOARES, AM; BERTONI BW FRANÇA, SC; PEREIRA, AM (2004). Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Plant Cell Rep.*, 22(8): 549-552.

BJARNASON, JB; FOX, JW (1995). Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. *Methods in Enzymology*, 248: 345-368.

BORGES, MH; SOARES, AM; RODRIGUES, VM; ANDRIÃO-ESCARSO, SH; HAMAGUCHI, A; QUINTERO, A; LIZANO S., GUTIÉRREZ, JM; GIGLIO, JR; HOMSI-BRANDEBURG, MIO (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comp. Biochem. Physiol.*, 27: 21–31.

BORGI, W; GHEDIRA, K; CHOUCANE, N (2007). Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. *Fitoterapia*, 78(1): 16-19.

BRAZIL, V (1903). Contribuição ao estudo do veneno ophidico. V. Tratamento das mordeduras das cobras. *Ver Med. São Paulo*, 4(6): 265-278.

CARDOSO, JLC (2003). Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica. *São Paulo: Sarvier*.

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

CHIPPAUX, JP; GOYFFON, M (1998). Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, 36: 823-846

CHUN, HS; KIM, JM; CHOI, EH; CHANG, N (2008). Neuroprotective effects of several Korean medicinal plants traditionally used for stroke remedy. *J. Med. Food*, 11(2): 246-251.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M; SILVA, MG; ANDRÉO-FILHO, N; GERENUTTI, M; CINTRA, AC; GIGLIO, JR; LEITE, GB; CRUZ-HÖFLING, MA; RODRIGUES-SIMIONI, L; OSHIMA-FRANCO, Y (2008). Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. *Phytother. Res.*, 22(6): 784-790.

CHRISTYBAPITA D, DIVYAGNANESWARI M, MICHAEL RD. (2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23(4): 840-852.

CUNHA, WR; MARTINS, C; DA SILVA FERREIRA, D; CROTTI, AE; LOPES, NP; ALBUQUERQUE, S (2003). In vitro trypanocidal activity of triterpenes from miconia species. *Planta Med.*, 69(5): 470-472.

DA SILVA, NJ; AIRD, SD; SEEBART, C; KAISER II (1989). A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon*, 27: 763-771.

DA SILVA, SL; CALGAROTTO, AK; MASO, V; DAMICO, DC; BALDASSO, P; VEBER, CL; VILLAR, JÁ; OLIVEIRA, AR; COMAR, JR; OLIVEIRA, KM; MARANGONI, S (2009). Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. *Eur. J. of Med. Chem.*, 44: 312-321.

DE FÁTIMA A, MODOLO LV, SANCHES AC, PORTO RR. (2008). Wound healing agents: the role of natural and non-natural products in drug development. *Mini Rev. Med. Chem.*, 8(9): 879-888.

DE LIMA, MR; DE SOUZA LUNA, J; DOS SANTOS, AF; DE ANDRADE, MC; SANT'ANA, AE; GENET, JP; MARQUEZ, B; NEUVILLE, L; MOREAU, N (2006). Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.*, 105(1-2): 137-147.

DE PAULA, RC; CASTRO, HC; RODRIGUES, CR; MELO, PA; FULY, AL. (2009). Structural and pharmacological features of phospholipases A₂ from snake venoms. *Prot. Pep. Lett.*, 16(8): 899-907.

DENNIS, EA (1997). The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.*, 22(1): 1-2.

DIOGO LC, FERNANDES RS, MARCUSSI S, MENALDO DL, ROBERTO PG, MATRANGULO PV, PEREIRA PS, FRANÇA SC, GIULIATTI S, SOARES AM, LOURENÇO MV (2009). Inhibition of snake venoms and phospholipases A₂ by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 104(4): 293-299.

DOS SANTOS, SC; KRUEGER, CL; STEIL, AA; KREUGER, MR; BIAVATTI, MW; WISNIEWSKI JUNIOR, A (2006). Characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. *Planta Med.*, 72(8): 679-684.

DUARTE, MC; FIGUEIRA, GM; SARTORATTO, A; REHDER, VL; DELARMELINA, C (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 97(2): 305-311.

FLETCHER, JE; JIANG, MS (1998). Lys-49 phospholipase A₂ myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. *Toxicon*, 36(11): 1549-1555.

FRY, MR; GHOSH, SS; EAST, JM; FRNCSON, RC (1992). Role of human sperm phospholipase A₂ in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A₂ activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol. Reprod.*, 47: 751-759.

FULY, AL; DE MIRANDA, ALP; ZINGALI, RB; GUIMARÃES, JA (2002). Purification and characterization of phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.*, 63(9):1589-1597.

FULY, AL; FRANCISCHETTI, IM; ZINGALI, RB; CARLINI, CR (1993). Partial purification and some physicochemical properties of phospholipase A₂ from the venom of bushmaster snake (*Lachesis muta*). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 26(5): 459-463.

FULY, AL; MACHADO, OL; ALVES, EW, CARLINI; CR (1997) Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(5): 1372-1380.

GARCIA, ES; GUIMARÃES, JA; PRADO, JL (1978) Purification and characterization of a sulfhydryl-dependent protease from *Rhodnius prolixus* midgut. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 188(2): 315-322.

GRAHAM, RLJ; GRAHAM, C; THEAKSON, D; MCMULLAN, G; SHAW, C (2008). Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography. *Toxicon*, 51(1):121-129.

HAAD, JS (1980). Accidentes humanos por las serpientes de los generos Bothrops y Lachesis. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45: 403.

HIDER, R.C., KARLSON, E., NAMIRANIAN, S. (1991) Separation and purification of toxins from snake venoms. *Snake Toxins*, 1-34.

HOGUE, AR; ROMANO-HOGUE, SARWL (1978) Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil (2. Ed.). *Mem. Inst. Butantan*, 42: 373-499.

HUANG, HC; TSAI, WJ; LIAW, CC; WU, SH; WU, YC; KUO, YH (2007). Anti-platelet aggregation triterpene saponins from the galls of *Sapindus mukorossi*. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 55(9): 1412-1415.

HUANG, TF; OUYANG, C (1984). Action mechanism of the potent platelet aggregation inhibitor from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Thromb. Res.*, 33(2): 125-138.

IBRAHIM, M; KHAJA, MN; AARA, A; KHAN, AA; HABEEB, MA; DEVI, YP; NARASU, ML; HABIBULLAH, CM (2006). Antimicrobial activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H pylori*: In vitro and in vivo studies. *World J. Gastroenterol.*, 12(44): 7136-7142.

JOCIVANIA O. DA SILVA; JULIANA S. COPPEDE; VANESSA C. FERNANDES; CAROLINA D. SANT'ANA; FABIO K. TICLI; MAURÍCIO V. MAZZI; JOSÉ R. GIGLIO; PAULO S. PEREIRA; ANDREIMAR M. SOARES; SUELY V. SAMPAIO (2005). Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *J. of Ethnopharmacol.*, 100: 145–152.

JUNQUEIRA DE AZEVEDO, IL; HO, PL (2002). Survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pit viper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene*, 299: 279-291.

FOX JW, SERRANO SM. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.*, 275(12): 3016-3030.

KINI, RM; EVANS HJ (1990). Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon*, 28(12): 1387-1422.

KOH, DC; ARMUGAN, A; JEYASEELAN, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol. Life Science*, 63(24): 3030-3041.

KONDO, H; KONDO, S; IKEZAWA, H; MURATA, R; OHSAKA, A (1960). Studies on the quantitative methods for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese J. of Medi. Sci. & Biol.*, 13: 43-51.

KUDO, I; MURAKAMI, M; HARA, S; INOUE, K (1983). Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochim. Biophys. Acta*, 177: 217-231.

LI, Q; COLDBERG, TR; OWNBY, CL (1993). Purification and characterization of two high molecular weight hemorrhagic toxins from *Crotalus viridis* venom using monoclonal antibodies. *Toxicon*, 31(6): 711-722.

LOBO, OJ; BANJI, D; ANNAMALAI, AR; MANAVALAN, R (2008). Evaluation of antiaggressive activity of *Eclipta alba* in experimental animals. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 21(2): 195-199.

MAGALHAES, A; FERREIRA, RN; RICHARDSON, M; GONTIJO, S; YARLEQUE, A; MAGALHAES, HP; BLOCH, C; SANCHEZ, EF (2003). Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Biol.*, 136(2): 255-266.

MARCUSSI, S; SANTANA, CD; OLIVEIRA, CZ; RUEDA, AQ; MENALDO, DL; BELEBONI, RO; STABELI, RG; GIGLIO, JR; FONTES, MRM; SOARES, AM (2007). Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potencial. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7: 122-130.

MARIANO, VA; SILVANA, M; MARISTELA, AFD; CLAYTON, ZO; LUCÉLIO, BC; ODAIR, AG; SUZELEI, CF; ANDREIMAR MS; PAULO, SP (2005). Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J. of Ethnopharmacol.*, 102: 364–370.

MARKLAND, FS (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 36(12): 1749-1800.

MARSH, NA; WILLINAS, V (2005) Pratical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, 45(8): 339-410.

MARTZ, W (1992). Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, 30(10): 1131-1142.

MATTOS, WM; CAMPOS, MM; FERNANDES, ES; RICHETTI, GP; NIERO, R; YUNES, RA; CALIXTO, JB (2006). Anti-edematogenic effects of velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*: evidence for a selective inhibition of kinin B1 receptor-mediated responses. *Regul. Pept.*, 136(1-3): 98-104.

MELO, PA; NASCIMENTO, MC; MORS, WB; SUAREZ-KURTZ, G (1994). Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* extracts and constituents. *Toxicon*, 32(5): 595-603.

MENEZES, PR; SCHWARZ, EA; SANTOS, CA (2004). In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. *Fitoterapia*, 75(3-4): 398-400.

MESQUITA, ML; DESRIVOT, J; BORIES, C; FOURNET, A; PAULA, JE; GRELLIER, P; ESPINDOLA, LS (2005). Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(7): 783-787.

MIRANDA, JP; RICCI-LOBÃO, A (2003). Anilius scytale (Red Pipesnake) Predation. *Herpetological Review (USA)*, 34(2): 146-147

MORAES RM, DELITTI WB, MORAES JA. (2003). Gas exchange, growth, and chemical parameters in a native Atlantic forest tree species in polluted areas of Cubatão, Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 54(3): 339-345.

MORS, WB (1991). Plants against snake-bites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2: 193.

MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE) /FUNASA (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE) (2001). Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. *Brasília: MS/FUNASA*

MURARI, SK; FREY, FJ; FREY, BM; GOWDA, TV; VISHWANA,TH BS (2005). Use of *Pavo cristatus* feather extract for the better management of snakebites: neutralization of inflammatory reactions. *J. Ethnopharmacol.*, 99(2): 229-237.

NAKAJAMA, M; HANASAKI, K; UEDA, M; ARITA, H (1992). Effect of pancreatic type phospholipase A₂ on isolates porcine cerebral arteries via its specific binding sites. *Febs Lett.*, 309: 261-264.

NISHIJIMA CM, RODRIGUES CM, SILVA MA, LOPES-FERREIRA M, VILEGAS W, HIRUMA-LIMA CA (2009). Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. *Molecules.* 14(3): 1072-1080.

NOELSON MV DA SILVA, EMERSON Z.ARRUDA, YUGO L.B. MURAKAMI, RAPHAEL A.M. MORAES, CAMILA Z. EL-KIK, MARCELO A. TOMAZ, FABRÍCIO F.A. FERNANDES, CLAYTON Z. OLIVEIRA, ANDREIMAR M. SOARES, JOSE R. GIGLIO, PAULO A. MELO (2007). Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snakevenoms in a mouse model. *Toxicon*, 50(2): 196-205.

OLIVEIRA, CZ; MAIORANO, VA; MARCUSSI, S; SANT'ANA, CD; JANUÁRIO, AH; LOURENÇO, MV; SAMPAIO, SV; FRANÇA, SC; PEREIRA, PS; SOARES, AM (2005). Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J. Ethnopharmacol.*, 98(1-2): 213-216.

OLIVEIRA, RB; RIBEIRO, LA; JORGE, MT (2003). Risk factors associated with coagulation abnormalities in Bothrops envenoming. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(6): 657-663.

PEREIRA, NA; RUPPELT PEREIRA, BM; DO NASCIMENTO, MC PARENTE, JB; MORS, WB (1984). Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake antidotes. *Planta Medica*, 60: 99-100.

PINHO, FM; PEREIRA, ID (2001). Ofidismo. *Rev. Ass. Méd. Brasil*, 47(1): 24-29.

RANGINENI, V; SHARADA, D; SAXENA, S (2007). Diuretic, hypotensive, and hypocholesterolemic effects of *Eclipta alba* in mild hypertensive subjects: a pilot study. *J. Med. Food*, 10(1): 143-148.

RASLAN, DS; JAMAL, CM; DUARTE, DS; BORGES, MH; DE LIMA, ME (2002). Anti-PLA₂ action test of *Casearia sylvestris* Sw. *Boll. Chim. Farm.*, 141(6): 457-460.

REICHER F, LEITNER SC, SIERAKOWSKI MR, FONTANA JD, CORREA JB. (1992). Properties of the seed gum of *Strypnodendron barbatiman* (barbatimao). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 34-35: 349-357.

RENATA M. DE ARAÚJO, MARY ANNE S. LIMA AND EDILBERTO R. SILVEIRA (2009). Pterocarpan and a Novel Flavanone from *Harpalyce brasiliiana* roots. *J. Braz. Chem. Soc.*, 00: 1-4.

REYES-CHILPA, R; GÓMEZ-GARIBAY, F; QUIJANO, L; MAGOS-GUERRERO, GA; RÍOS, T (1994). Preliminary results on the protective effect of edunol, a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (Leguminosae), against *Bothrops atrox* venom in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 42(3): 199-203.

RIZZINI, CT; MORS, WB; PEREIRA, NA (1988). Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente venenos de cobras. *Ver. Brás. Farm.*, 69: 82-86.

RUOSLAHTI, E; PIERSCHBACHER, MD (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrines. *Science*, 238 (4826): 491-497.

RUPPELT, BM; PEREIRA, EF; GONÇALVES, LC; PEREIRA, NA (1991). Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom-I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86: 203-205.

SAMY, RP; PUSHPARAJ, PN; GOPALAKRISHNAKONE, P (2008). A compilation of Bioactive Compounds from Ayurveda. *Bioinformation.*, 3(3): 100-110.

SANCHEZ, EF; MAGALHÃES, A; DINIZ, CR (1987). Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of the buscmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon*, 25(6): 611-619.

SERRANO, SMT; MAROUN, RC (2005) Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45(8): 1115-1132.

SILVA, AJM; COELHO, AL; SIMAS, ABC; MORAES, RAM; PINHEIRO, DA; FERNANDES, FFA; ARRUDA, EM; COSTA, PRR; MELO, PA (2004) Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpans against snake venom. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 431-435.

SILVA, LM; DINIZ, CR; MAGALHÃES, A (1985). Purification and partial characterization of an arginine ester hydrolase from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon*, 23(4): 707-718.

SIX, DA; DENNIS, EA (2000). Effect of oil extracted from some medicinal plants on diferent mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1669-1675.

SOARES DE MOURA, R; COSTA, SS; JANSEN, JM; SILVA, CA; LOPES, CS; BERNARDO-FILHO, M; NASCIMENTO DA SILVA, V; CRIDDLE, DN; PORTELA, BN; RUBENICH, LM; ARAUJO, RG; CARVALHO, LC (2002). Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54(2): 249-256.

SOMMERS, CD; BOBBIT, JL; BEMIS, KG; SNYDER, DW (1992). Porcine pancreatic phospholipase A₂ induced contractions of guinea pig lung pleural strips. *Eur. J. Pharmacol.*, 216: 87-96.

STRUCHINER, CJ; BOCHNER, R (2002). Recording of venomous bites and stings by National Information Systems in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 18(3): 735-146.

TEKLEHAYMANOT, T (2009). Ethnobotanical study of knowledge and medicinal plants use by the people in Dek Island in Ethiopia. *J. Ethnopharmacol.*, 11.

THOLE, JM; KRAFT, TF; SUEIRO, LA; KANG, YH; GILLS, JJ; CUENDET, M; PEZZUTO, JM; SEIGLER, DS; LILA, MA (2006). A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *J. Med. Food*, 9(4): 498-504.

TSUZUKI, JK; SVIDZINSKI, TI; SHINOBU, CS; SILVA, LF; RODRIGUES-FILHO, E; CORTEZ, DA; FERREIRA, IC (2007). Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 79(4): 577-583.

VADAS, P; BROWNING, J; EDELSON, J; PRUZANSKI, W (1993). Extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: the relationship with associated diseases states. *J. Lipid. Mediat.*, 8: 1-30.

VADAS, P; PRUZANSKI, W (1986). Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.*, 55: 391-404.

VASCONCELOS, MA; ROYO, VA; FERREIRA, DS; CROTTI, AE; ANDRADE E SILVA, ML; CARVALHO, JC; BASTOS, JK; CUNHA, WR (2006). In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Z Naturforsch C*, 61(7-8): 477-482.

WEN, FH (2003). Soroterapia. In animais peçonhentos do Brasil. (1 ed). São Paulo: Sarvier. 380-393.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998). Quality control methods for medicinal plants materials. Geneva: WHO Library Cataloguing in Publication Data.

YARLEQUE, A; CMPOS, C; ESCOBAR, E; LAZO, F; SANCHEZ, N; NYSLOP, S; MASH, NA; BUTTERWORTH, PJ; PRICE, RG (1989). Isolation and characterization of a fibrinogen clotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). *Toxicon*, 27(11): 1189-1197.

ANEXO

Manuscrito publicado no periódico "*Protein Peptide Letters*", 16(8): 899-907, 2009.

**STRUCTURAL AND PHARMACOLOGICAL FEATURES OF
PHOSPHOLIPASES A₂ FROM SNAKE VENOMS**

Rafael Cisne de Paula¹, Helena Carla Castro¹, Carlos Rangel Rodrigues²,
Paulo Assis Melo³, André Lopes Fuly^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia,
Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; ²Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, ModMolQSAR, Rio de Janeiro, RJ,
³Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Manuscrito em preparação

ANTIOPHIDIAN PROPERTIES OF PLANT EXTRACTS AGAINST *Lachesis muta* VENOM

Rafael C. de Paula¹, Eládio F. Sanchez², Tássia R. Costa³, Andreimar M. Soares³, Paulo S. Pereira⁴, Miriam V. Lourenço⁴ and André L. Fuly¹

¹Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, ²Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil; ³DACTB, FCFRP-USP, .

⁴Biotechnology, UNAERP