

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PRÓ-REITORIA ACADÊMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Juliana de Oliveira Soares Silva

Atividade farmacológica de frações de diferentes polaridades de
Casearia gossypiosperma Briquet contra o bloqueio neuromuscular
induzido pelos venenos ofídicos (cascavel e jararacuçu)

Sorocaba/SP

2012

Juliana de Oliveira Soares Silva

Atividade farmacológica de frações de diferentes polaridades de *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos ofídicos (cascavel e jararacuçu)

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Sorocaba/SP

2012

Ficha Catalográfica

Silva, Juliana de Oliveira Soares

S58a Atividade farmacológica de frações de diferentes polaridades de *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos ofídicos (cascavel e jararacuçu) /Juliana de Oliveira Soares Silva. – Sorocaba, SP, 2012.

71 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yoko Oshima Franco

Juliana de Oliveira Soares Silva

Atividade farmacológica de frações de diferentes polaridades de *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos ofídicos (cascavel e jararacuçu)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 22 / 05 / 2012

BANCA EXAMINADORA:

Ass.: _____

Pres.: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco - UNISO

Ass.: _____

1º Exam.: Profa. Dra. Priscila Randazzo Moura – PUC

Ass.: _____

2º Exam.: Prof. Dr. Alexandre D. Martins Cavagis - UFSCAR

*Dedico esse trabalho aos meus
grandes amores, Vera e Gílmar, pelo
apoio e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por estar sempre à frente dos meus planos, permitindo que minha caminhada seja desfrutada sempre da melhor forma possível.

Aos meus amados pais, Gilmar e Vera, por terem me dado uma excelente educação, e por saberem apoiar minhas decisões com dedicação, carinho e paciência, incentivando-me a seguir meus sonhos e dando suporte para que eles se realizassem. Obrigada por tudo, sem vocês eu não teria chegado aonde cheguei.

Ao meu irmão, Gilmar Junior, pela participação constante e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Odirlei Mizael, meu porto seguro e tão presente em todos os momentos.

À Universidade de Sorocaba por ter concedido minha bolsa de estudos e por oferecer suas instalações para o desenvolvimento do trabalho.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, por primeiramente ter acreditado na minha capacidade de aprendizado, por todos os ensinamentos, dedicação e carinho, sempre.

À Profa. Dra. Renata Vasques da Silva Tavares, por ter contribuído para minha formação e por colaborar na parte Fitoquímica do trabalho, sempre com muita atenção.

Ao professor Dr. Marcos Moisés Gonçalves por ter me incentivado a iniciar mais uma etapa de meus estudos.

Aos professores Dr. José Carlos Cogo (Univap) e Dra. Maysa Furlan (Unesp); e colaboradores Dr. Nivaldo Boralle (Unesp) e Dra. Vânia Ap^a de Freitas Formeton Macedo dos Santos (Unesp) pela ajuda indispensável no desenvolvimento do trabalho.

À Valéria de Campos Orsi, farmacêutica responsável pelos laboratórios de Saúde da Uniso, que colaborou permitindo a flexibilidade dos meus horários para o cumprimento das disciplinas do Mestrado.

Aos meus amigos Jhones Luiz de Oliveira e Natália Trabuco, pelo companheirismo, dedicação e grande ajuda no decorrer do trabalho.

À minha amiga Milena Franco que sempre esteve presente durante essa jornada, acreditando e admirando o meu trabalho.

À minha amiga Miriéle, por todos os momentos compartilhados, por estar comigo no mundo da pesquisa, me dando força e me apoiando nos momentos alegres e também nos mais difíceis que felizmente o Mestrado nos proporcionou.

A todo corpo docente presente nas bancas de qualificação e defesa, pela colaboração indispensável, professores doutores Priscila Randazzo Moura (Puc), Helena Onishi Ferraz (Uniso), Marli Gerenutti (Uniso), Alexandre Donizeti Martins Cavagis (Ufscar) e Camila Augusta de Oliveira Martins Arakaki (Uniso).

Muito obrigada àqueles que estiveram presentes de alguma forma nessa fase da minha vida, por possibilitarem que essa experiência enriquecedora e gratificante fosse da maior importância para meu crescimento pessoal e profissional.

“Somos todos aprendizes duma arte que
nunca ninguém se torna mestre”.

Ernest Hemingway (1899 – 1961)

RESUMO

Estudos prévios mostraram que o extrato seco de folhas de *Casearia gossypiosperma* Briquet (*C. gossypiosperma*), popularmente conhecida como pau-de-espeto, impediu o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (*B. jararacussu*), agregando valor medicinal à espécie. Os objetivos desta pesquisa foram testar o extrato liofilizado de *C. gossypiosperma* contra o veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. terrificus*) e fracionar o extrato seco a fim de isolar/identificar compostos das frações ativas contra os venenos ofídicos de cascavel e jararacuçu (estudo biomonitorado). Para tanto, foi obtido um extrato seco das folhas desta espécie que, em seguida, foi fracionado por partição líquido-líquido utilizando-se solventes de diferentes polaridades (hexano, FHEX; diclorometano, FDM; acetato de etila, FAET; e metanol, FMET). Métodos cromatográficos (em coluna, CC; em camada delgada comparativa, CCDC; e em camada delgada preparativa; CCDP) foram empregados até a obtenção de compostos puros, que foram submetidos à técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C). O extrato liofilizado (50 $\mu\text{g/mL}$) não impediu o efeito neurobloqueador do veneno de *C. d. terrificus* (10 $\mu\text{g/mL}$, $n=10$), diferentemente da fração hexânica liofilizada, que protegeu parcialmente contra a paralisia induzida pelo veneno de *C. d. terrificus* (10 $\mu\text{g/mL}$; $48,3 \pm 10,8\%$, $n=10$), no tempo de 120 minutos ($p<0,05$). Já as demais frações liofilizadas FDM, FAET e FMET (25 $\mu\text{g/mL}$, cada), não demonstraram efeito protetor estatisticamente significativo contra o veneno ($p>0,05$). Nos ensaios farmacológicos para a neutralização do veneno de *B. jararacussu* (40 $\mu\text{g/mL}$), ficou evidenciada a proteção da fração hexânica liofilizada (10 $\mu\text{g/mL}$) no tempo de 120 minutos, em $94,8 \pm 2,6\%$ ($n=5$), assim como as demais frações liofilizadas FDM, FAET e FMET, que demonstraram proteções significativas ($p<0,05$), em $60,9 \pm 8,7\%$ ($n=6$), $44,7 \pm 9,1\%$ ($n=7$) e $38,6 \pm 5,0\%$ ($n=5$), respectivamente, aos 120 minutos. Em virtude de a fração hexânica ter sido a que demonstrou melhor atividade contra os venenos estudados, esta foi subfracionada por cromatografias em coluna e em camada delgada preparativa. Dentre as subfrações obtidas neste processo, duas foram submetidas à espectrometria de RMN ^1H , sendo uma delas caracterizada como uma

mistura de terpenos e a outra, mais purificada, submetida para a obtenção de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) bidimensionais, mas cuja massa não foi suficiente para a elucidação da estrutura química. Avaliando os resultados em conjunto é possível concluir que a fração hexânica foi a principal responsável em proteger contra o bloqueio neuromuscular induzido por ambos os venenos ofídicos estudados.

Palavras-Chave: *Bothrops jararacussu*, *Casearia gossypiosperma* Briquet, *Crotalus durissus terrificus*, Fitoquímicos, Neurofarmacologia.

ABSTRACT

Previous studies showed that the dried extract of leaves of *Casearia gossypiosperma* Briquet (*C. gossypiosperma*), popularly known as “pau-de-espeto”, prevented the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom (*B. jararacussu*), attributing a pharmacological activity to the species. The objectives were to test the lyophilized extract of *C. gossypiosperma* against the gross venom of *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. terrificus*) and fractionate the dried extract to isolate/identify compounds of the active fractions against the venoms of “cascavel” and “jararacuçu” (bioassay studies). To that end, a dried extract was obtained from the leaves of this species. It was then fractionated by liquid-liquid partition using solvents of different polarities (hexane, FHEX; dichloromethane, FDM; ethyl acetate, FAET; and methanol, FMET). Chromatographic methods (column, CC; comparative thin layer, CTL; and preparative thin layer, PTL) were used to obtain pure compounds, which underwent the technique of hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR). Lyophilized extract (50 $\mu\text{g/mL}$) did not prevent the neuroblocking effect of the venom of *C. d. terrificus* (10 $\mu\text{g/mL}$, $n=10$), differently from the lyophilized hexane fraction, which partially protected against the paralysis induced by the *C. d. terrificus* venom (10 $\mu\text{g/mL}$; $48.3 \pm 10.8\%$, $n=10$), in time of 120 minutes ($p<0.05$). The other lyophilized fractions FDM, FAET and FMET (25 $\mu\text{g/mL}$ each), showed no protective action, statistically meaningful, against the venom ($p>0.05$). In the pharmacological tests for the neutralization of *B. jararacussu* venom (40 $\mu\text{g/mL}$), it was emphasized the protection of the lyophilized hexane fraction (10 $\mu\text{g/mL}$) in the time of 120 minutes, at $94.8 \pm 2.6\%$ ($n=5$), serving as a protection against blockade induced by the venom at the neuromuscular junction; as well as the other lyophilized fractions FDM, FAET and FMET demonstrated meaningful protections ($p<0.05$), but partial, at $60.9 \pm 8.7\%$ ($n=6$), $44.7 \pm 9.1\%$ ($n=7$) and $38.6 \pm 5.0\%$ ($n=5$), respectively, in 120 minutes. As the hexane fraction demonstrated the best activity against the venoms studied, it was subfractionated by column chromatography and preparative thin layer. Among the subfractions obtained in this process, two were subjected to ^1H NMR spectroscopy; one of which was characterized as a mixture of terpenes and the other one, more purified, was

submitted to two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR), but the mass was not sufficient to elucidate the chemical structure. Evaluating the results together, it is possible to conclude that the hexane fraction was the mainly responsible for protecting against the neuromuscular blockade induced by both snake venoms studied.

Key-words: *Bothrops jararacussu*, *Casearia gossypiosperma* Briquet, *Crotalus durissus terrificus*, Phytochemical, Neuropharmacology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Bothrops jararacussu</i>	21
Figura 2.	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	23
Figura 3.	<i>Casearia gossypiosperma</i> Briquet.....	27
Figura 4.	Esquema da retirada da preparação nervo frênico-diafragma.	33
Figura 5.	Fluxograma da metodologia empregada.	36
Figura 6.	Registro miográfico da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (controle Tyrode), sob estímulo indireto.....	38
Figura 7.	Registro miográfico de preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (Cdt), sob estímulo indireto.	39
Figura 8.	Registro miográfico de preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (Cdt + Extrato), sob estímulo indireto.....	39
Figura 9.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Cdt + Extrato), sob estímulo indireto.	40
Figura 10.	Registro miográfico de preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (Bjssu), sob estímulo indireto.....	41
Figura 11.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas), sob estímulo indireto.	42
Figura 12.	Registros miográficos de preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Bjssu), sob estímulo indireto.	43
Figura 13.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Bjssu), sob estímulo indireto.	44
Figura 14.	Registros miográficos de preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Cdt), sob estímulo indireto.....	45
Figura 15.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Cdt), sob estímulo indireto.	46

Figura 16.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (FHEX + Bjssu e Cdt), sob estímulo indireto.	47
Figura 17.	Esquema dos resultados farmacológicos.	48
Figura 18.	Cromatografia em camada delgada comparativa das frações obtidas por meio da purificação da fração hexânica.....	49
Figura 19.	Esquema da cromatografia em camada delgada preparativa da Fração 1.	50
Figura 20.	Cromatografia e Espectro de RMN ^1H da subfração F_{1-7}	51
Figura 21.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (F_{1-5} + Bjssu), sob estímulo indireto.....	52
Figura 22.	Cromatografia e Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C da subfração $F_{1-5\text{ D}}$	53
Figura 23.	Espectro de HMQC da subfração $F_{1-5\text{ D}}$	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Massa obtida das frações orgânicas a partir da partição líquido/líquido.	37
Tabela 2.	Concentração das frações do extrato que demonstrou menor interferência na resposta contrátil, comparada com a solução de controle Tyrode.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cg	<i>Casearia gossypiosperma</i> Briquet
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Bjssu	<i>Bothrops jararacussu</i>
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAET	Fração acetato de etila
FDM	Fração diclorometânica
FHEX	Fração hexânica
FMET	Fração metanólica
n	Número de experimentos
NFD	Nervo frênico-diafragma
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
F₁₋₇	Subfração 7 da fração hexânica
F₁₋₅	Subfração 5 da fração hexânica
F_{1-5 D}	Subfração D da fração subfração 5 da fração hexânica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	O acidente ofídico	18
1.1.1	Gênero <i>Bothrops</i>	20
1.1.2	Gênero <i>Crotalus</i>	22
1.2.	Plantas medicinais	24
1.2.1.	<i>Casearia gossypiosperma</i> Briquet.....	26
2.	OBJETIVOS	28
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1.	Material Vegetal	29
3.1.1.	Obtenção do extrato hidroalcoólico da <i>Casearia gossypiosperma</i> Briquet	29
3.1.2.	Obtenção do extrato seco da <i>Casearia gossypiosperma</i> Briquet	30
3.1.3.	Obtenção das frações hexano (FHEX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAET) e metanol (FMET) por Partição Líquido-Líquido.....	30
3.2.	Estudo Farmacológico da <i>Casearia gossypiosperma</i> Briquet.....	31
3.2.1.	Animais.....	31
3.2.2.	Venenos	31
3.2.3.	Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongos	32
3.3.	Análise Estatística.....	34
3.4.	Métodos cromatográficos.....	34
3.4.1.	Cromatografia em Coluna (CC)	34

3.4.2.	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	34
3.4.3.	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)	35
3.5.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	35
4.	RESULTADOS	37
4.1.	Material Vegetal	37
4.1.1.	Rendimento do extrato hidroalcoólico	37
4.1.2.	Frações FHEX, FDM, FAET e FMET	37
4.2.	Estudo Farmacológico da <i>Casearia gossypiosperma</i>	38
4.3.	Métodos cromatográficos	48
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO A	70
	ANEXO B	71

1. INTRODUÇÃO

O desmatamento e o aumento da população humana (especialmente em áreas tropicais e subtropicais, onde a maioria das serpentes habita) favorecem o aumento da ocorrência de acidentes ofídicos, o que constitui um problema de saúde pública (CHIPPAUX, 1998). Em que pese o tratamento específico ser a soroterapia, eficaz contra o efeito letal, dependendo do gênero da serpente ela pode ter apenas uma ação limitada contra o efeito local induzido pelos constituintes do veneno, principalmente aqueles com elevada ação proteolítica. (BRASIL, 2001)

O uso de extratos vegetais e compostos quimicamente isolados como antídotos para o veneno de serpente é uma prática comum em locais onde o acesso imediato à soroterapia não acontece, e também como um adjuvante, complementar à soroterapia convencional (SOARES et al., 2005). Assim, é função da pesquisa investigar e comprovar cientificamente se uma planta é realmente dotada de propriedade medicinal, como por exemplo, a antiofídica.

1.1. O acidente ofídico

A gravidade do acidente ofídico depende do tipo do gênero à qual pertence a serpente peçonhenta, em questão. As serpentes habitam determinados ambientes e grande parte dos óbitos ocorridos é proveniente da falta do antiveneno específico, pelo retardo na sua administração ou pelo uso incorreto. Nestes casos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a parte da população mais atingida é constituída predominantemente por agricultores adultos e suas crianças, que trabalham em comunidades rurais pobres de países em desenvolvimento na África, Ásia, América Latina e Oceania. (WHO, 2007)

O envenenamento por animais peçonhentos tem recebido pequena atenção das autoridades da saúde, da indústria farmacêutica e mesmo das agências de fomento nas diversas partes do mundo. Entretanto, a partir da inclusão do ofidismo como doença negligenciada (WHO, 2007), os programas de saúde instituídos pelas autoridades, por entidades produtoras de antivenenos e por grupos de pesquisa,

foram motivados para a busca de soluções para essa temática. O ofidismo constitui caso de doença ambiental e ocupacional, e merece maior atenção por parte das autoridades nacionais e regionais do setor de saúde. (GUTIÉRREZ et al., 2010)

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas registrou, em 2009, que a segunda principal causa de intoxicações em humanos foi o envenenamento por animais peçonhentos, sendo que as estatísticas apontam um percentual de 24,88%, perdendo apenas para as intoxicações provocadas por medicamentos, com percentual de 26,04% dos 106.928 casos registrados. (SINITOX, 2009)

No período compreendido entre 1990 e 1993, foram notificados 65.911 acidentes ofídicos no Brasil, uma média de 21.970 acidentes por ano, sendo que 90,5% ocorreram com as serpentes do gênero *Bothrops* e 7,7% com o gênero *Crotalus*, seguido do gênero *Lachesis* (1,4%) e *Micrurus* (0,6%), popularmente conhecidas como jararacuçu, cascavel, surucucu e coral, respectivamente. (BRASIL, 2001)

O número de notificações dos acidentes ofídicos no Brasil vem aumentando, sendo que em 2010 foram notificados 29.635 acidentes causados por serpentes, dentre os quais 85% por serpentes peçonhentas, 4% por serpentes não peçonhentas e 11% por serpentes não identificadas, instituindo uma incidência de 15,5 casos/100.000 habitantes. Dos casos identificados, o acidente botrópico foi o responsável pela maior incidência, com 72,5% dos acidentes ofídicos. (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010)

Os venenos de serpentes são misturas complexas contendo mais de 20 componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que cerca de 90% são proteínas enzimáticas ou não enzimáticas, como as fosfolipases, metaloproteases hemorrágicas e outras enzimas, além de carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (DEUTSCH; DINIZ, 1955; BJARNASON; FOX, 1988). Enquanto os componentes inorgânicos mais comuns são Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn, sendo que alguns exercem função de mantenedores de estabilidade estrutural de certas proteínas, como as metaloproteinases, que são fatores hemorrágicos, outros funcionam como catalisadores em funções enzimáticas específicas. (FRIEDERICH; TU, 1971; BJARNASON; FOX, 1988)

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são um importante grupo de enzimas presentes na maioria dos venenos e secreções orais entre todas as famílias de serpentes (TU, 1977; HARRIS, 1997), responsáveis por produzir os efeitos neurotóxicos, miotóxicos, cardiotoxicos, agregante plaquetário, hemolítico, bloqueio da transmissão neuromuscular, anticoagulante e edematogênico (LOMONTE et al., 1994). Apesar de algumas PLA₂ não demonstrarem qualquer atividade tóxica, outras podem atuar como um dos componentes mais tóxicos dos venenos. (KINI; EVANS, 1989)

Muitos venenos de serpentes possuem componentes que causam sérios distúrbios hemostáticos, atuando em diversos pontos da cascata de coagulação (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003), conduzindo sempre a duas situações: coagulação e anticoagulação. Qualquer que seja o mecanismo, as manifestações no organismo são a incoagulabilidade devida à coagulopatia por consumo do fibrinogênio, que ocasiona desfibrinogenação, e ação anticoagulante, por inativar ou lisar os fatores de coagulação. (KAMIGUTI; SANO-MARTINS, 1995)

As serpentes podem ser classificadas como venenosas ou peçonhentas. As serpentes venenosas apresentam glândulas salivares que podem secretar ou não toxinas, mas são desprovidas de estruturas especializadas para a inoculação destas substâncias. As serpentes chamadas peçonhentas apresentam uma glândula salivar modificada e dentes especializados para a inoculação de suas substâncias tóxicas. (FRYE, 1991)

1.1.1 Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* inclui a jararaca, urutu, caiçara, cotiara, jararacuçu e jararaca pintada, nomes populares (BRASIL, 2001; PINHO e PEREIRA, 2001). A *Bothrops jararacussu* (Figura 1) é uma serpente peçonhenta e uma das mais de 30 espécies do gênero *Bothrops*, pertencente à família Viperidae, as quais são distribuídas por todo território nacional. Os machos da espécie *Bothrops jararacussu* variam de 40 centímetros até 1,8 metros e a fêmea pode chegar até 2,20 metros. Apresentam cabeça triangular, fosseta loreal, cauda lisa e presa inoculadora de

veneno. Esta serpente habita principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo locais úmidos e com proliferação de roedores; tem hábito predominantemente noturno ou crepuscular, podendo apresentar comportamento agressivo quando ameaçada, desferindo botes sem produzir ruídos (BRASIL, 2001; PINHO e PEREIRA, 2001). São encontradas frequentemente no norte da Argentina, leste do Paraguai e sul do Brasil embora distribuídas em todo o território nacional, principalmente em Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Espírito Santo, sul da Bahia e São Paulo. (BRAZIL, 1903; BRASIL, 2001)

Figura 1. *Bothrops jararacussu*.



Fonte: Photographers Direct. Disponível em:

<http://www.photographersdirect.com/buyers/stockphoto.asp?imageid=1070792>.

Acesso em: 20 mar. 2012.

O veneno da *B. jararacussu* tem sido estudado desde 1900 e esta serpente é a responsável por produzir a maior quantidade de veneno dentre as serpentes de seu gênero (MELGAREJO, 2003). É possível obter-se cerca de 2 mL por extração, o que em média significa 400 mg de veneno seco (BELLUOMINI, 1964). Este veneno possui propriedades miotóxicas e neurotóxicas *in vitro* (HOMSI-BRANDEBURGO et

al., 1988; HELUANY et al., 1992; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1995). A neurotoxicidade *in vitro* foi avaliada pela capacidade do veneno da *B. jararacussu* causar bloqueio neuromuscular (RODRIGUES-SIMIONI; BORGES; CECCARELLI, 1983). A miotoxicidade é uma ação específica do veneno sobre o músculo esquelético, causado por substâncias denominadas miotoxinas que levam à degeneração e morte celular (mionecrose). Essa ação direta diferencia as miotoxinas de outros componentes tóxicos, como as hemorraginas, que podem, indiretamente, destruir o músculo esquelético e outros tecidos. (MEBS; OWNBY, 1990)

Nos acidentes botrópicos observam-se extensas hemorragias que podem ocasionar a morte (MOURA-DA-SILVA et al., 1991). A área mais afetada é o local onde ocorre a picada, ocasionando distúrbios da coagulação, hemorragias (NAHAS; KAMIGUTI; BARROS, 1979; HOFMANN; BON, 1987), edema, necrose local (HOMMA; TU, 1971) e efeitos sistêmicos, como insuficiência renal (PINHO; VIDAL; BURDMANN, 2000). As infecções causadas por diversos tipos de bactéria podem agravar ainda mais os sintomas do envenenamento. (JORGE; RIBEIRO, 1997)

Os efeitos manifestados são atribuídos a uma mistura complexa de substâncias, entre elas as proteases, fosfolipases A₂, metaloproteases, miotoxinas, neurotoxinas e vários outros componentes. (JIA et al., 1966; BORGES et al., 2000)

1.1.2 Gênero *Crotalus*

As espécies do gênero *Crotalus* são popularmente conhecidas como cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, entre outras. São serpentes robustas, ágeis e de hábitos terrestres. Não têm por hábito atacar e, quando excitadas são facilmente identificadas por apresentarem na extremidade caudal um guizo ou chocalho. (BRASIL, 2001; MELGAREJO, 2003)

No Brasil, o gênero é representado por uma única espécie, *Crotalus durissus*, que apresenta uma vasta distribuição geográfica, encontrada desde os cerrados do Brasil central, até as regiões áridas e semiáridas do Nordeste, seguindo pelo extremo Sul e Norte do país. Dentro dessa espécie, subdividem-se cinco

subespécies: a *Crotalus durissus terrificus* (Figura 2), predominante das regiões Sudeste e Sul, sendo a principal responsável pelos acidentes notificados no país; a *Crotalus durissus collilineatus*, comum na região centro-oeste, se estendendo até o estado de Rondônia; a *Crotalus durissus cascavella*, a cascavel nordestina, e as menos conhecidas, tais como a *Crotalus durissus ruruima* e a *Crotalus durissus marajoensis*, restritas às regiões das savanas do Estado de Roraima e da Ilha de Marajó, respectivamente. (MELGAREJO, 2003)

Figura 2. *Crotalus durissus terrificus*.



Fonte: <http://br.olhares.com/crotalus_durissus_terrificus_foto190267.html>

Acesso em: 20 mar. 2012.

O quadro do envenenamento humano causado pelas serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) caracteriza-se por manifestações sistêmicas, decorrentes da ação neurotóxica do veneno, tais como: ptose palpebral, paralisia flácida dos músculos esqueléticos e diminuição da motricidade ocular e acuidade visual (ROSENFELD, 1971). Ainda decorrente da atividade neurotóxica do veneno, pode ser observado quadro de insuficiência respiratória, uma manifestação importante presente em casos graves (AMARAL; MAGALHÃES; REZENDE, 1991). Além disso, devido à atividade miotóxica do veneno de Cdt, os pacientes apresentam quadro de rabdomiólise generalizada e consequente mioglobínúria (AZEVEDO-MARQUES;

HERING; CUPO, 1987; MAGALHÃES et al., 1986; SANTORO et al., 1999). Esses efeitos, associados a outros fatores como desidratação e hipotensão, podem provocar insuficiência renal aguda com comprometimento de néfrons, (AMORIM et al., 1969), principal causa de óbito por esses envenenamentos. (AMARAL et al., 1986)

Os efeitos causados pelo veneno da *Crotalus durissus terrificus* devem-se a uma variedade de toxinas, incluindo a convulxina (PRADO-FRANCESCHI; VITAL BRAZIL, 1981), crotamina (GONÇALVES; VIEIRA, 1950; BARRIO, 1954), crotoxina (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938), giroxina (BARRIO, 1961), bem como várias enzimas comuns a outros venenos de serpentes. O veneno crotálico tem três ações principais, neurotóxica, miotóxica e coagulante (BRASIL, 2001), sendo que ele também pode ocasionar lesões renais (AMORIM; MELLO; SALIBA, 1969) e lesões hepáticas. (FRANÇA et al., 2009)

1.2. Plantas medicinais

As informações sobre o uso das plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram acumuladas durante séculos e muito desse conhecimento empírico se encontra disponível atualmente. De domínio público, o conhecimento sobre as plantas medicinais representou (e ainda representa) o único recurso terapêutico para muitas comunidades economicamente carentes e grupos étnicos. Essa prática, que se caracteriza pela utilização dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças, é tão antiga quanto à espécie humana, principalmente às pessoas socioeconomicamente desafiadas em áreas tropicais. (DI STASI, 1996; LÓPEZ, 2006; MOLANDER et al., 2012)

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, taninos, e outros, quanto a possíveis efeitos benéficos, tem sido objeto de incessantes estudos, visto que muitos desses constituintes têm grande possibilidade de futuramente virem a ser aprovados como agentes medicinais, (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998), com isso tais espécies têm grande potencial para serem preservadas.

O Brasil tem a maior biodiversidade do planeta com cerca de 60 mil espécies de plantas superiores conhecidas, as classificadas como Angiospermas. A maioria é usada pelo ser humano como fonte de alimento, como medicamentos para cura de enfermidades ou no uso como aromatizantes. O conhecimento tradicional de grupos sociais que fazem uso das plantas é a fonte essencial para incentivar a pesquisa na descoberta dos princípios ativos, substâncias naturais capazes de exercer uma ação benéfica sobre as doenças (IBAMA, 2001). O que ajuda também nesta exploração é o baixo custo financeiro, comparado às substâncias obtidas por síntese química, que são, em geral, mais caras. (TOLEDO et al., 2003)

O estudo fitoquímico tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES et al., 2004). Os compostos de origem vegetal são agrupados em: metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídios; e metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, alcaloides, entre outros. (LÓPEZ, 2006)

Esses metabólitos secundários são realmente muito importantes nos aspectos funcionais da vida vegetal e incluem papéis estruturais em apoio a diferentes tecidos de proteção, envolvimento em estratégias de defesa, e propriedades de sinalização, em especial, nas interações entre as plantas e seu ambiente. (ALAIN-MICHEL, 2007)

Muitas plantas registradas como antiveneno de serpente no uso popular podem exibir propriedade antidotal devida à presença de grande número de compostos ativos (SOARES et al., 2005), como exemplos, a *Casearia sylvestris*, que passou a ser estudada devido ao uso na medicina popular (RUPPELT et al., 1991; CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008a) e a *Dipteryx alata* Vogel (NAZATO et al., 2010) com seus constituintes fenólicos e flavonóides presentes no extrato metanólico ou de taninos presentes em seu extrato bruto. Ambas as plantas foram capazes de impedir o efeito bloqueador do veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu). A espécie *Mikania laevigata* possui atividade contra o veneno bruto de *Philodryas olfersii*. (COLLAÇO et al., 2010)

O extrato aquoso de *Mikania glomerata* demonstrou atividade contra a ação coagulante do veneno de *Crotalus* e atividade contra o efeito hemorrágico do veneno de *Bothrops*, provavelmente pela presença de cumarina, que inibiu os efeitos da fosfolipases, metaloproteinases e serinoproteinases presentes na composição desses venenos. (MAIORANO et al., 2005)

1.2.1. *Casearia gossypiosperma* Briquet

A *Casearia gossypiosperma* Briquet (Figura 3) despertou interesse em seu estudo após a publicação de Camargo et al. (2010), que revelaram que o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno bruto da *Bothrops jararacussu* foi inibido pelo seu extrato hidroalcoólico, sugerindo a presença de compostos capazes de reduzir a neurotoxicidade *in vitro* e, supostamente, a inibição da ação miotóxica do veneno. É uma espécie pertencente ao gênero *Casearia*, família Salicaceae, hierarquia taxonômica das Angiospermas (MARQUETE; TORRES; MEDEIROS, 2012). É originária da América tropical, sendo encontrada desde o México até a Argentina e, no Brasil, é muito comum no cerrado paulista. A planta é nativa do Brasil, popularmente conhecida como pau-de-espeto, cambroé ou espeteiro. Na fase adulta, a árvore possui, em média, de 10 a 40 metros de altura (LEITÃO FILHO, 1992), apresenta tronco retilíneo, folhas membranáceas e glabras; a floração ocorre de setembro a outubro e os frutos de outubro a novembro. (LORENZI, 2000)

Figura 3. *Casearia gossypiosperma* Briquet.



Fonte: Atlas Ambiental da Bacia do Rio Corumbataí.

Disponível em: <http://ceapla2.rc.unesp.br/atlas/esp_casea.php>. Acesso em: 20 mar. 2012.

Esta planta típica do cerrado brasileiro é muitas vezes confundida com outras plantas de mesmo gênero, como a *Casearia sylvestris* Sw, popularmente conhecida como guaçatonga, a qual pesquisas já demonstraram ser uma planta medicinal usada popularmente como antisséptico, anestésico tópico, antiúlcera, etc. (SILVA et al., 2006; VIEIRA JR et al., 2009). A capacidade antiofídica da *Casearia sylvestris* Sw. contra as atividades hemorrágicas, miotóxicas, neurotóxicas *in vitro* (BORGES et al., 2000; OSHIMA-FRANCO et al., 2005) de venenos ofídicos, bem como a sua ação inibitória da atividade fosfolipase A₂ (BORGES et al., 2000) despertaram o interesse em continuar o estudo sobre a espécie *Casearia gossypiosperma* Briquet.

Até o momento não se tem relatos na literatura sobre estudo da atividade antiofídica das frações da espécie vegetal *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o efeito neurobloqueador *in vitro* induzido pelos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*, o que ratifica a originalidade do estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Avaliar a atividade farmacológica de frações de diferentes polaridades de *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*.

2.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Obter o extrato seco e o extrato liofilizado de *C. gossypiosperma*.
- ✓ Obter frações de diferentes polaridades a partir do extrato bruto de *C. gossypiosperma*.
- ✓ Avaliar a atividade farmacológica do extrato liofilizado de *C. gossypiosperma* contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
- ✓ Avaliar a atividade farmacológica das frações de diferentes polaridades de *C. gossypiosperma* contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) e *Bothrops jararacussu* (Bjssu).
- ✓ Identificar frações e substâncias da espécie vegetal da *C. gossypiosperma* que apresentam atividades protetoras contra as ações biológicas induzidas pelos venenos ofídicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

O pó das folhas da árvore adulta da espécie *Casearia gossypiosperma* Briquet (Cg) foi doado pela ESALQ - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, Brasil, em janeiro de 2006. Essa espécie foi identificada em 1988 por Catharino, E. L. M., e está depositada no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), sob o número IAC 38115.

3.1.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico da *Casearia gossypiosperma* Briquet

O extrato hidroalcoólico foi obtido através do processo de maceração do pó da droga com o auxílio do banho ultrassônico (Unique[®]), com uma massa inicial de 1.700 g e empregando-se, como líquido extrator, álcool etílico comercial (Mega[®]) a 70%. Para tanto, a massa foi dividida em quatro frascos âmbar (4 L de capacidade) e, primeiramente entumecidas com 1,5 L de etanol 70% por 4 dias. Diariamente, os frascos foram colocados no banho ultrassônico, sem aquecimento, por 20 minutos. Após esse período, antes da retirada do extrato hidroalcoólico, os frascos foram submetidos ao banho ultrassônico e o líquido sobrenadante (extrato hidroalcoólico) foi extraído com pipeta volumétrica de 50 mL.

Após a primeira retirada do sobrenadante, o pó da droga entumecido era completado diariamente com aproximadamente 1,5 L de etanol 70% cada frasco, colocado no banho ultrassônico durante 20 minutos, sem aquecimento e, após 24 horas de descanso, antes da retirada do extrato, os frascos eram submetidos novamente no banho ultrassônico por 20 minutos. A extração foi realizada sucessivamente, e na forma descrita, até o clareamento do extrato.

3.1.2. Obtenção do extrato seco da *Casearia gossypiosperma* Briquet

A redução do volume do extrato hidroalcoólico obtido foi feita com o auxílio do rotaevaporador (Büchi®).

Parte do extrato seco que foi separado para os ensaios farmacológicos foi submetida ao liofilizador (Thermo Electron®), para garantir a evaporação de todo etanol.

Já a maior massa utilizada no fracionamento foi submetida à evaporação na capela, subdividida em travessas de vidro, sendo que a evaporação total do etanol ocorreu com o auxílio da exaustão da capela por aproximadamente 10 dias.

3.1.3. Obtenção das frações hexano (FHEX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAET) e metanol (FMET) por Partição Líquido-Líquido

As frações de diferentes polaridades da *C. gossypiosperma* foram obtidas pelo processo de partição líquido-líquido.

Toda massa do extrato seco obtida foi solubilizada, com aproximadamente, 200 mL de mistura metanol:água (80:20). Em seguida, o produto dessa dissolução foi transferido para um funil de separação de 1 L e, então, os solventes orgânicos imiscíveis de polaridades crescentes: hexano (2 L, Chemco®), diclorometano (2 L, Ecibra®) e acetato de etila (2 L, Chemco®) foram passados.

As frações FHEX, FAET, FDM e FMET foram concentradas no rotaevaporador (Büchi®). Parte de todas as frações que foram utilizadas nos ensaios farmacológicos foi liofilizada.

3.2. Estudo Farmacológico da *Casearia gossypiosperma* Briquet

3.2.1. Animais

Os camundongos (machos Swiss, com idade de 8 semanas e peso de, aproximadamente, 20-25 gramas, obtidos da Anilab, Paulínia, SP), foram ambientados no Biotério de Farmacologia da Universidade de Sorocaba, recebendo ração industrial (Labina[®]), adquirida de fornecedor qualificado (Pet Shop Canino's), e água *ad libitum*, em ambiente padronizado, com condições controladas: temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e umidade ($45 \pm 15\%$). Foram alocados 04 camundongos por gaiola (microambiente livre de contaminação externa (Sistema Smaflex[®]), com exaustão apropriada e ventilação individual diretamente no interior da gaiola). A maravalha utilizada como cama para os camundongos estava livre de substâncias químicas, sendo a madeira macia e absorvente. As gaiolas foram devidamente protegidas da ação direta da luz (lâmpadas frias), com ciclos de 12h/12h de luz e escuridão.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (CEP/UNIVAP), protocolos nº A001/CEUA/2011 (Anexo A) nº A002/CEUA/2011 (Anexo B).

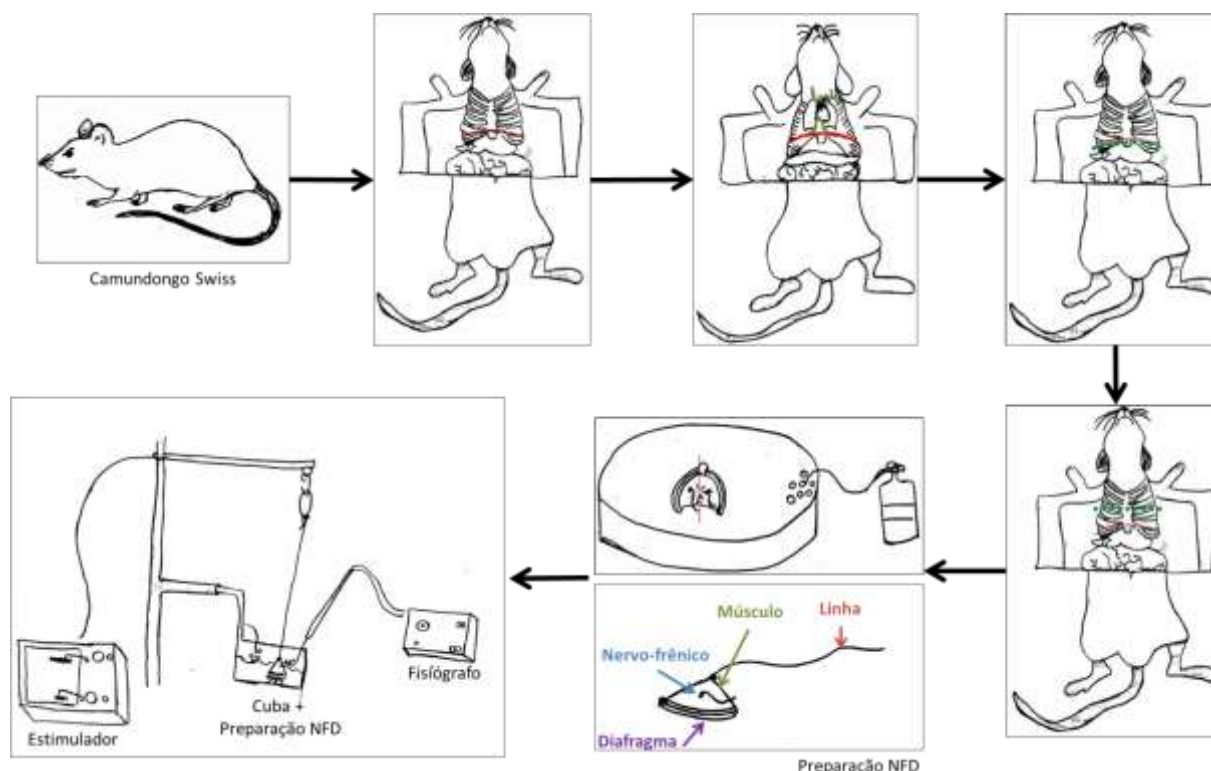
3.2.2. Venenos

Os venenos brutos de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) e *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), provenientes do Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) – Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D) – Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, foram doados e certificados pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo, da UNIVAP, São José dos Campos, SP.

3.2.3. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongos

Os camundongos foram anestesiados com halotano, por via inalatória. O halotano induz uma anestesia rápida e é o anestésico inalante mais eficiente. A eutanásia ocorreu pela secção e sangria dos vasos cervicais. Em seguida, a preparação nervo frênico-diafragma (Figura 4) foi cuidadosamente retirada conforme o protocolo (BÜLBRING, 1946), modificado para camundongos, colocada em cuba contendo 5 mL de solução de Tyrode (solução nutritiva: pH 7,0; composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e Glicose 11,1) e, logo após, presa através dos músculos da costela por ganchos existentes na base da cuba. Para cada preparação retirada, foi possível a realização de dois experimentos, ou seja, n=2. A temperatura da cuba com a solução nutritiva e a preparação foi mantida a 37 °C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). O registro da força de contração muscular foi obtido através do transdutor isométrico cat. 7003, acoplado a um fisiógrafo 2-Channel Recorder Gemini cat. 7070, contendo amplificadores Basic Preamplifiers cat. 7080 (Ugo Basile®). O músculo foi submetido à tensão constante de 5 g/cm e a estimulação indireta (nervo frênico), gerada por estimulador ESF-15D, de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência.

Figura 4. Esquema da retirada da preparação nervo frênico-diafragma.



Fonte: Rita de Cássia Collaço, adaptado.

Após 15 a 20 minutos de estabilização da preparação, foram realizados os protocolos farmacológicos. Como controle, utilizou-se a solução nutritiva de Tyrode.

Os ensaios com o extrato liofilizado da Cg foram realizados na concentração de 50 µg/mL, a qual não provoca alteração na resposta basal, conforme descrito por Camargo et al. (2010).

Para definir a concentração das frações liofilizadas (FHEX, FDM, FAET e FMET), foram testadas diferentes concentrações, partindo do referencial 50 µg/mL e testando as de 10 µg/mL, 25 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL.

Nos ensaios farmacológicos aqui denominados de neutralização, os venenos brutos de Bjssu e Cdt, nas concentrações de 40 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente, foram previamente incubados com as concentrações eleitas da planta (extrato ou frações liofilizadas) por 30 minutos, antes da adição ao banho contendo a preparação.

Tanto o extrato liofilizado como as frações liofilizadas da Cg foram solubilizados com 30 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, F. Maia[®]) em todos os ensaios farmacológicos, antes de se completar o volume desejado com solução Tyrode. DMSO na concentração utilizada não apresenta interferência na resposta basal da preparação. (CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008b)

3.3. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não pareado *t*-Student, com valor $p < 0,05$, considerado significativo.

3.4. Métodos cromatográficos

3.4.1. Cromatografia em Coluna (CC)

A cromatografia em coluna foi realizada com sílica gel 60 (0,040 mm – 0,063 mm) para cromatografia em coluna (Merck[®]), em sistema gradiente de solventes (hexano:acetato de etila) e, posteriormente, eluída com metanol.

3.4.2. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas de alumínio de Sílica Gel 60 com indicador fluorescente UV₂₅₄ e 0,20 mm de espessura e adquiridas comercialmente (MN – Macherey-Nagel[®]).

Como sistemas solventes (fase móvel, 10 mL) foram utilizadas misturas hexano:acetato de etila (8:2) e (95:5). Os cromatogramas foram analisados por inspeção em luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (UVP®).

Como agente cromogênico utilizou-se a solução de ácido fosfomolibdico 10% em etanol 96 °GL (estocada em frasco opaco). Após a pulverização, as placas foram aquecidas por alguns minutos (aproximadamente 3 minutos) em estufa a 110 °C para a intensificação das cores.

3.4.3. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

As cromatoplasmas para CCDP foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 PF-254, com indicador de fluorescência (Merck®), em água deionizada, na proporção 1:2,8 (p/v), sobre placas de vidro, obtendo 1,00 mm de espessura adsorvente, através da utilização de espalhador Quickfitt® e ativadas em estufa (Fanem®) a 105 °C, por 45 minutos.

O sistema de eluentes foi uma mistura de hexano:acetato de etila (95:5) e as análises dos cromatogramas foram feitas através de inspeção em luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (UVP®).

As manchas encontradas foram raspadas com espátula, transferidas para um erlenmeyer e eluídas com o solvente diclorometano.

3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

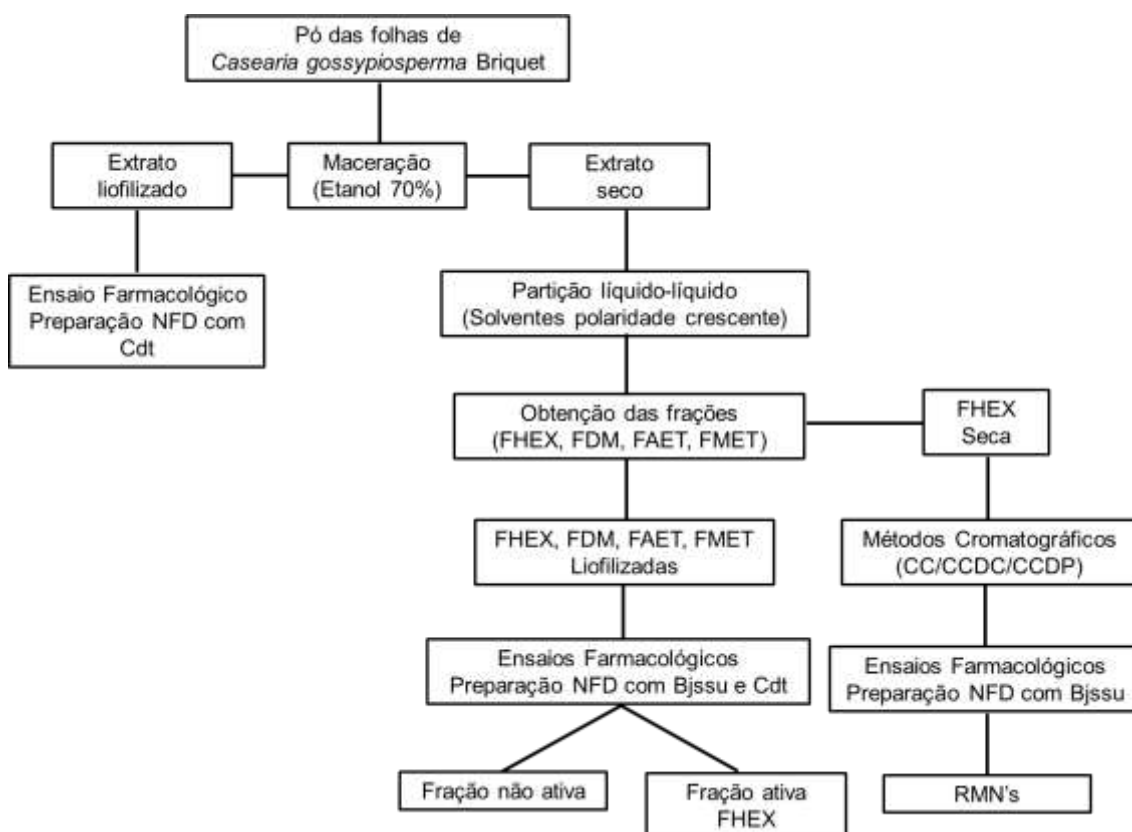
As técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Química Orgânica, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *Campus* de Araraquara.

Foram empregadas as técnicas de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais, de hidrogênio (RMN ^1H), de carbono (RMN ^{13}C) e de correlação heteronuclear (HMQC).

As espectroscopias de RMN foram realizadas em espectrômetro Varian INOVA 500[®], operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e em 125 MHz na frequência do carbono. O padrão interno utilizado como referência foi tetrametilsilano (TMS) e o solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Sigma-Aldrich[®]).

A Figura 5, abaixo, representa um fluxograma da metodologia empregada.

Figura 5. Fluxograma da metodologia empregada.



Fonte: Elaboração própria.

4. RESULTADOS

4.1. Material Vegetal

4.1.1. Rendimento do extrato hidroalcoólico

O estudo foi iniciado com 1.700 gramas do pó da droga e foram utilizados 40 litros de etanol 70%, resultando em 30 litros de extrato hidroalcoólico.

Esse extrato foi concentrado através das técnicas descritas e obteve-se uma massa bruta de 1.335 gramas com 78,5% de rendimento.

Pequena parte desta massa (35 gramas) foi liofilizada para os ensaios farmacológicos.

4.1.2. Frações FHEX, FDM, FAET e FMET

O extrato bruto (1.300 g) foi solubilizado com o volume mínimo de uma mistura metanol:água (80:20), conforme descrito anteriormente. Cada uma das frações apresentou a massa, descrita na Tabela 1:

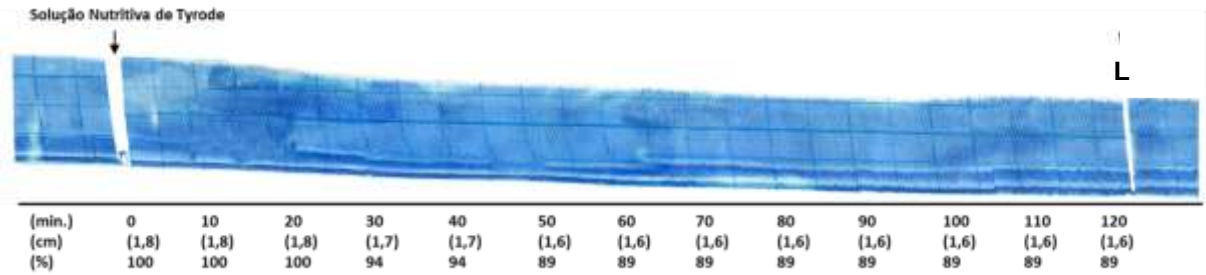
Tabela 1. Massa obtida das frações orgânicas a partir da partição líquido/líquido.

Frações Orgânicas	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Fração Hexânica	29,43	2,26
Fração Diclorometânica	27,70	2,13
Fração Acetato de etila	41,99	3,23
Fração Metanólica	487,21	37,48

4.2. Estudo Farmacológico da *Casearia gossypiosperma*

Os ensaios farmacológicos (n=6) realizados com a solução nutritiva de Tyrode, responsável por simular as condições fisiológicas da preparação biológica, juntamente com a aeração e o banho-maria em temperatura de 37°C, manteve a contração muscular (Figura 6) durante os 120 minutos.

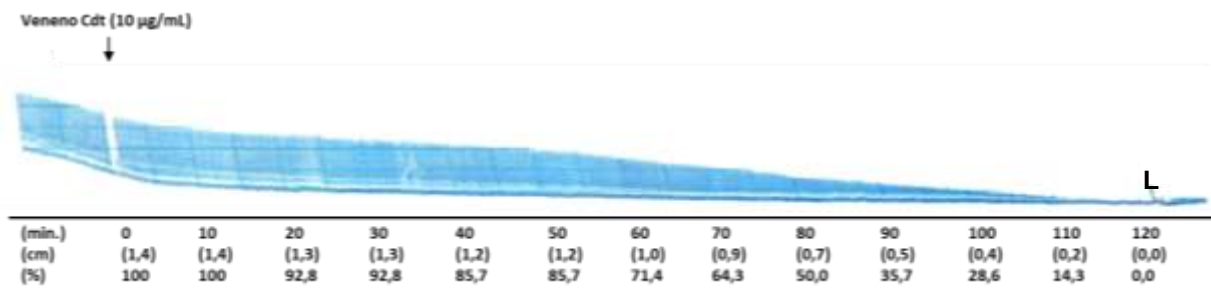
Figura 6. Registro miográfico da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (controle Tyrode), sob estímulo indireto.



Preparação exposta à solução nutritiva de Tyrode e constantemente aerada com carbogênio. Nestas condições, a preparação se mantém fisiologicamente estável. L, lavagem da preparação. Seta: momento da adição da solução nutritiva.

A Figura 7 ilustra o efeito farmacológico característico e representativo do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt, 10 µg/mL, n=9). Note o bloqueio neuromuscular próximo aos 110 minutos, mesmo após a lavagem da preparação.

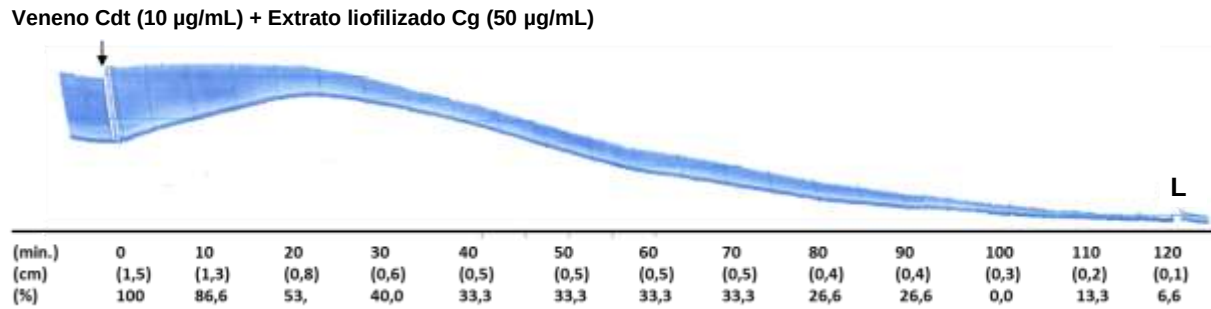
Figura 7. Registro miográfico de preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (Cdt), sob estímulo indireto.



Note o bloqueio neuromuscular irreversível induzido pelo veneno de Cdt (*Crotalus durissus terrificus*), mesmo após a lavagem da preparação (L). Seta: momento da adição do veneno.

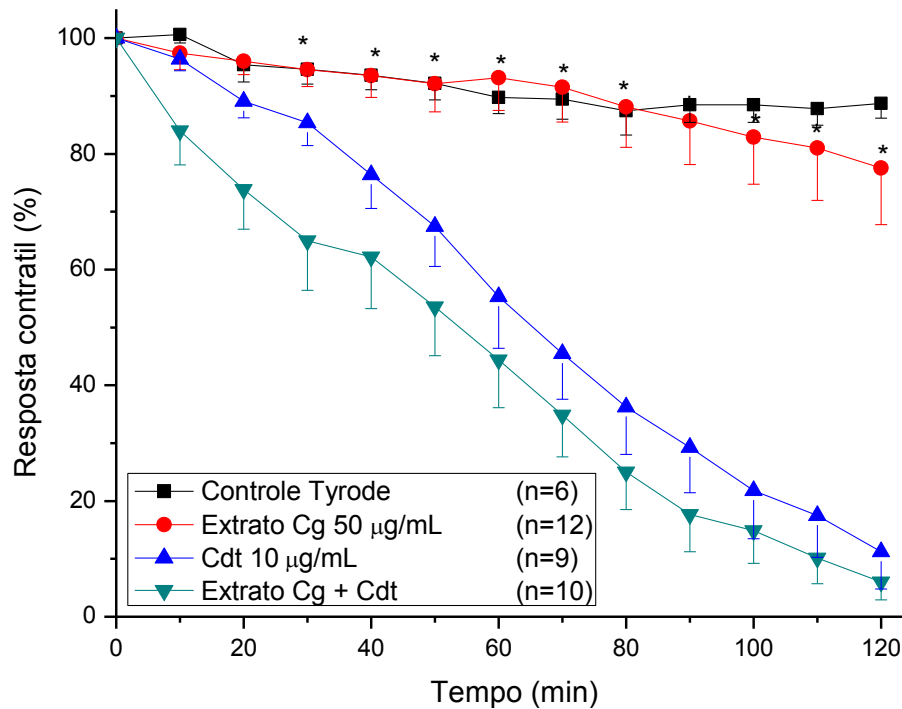
Para os ensaios de neutralização, utilizou-se a concentração de 50 µg/mL do extrato liofilizado de Cg (n=12), pois foi a que não provocou alteração da resposta contrátil comparativamente à solução de Tyrode. Sendo assim, utilizou-se essa concentração do extrato na mistura com o veneno bruto de Cdt (10 µg/mL, n=10), previamente incubado por 30 minutos. Neste protocolo, o extrato da planta não impediu o efeito neurobloqueador do veneno conforme se observam nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Registro miográfico de preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (Cdt + Extrato), sob estímulo indireto.



Ensaio farmacológico representativo da média de experimentos (n=10), mostrando que o extrato incubado com o veneno não impediu o bloqueio neuromuscular característico do veneno de Cdt. L, lavagem da preparação. Seta: momento da adição da mistura.

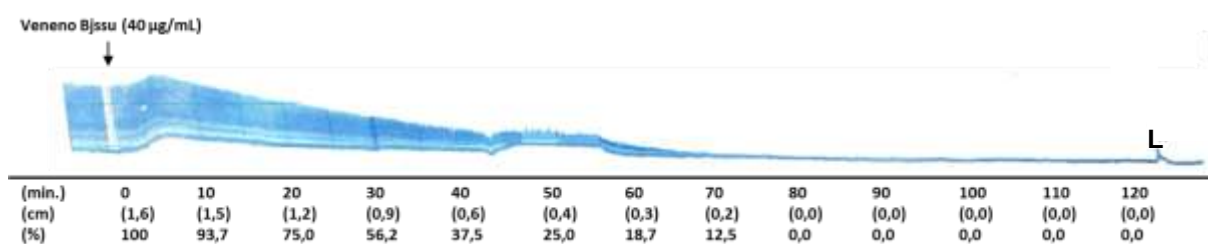
Figura 9. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Cdt + Extrato), sob estímulo indireto.



Efeito farmacológico do extrato liofilizado de *Casearia gossypiosperma* (Cg, 50 µg/mL) incubado com o veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt, 10 µg/mL). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, comparado ao veneno.

O veneno bruto de Bjsu (40 µg/mL, n=11) quando adicionado ao banho contendo a preparação nervo frênico-diafragma, causou contratura seguida de bloqueio neuromuscular irreversível (Figura 10).

Figura 10. Registro miográfico de preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (Bjssu), sob estímulo indireto.



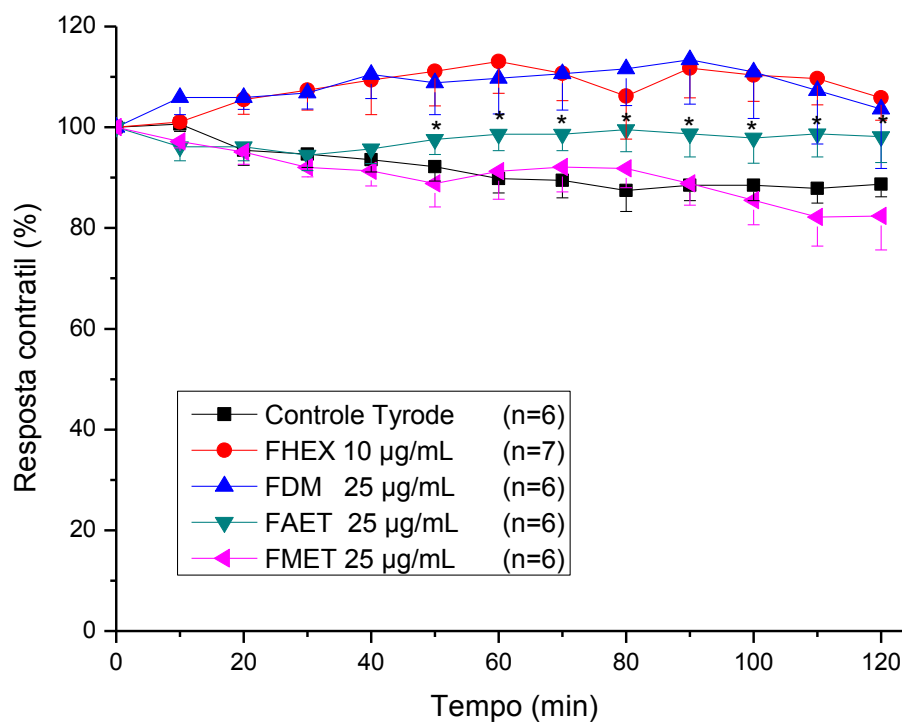
Bloqueio neuromuscular característico induzido pelo veneno de Bjssu (40 µg/mL) com marcante contratura e bloqueio irreversível mesmo após a lavagem da preparação (L). Seta: momento da adição do veneno.

Foram testadas várias concentrações de todas as frações orgânicas liofilizadas de Cg (10; 25; 50 e 75 µg/mL). As concentrações que menos interferiram na resposta contrátil, assemelhando-se à condição controle, estão demonstradas na Tabela 2 e Figura 11, abaixo.

Tabela 2. Concentração das frações do extrato que demonstrou menor interferência na resposta contrátil, comparada com a solução de controle Tyrode.

Frações Orgânicas	Concentração (µg/mL)
Fração Hexânica (FHEX)	10
Fração Diclorometânica (FDM)	25
Fração Acetato de etila (FAET)	25
Fração Metanólica (FMET)	25

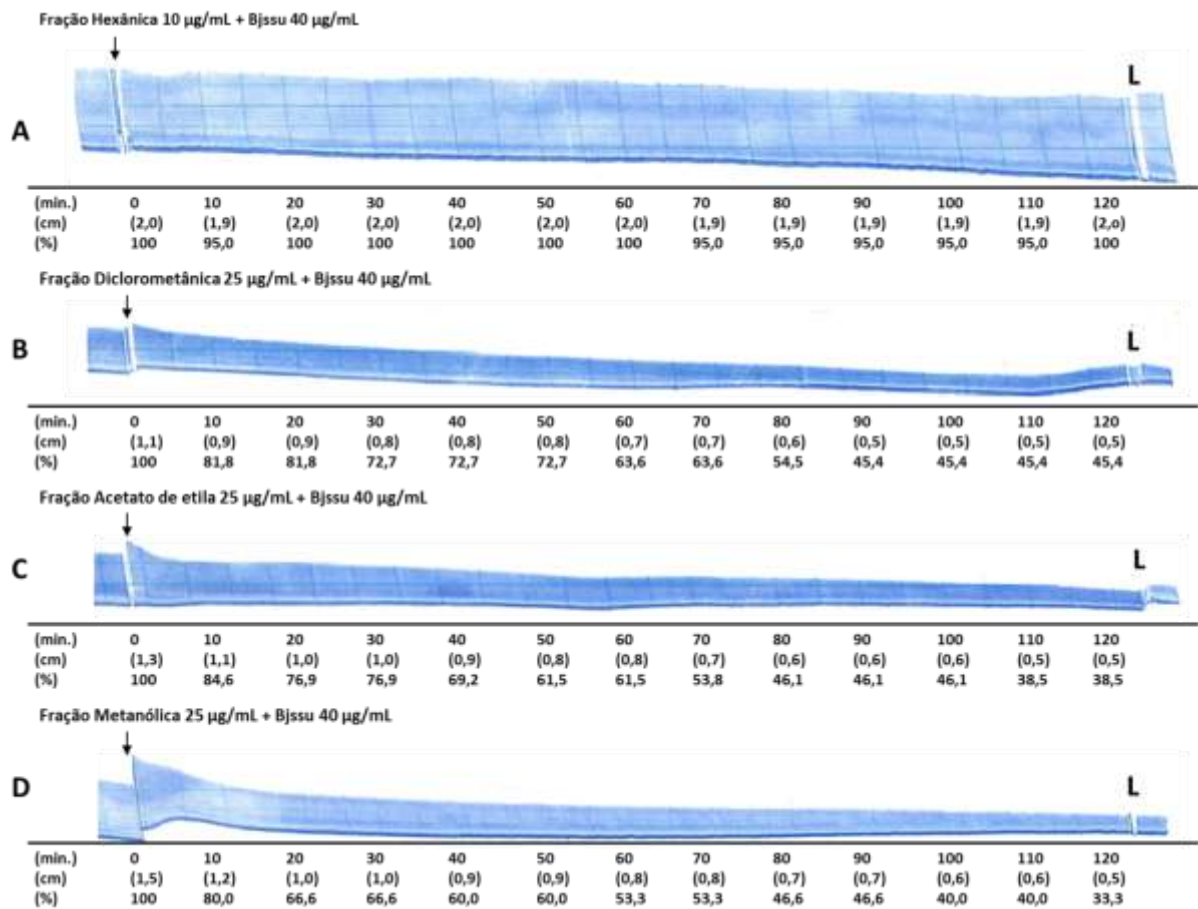
Figura 11. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas), sob estímulo indireto.



Comparação do efeito farmacológico entre controle Tyrode e frações orgânicas liofilizadas de *Casearia gossypiosperma*. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$ em relação ao controle Tyrode.

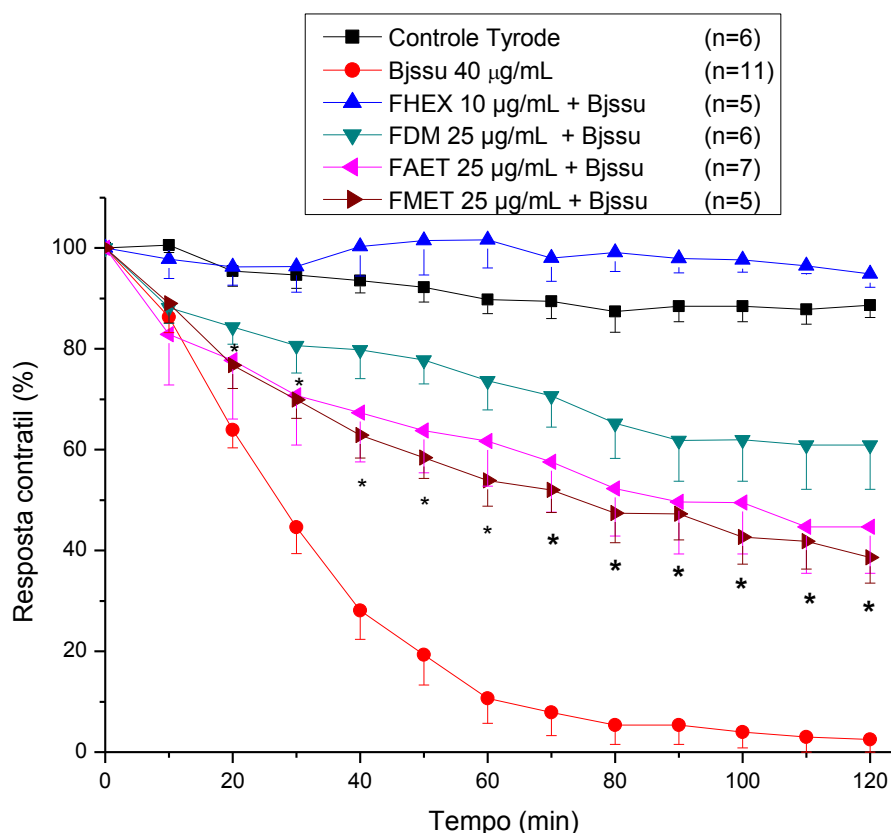
A partir das concentrações das FHEX, FDM, FAET e FMET conhecidas, todas foram combinadas com o veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (40 µg/mL), conforme demonstrado nas Figuras 12 e 13.

Figura 12. Registros miográficos de preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Bjssu), sob estímulo indireto.



Ensaios farmacológicos representativos da média de experimentos dos ensaios de neutralização entre o veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) com as frações hexânica (A, n=5), diclorometânica (B, n=6), acetato de etila (C, n=7) e metanólica (D, n=5). Note a superioridade da fração hexânica na proteção contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de Bjssu. L, lavagem da preparação. Seta: momento da adição da mistura.

Figura 13. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Bjssu), sob estímulo indireto.

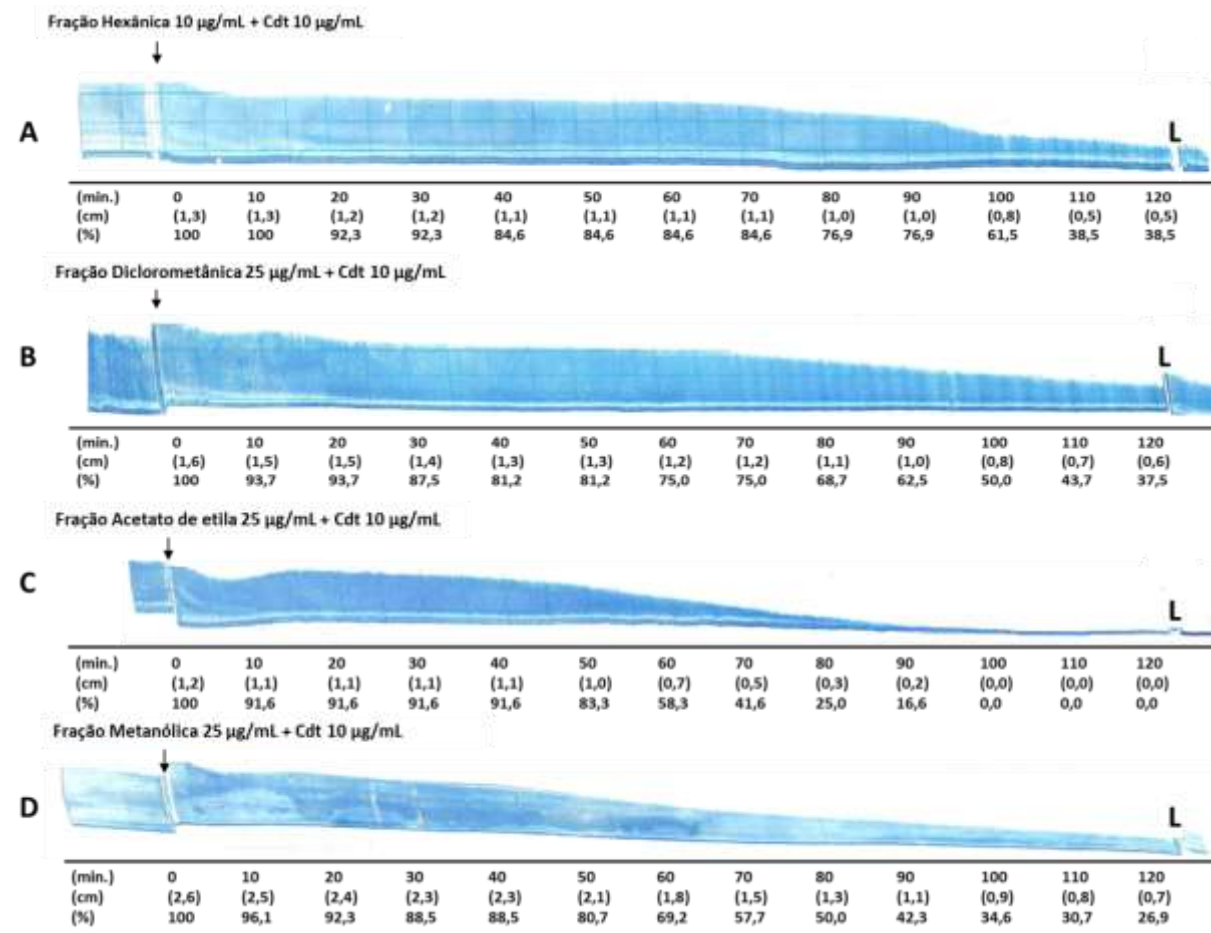


Efeito farmacológico dos ensaios de neutralização entre as frações (FHEX, FDM, FAET e FMET) e o veneno da *Bothrops jararacussu* (Bjssu). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, comparado ao veneno.

Observou-se a total proteção exercida pela fração hexânica contra o efeito bloqueador induzido pelo veneno de *B. jararacussu* aos 120 minutos, em $94,8 \pm 2,6\%$. As demais frações, FDM, FAET e FMET, protegeram significativamente ($p < 0,05$), porém parcialmente, com índices de $60,9 \pm 8,7\%$, $44,7 \pm 9,1\%$ e $38,6 \pm 5,0\%$, respectivamente, aos 120 minutos.

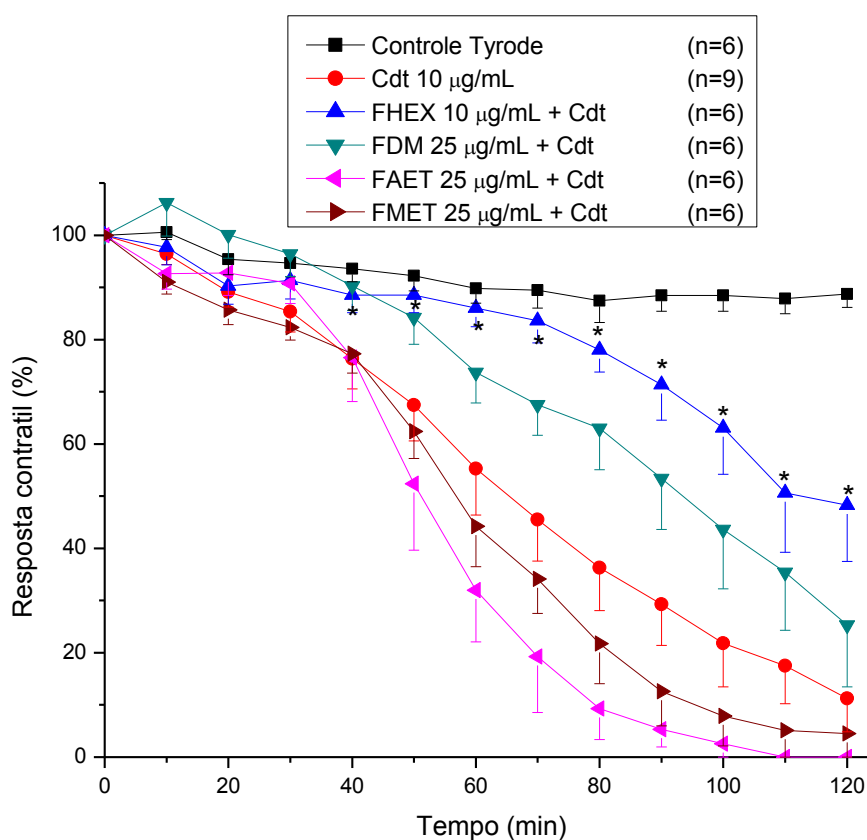
As frações orgânicas liofilizadas também foram testadas contra o veneno bruto da *Crotalus durissus terrificus* (10 µg/mL), conforme mostram as Figuras 14 e 15.

Figura 14. Registros miográficos de preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Cdt), sob estímulo indireto.



Registros miográficos representativos da média de experimentos dos ensaios de neutralização entre o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) e as frações hexânica (A, n=6), diclorometânica (B, n=6), acetato de etila (C, n=6) e metanólica (D, n=6). L, lavagem da preparação. Seta: momento da adição da mistura.

Figura 15. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (Frações orgânicas + Cdt), sob estímulo indireto.

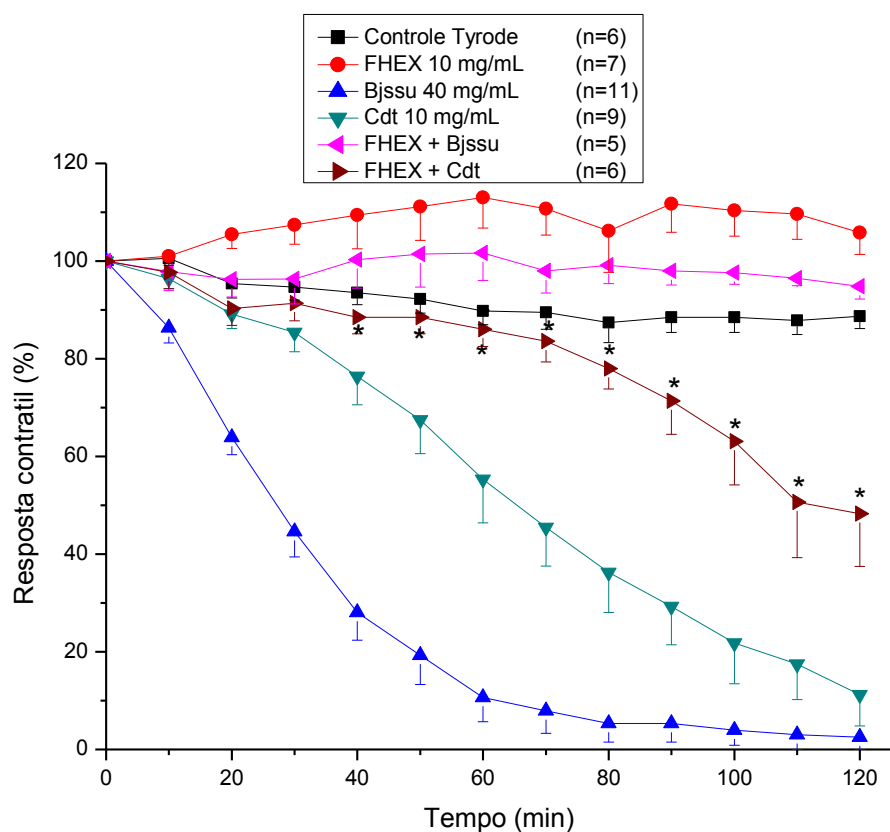


Ensaios farmacológicos de neutralização entre as frações (FHEX, FDM, FAET e FMET) e o veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Cdt). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, comparado ao veneno.

Evidenciou-se a proteção parcial da fração hexânica para a neutralização do veneno de *Crotalus durissus terrificus* aos 120 minutos, em $48,3 \pm 10,8\%$ ($p < 0,05$). Já as demais frações FDM, FAET e FMET, não demonstraram ação protetora contra o veneno, pois no tempo de 120 minutos apresentaram $25,3 \pm 11,8\%$, 0% e $4,5 \pm 4,5\%$ de atividade ($p > 0,05$).

Em virtude de a fração hexânica ter sido a que demonstrou melhor atividade contra os venenos estudados (Figura 16), a mesma foi selecionada para os estudos fitoquímicos subsequentes.

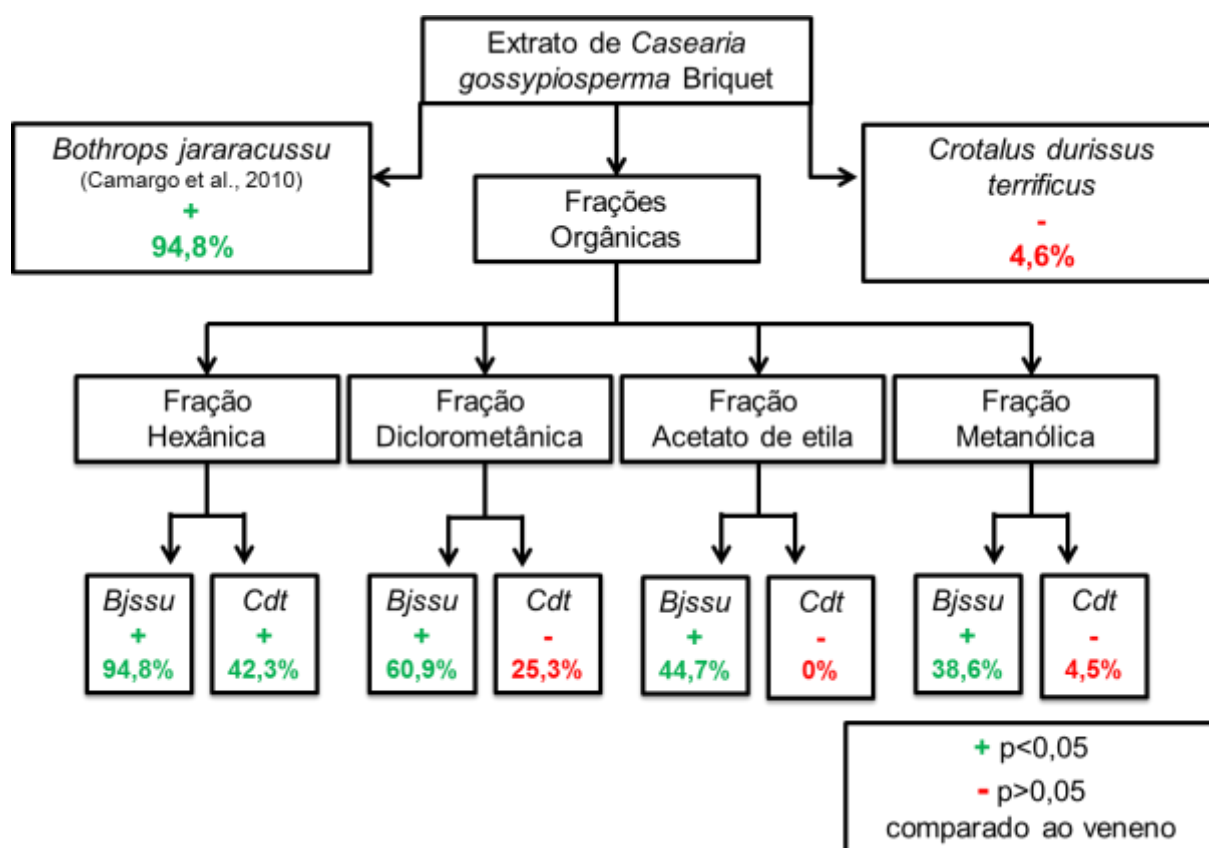
Figura 16. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (FHEX + Bjssu e Cdt), sob estímulo indireto.



Ensaios farmacológicos de neutralização entre a Fração Hexânica com os venenos brutos da *Bothrops jararacussu* (Bjssu) e *Crotalus durissus terrificus* (Cdt). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, comparado aos respectivos venenos.

A Figura 17 representa um esquema dos resultados farmacológicos.

Figura 17. Esquema dos resultados farmacológicos.



Bjssu, *Bothrops jararacussu*. Cdt, *Crotalus durissus terrificus*.

4.3. Métodos cromatográficos

Na análise cromatográfica, parte da massa da fração hexânica de *Casearia gossypiosperma* (15 g) obtida por partição foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com sílica gel, utilizando os eluentes hexano, acetato de etila e metanol em sistema gradiente. Foram coletadas frações em 328 tubos de ensaio que, após analisadas em cromatografia em camada delgada comparativa, utilizando como sistema de solvente misturas de hexano:acetato de etila (95:5 e 8:2) e a solução reveladora de ácido fosfomolibdico 10 % em etanol, além da inspeção sob lâmpada

de luz UV. As frações com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, resultando em 11 frações.

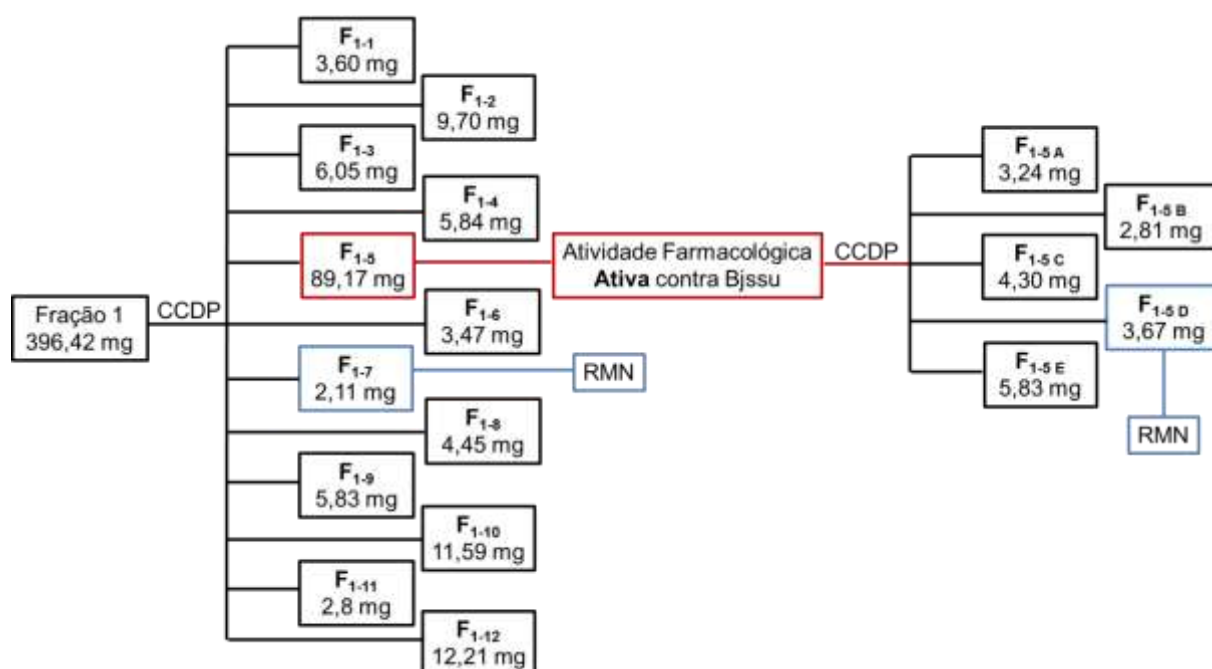
A primeira das frações, que reuniu 13 dos tubos de ensaios iniciais, foi selecionada para dar sequência ao fracionamento por apresentar uma boa resolução na cromatografia em camada delgada comparativa (Figura 18), conforme esquematizado abaixo (Figura 19).

Figura 18. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações obtidas por meio da purificação da fração hexânica.



Fase móvel hexano:acetato de etila (95:5). Cromatoplaça observada através da inspeção de luz UV. As frações foram designadas por números de 1 a 13.

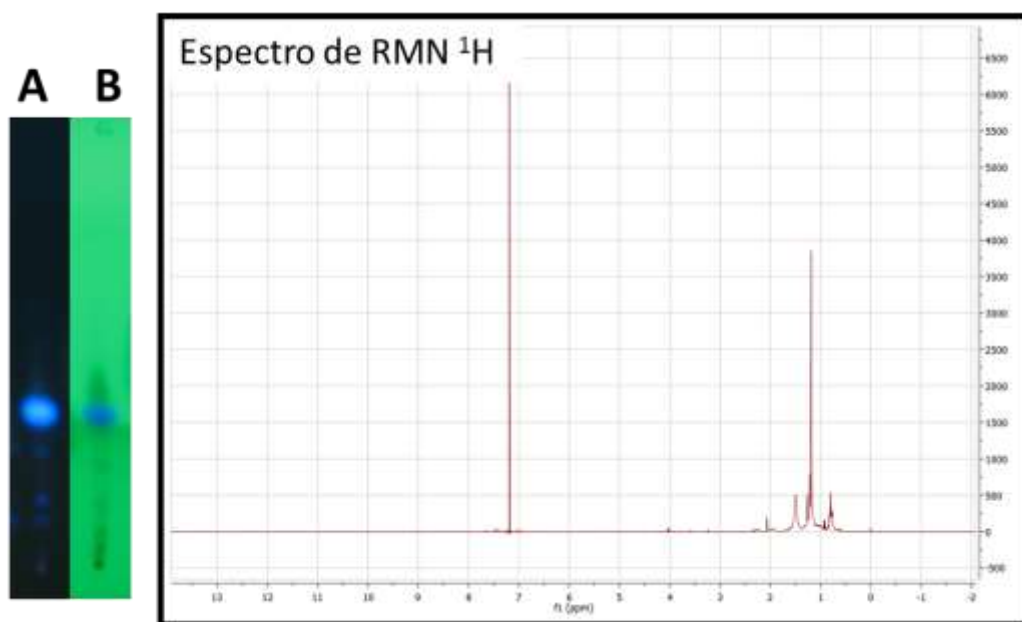
Figura 19. Esquema da cromatografia em camada delgada preparativa da Fração 1.



CCDP, Cromatografia em Camada Delgada Preparativa. RMN, Ressonância Magnética Nuclear. Bjssu, *Bothrops jararacussu*.

Todas subfrações (F₁₋₁ a F₁₋₁₂) foram cromatografadas em camada delgada comparativa, com sistema de solvente hexano:acetato de etila (95:5) e solução reveladora de ácido fosfomolibdico 10 % em etanol, além da inspeção sob lâmpada de luz UV. A Fração F₁₋₇ foi submetida à espectrometria de RMN ¹H (Figura 20).

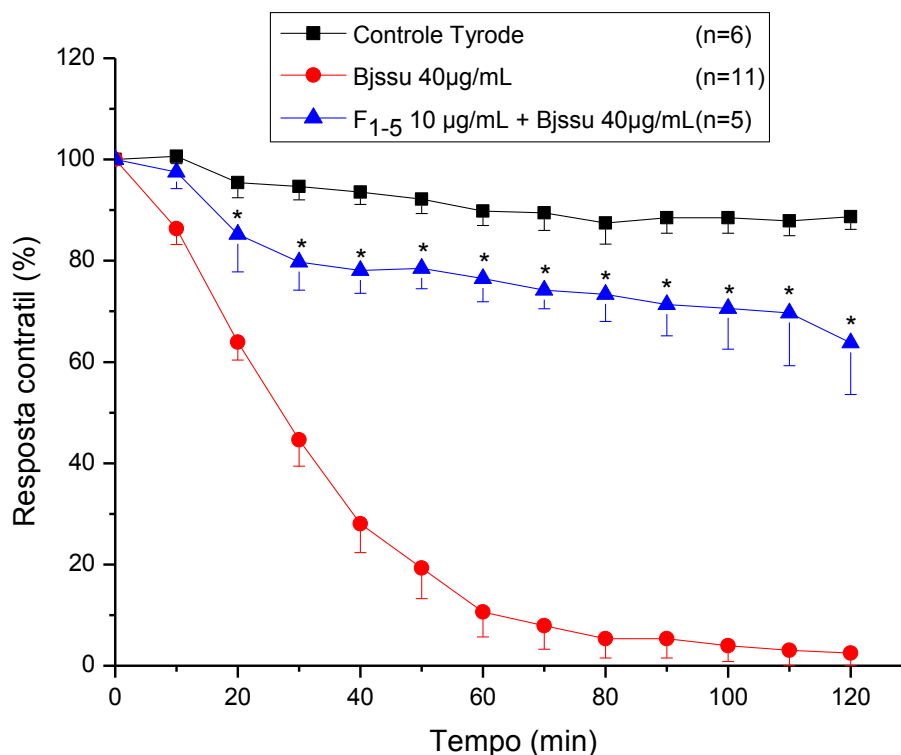
Figura 20. Cromatografia e Espectro de RMN ^1H da subfração F_{1-7} .



Fase móvel hexano:acetato de etila (95:5) e solução reveladora de ácido fosfomolibdico 10% em etanol. Em A, cromatoplaça observada através da inspeção de luz UV. B, placa após revelação. RMN ^1H , Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

Como a subfração F_{1-5} apresentou maior massa (89,17 mg) entre todas as subfrações obtidas, a mesma foi testada farmacologicamente na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ contra o veneno de Bjssu (40 $\mu\text{g/mL}$). A proteção foi de $63,7 \pm 10,8\%$ ($p < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 21.

Figura 21. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (F_{1-5} + Bjssu), sob estímulo indireto.

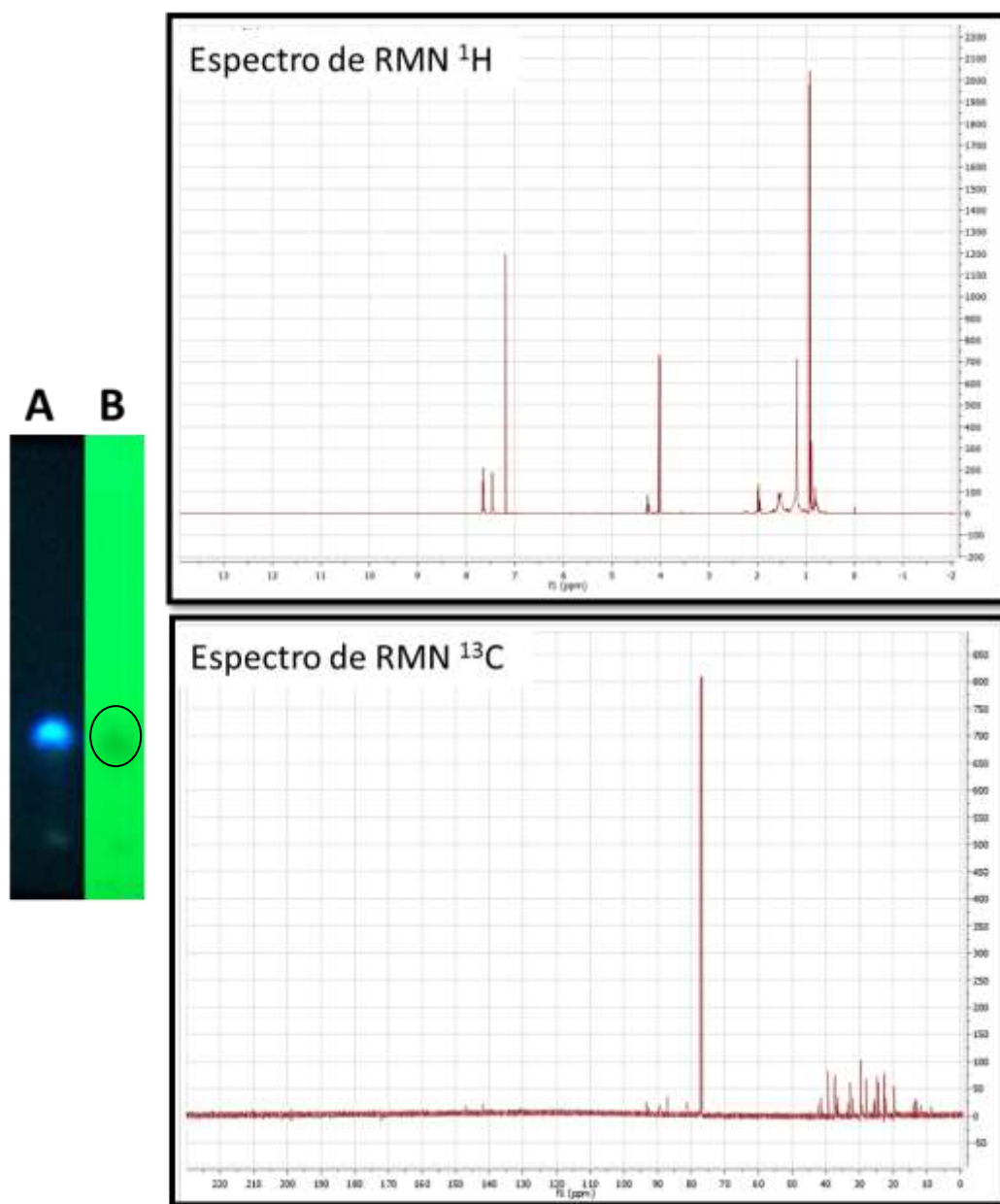


Ensaios farmacológicos de neutralização entre a subfração F_{1-5} e o veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (Bjssu). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$ comparado ao veneno.

Depois de comprovado o efeito farmacológico da subfração F_{1-5} contra o veneno bruto de Bjssu, a mesma foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa novamente, conforme descrito acima, para purificação (Figura 19).

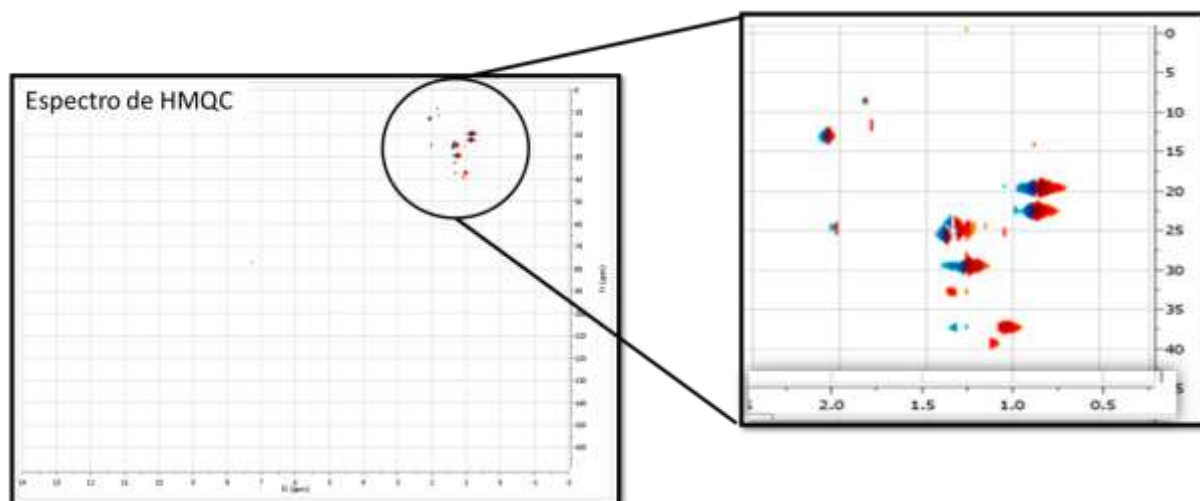
Baseado no resultado observado no cromatograma apresentado na Figura 21, a fração F_{1-5} D foi submetida à espectrometria de RMN ^1H , RMN ^{13}C , além do experimento bidimensional HMQC – Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (Figuras 22 e 23).

Figura 22. Cromatografia e Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C da subfração F₁₋₅ D.



Fase móvel hexano:acetato de etila (95:5) e solução reveladora de ácido fosfomolibdico 10% em etanol. Em A, placa observada através da inspeção de luz UV. Em B, placa após revelação. RMN ^1H , Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. RMN ^{13}C , Ressonância Magnética Nuclear de Carbono.

Figura 23. Espectro de HMQC da subfração F_{1-5 D}.



HMQC, Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation.

5. DISCUSSÃO

O avanço científico dos estudos com plantas medicinais, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, visando a obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998) tem sido de grande importância. É alta a proporção de usuários de plantas medicinais incluindo os profissionais da saúde, sendo a principal fonte de transmissão de conhecimento os pais ou avós. (OLIVEIRA et al., 2012)

A busca por plantas que concentrem os principais compostos bioativos (nas folhas, cascas, raízes, caules, etc.), capazes de neutralizar os efeitos de venenos ofídicos, tem recebido atenção especial (MORS et al., 2000) pois, além de reconhecer o potencial antiofídico do vegetal, agregando valor medicinal à planta, o estudo contribui para a sua preservação.

Para a preparação de extratos vegetais, existem vários trabalhos na literatura objetivando o isolamento de seus constituintes químicos, porém, o método mais utilizado para a análise químico-farmacológica tem sido a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v) (CIRILO, 1993). Caso o extrato apresente efeitos ativos biológicos, recomenda-se o processo de partição líquido-líquido, partindo-se de um extrato metanólico, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. A metodologia adotada foi semelhante, porém, partiu-se do extrato hidroalcoólico e obtiveram-se as frações de polaridades crescentes por partição líquido-líquido, pois o etanol é menos tóxico que o metanol, além de ser financeiramente mais viável.

Neste estudo, comprovou-se a eficiência do método de partição utilizado, além do método inicial, ou seja, a obtenção do extrato hidroalcoólico por maceração com o auxílio do banho ultrassônico e sem aquecimento. Os referenciais teóricos utilizados basearam-se em estudos que relataram aumento de eficiência de extração, observado pelo aumento do rendimento na extração de antioxidantes de *Rosmarinus officinalis* (ALBU et al., 2004), além de reduzir significativamente o tempo de extração e o custo com solventes (SILVA; ARAGÃO, 2009). Em relação à atividade farmacológica das frações, deve-se ressaltar que foram necessárias

concentrações menores (10 e 25 µg/mL) – uma vantagem de frações sobre extratos –, que aquelas utilizadas do extrato bruto (50 µg/mL) de *C. gossypiosperma* (CAMARGO et al., 2010), ou das concentrações utilizadas por Cintra-Francischinelli et al. (2008a) de extrato metanólico (200 µg/mL) de *Casearia sylvestris* Sw., ou por Nazato et al. (2010), com extrato hidroalcoólico (50 µg/mL) de *Dipteryx alata* Vogel.

A cromatografia em camada delgada é uma técnica amplamente empregada para fins de análise, desde análises de extratos vegetais brutos, até mesmo para avaliar um possível processo de separação e isolamento da substância de interesse (SIMÕES, et al., 2004). Como as cromatografias limitaram-se à fração em que se obteve atividade farmacológica mais significativa, foram testados diferentes tipos de sistemas de solventes (10 mL) para separação dos compostos presentes na fração hexânica, sendo que produziram melhor separação por cromatografia em camada delgada comparativa as misturas hexano:acetato de etila (8:2), para a fração hexânica, e a mistura de hexano:acetato de etila (95:5), para as suas subfrações (Figura 18).

A composição do veneno crotálico inclui toxinas, enzimas e peptídeos, sendo os componentes mais abundantes as neurotoxinas e as fosfolipases (NOGUEIRA; SAKATE, 2004), que produzem três ações principais: neurotóxica, miotóxica e coagulante. Os responsáveis por tais ações são quatro diferentes grupos de toxinas que compõem o veneno, entre elas, crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina. (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2009)

A crotoxina é o componente mais abundante do veneno do gênero *Crotalus*. Trata-se de um composto neurotóxico composto por duas subunidades, uma composta por fosfolisase A₂ (Crotoxina B) e outra por crotapotina (Crotoxina A) (BANCHER et al., 1973). O principal efeito é que a PLA₂ bloqueia a neurotransmissão pré e pós-sinápticas (LAGO et al., 2004). A crotamina é uma miotoxina caracterizada pela sua ação sobre células musculares esqueléticas, causando danos ou morte destas células (OWNBY, 1998). A giroxina é um componente pouco estudado do veneno de cascavel; os principais efeitos da ação desta toxina são a hipoatividade seguida de arreflexia e imobilidade (TORRENT et al., 2007). A convulxina recebeu este nome, pois acreditava-se ser a responsável

pelas convulsões e distúrbios respiratórios apresentadas nos pacientes. (PRADO-FRANCESCHI; VITAL BRAZIL, 1981)

Neste estudo, foi possível observar que o extrato liofilizado de *Casearia gossypiosperma* Briquet (50 µg/mL) não demonstrou efeito protetor ao bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus*, e isso pode ser devido à ação predominantemente neurotóxica do veneno. Ao contrário, como demonstrou Camargo et al. (2010), o extrato da planta protegeu contra a paralisia *in vitro* induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu*, que é predominantemente miotóxico.

Dentre as frações de diferentes polaridades obtidas a partir do extrato seco de *C. gossypiosperma*, a fração hexânica apresentou uma proteção parcial no tempo de 120 minutos contra o veneno de Cdt, e as demais frações (diclorometano, acetato de etila e metanol), mínima proteção, porém não significativamente diferente comparada ao veneno. Comparando-se a eficácia entre o extrato e frações, supõe-se que, no extrato liofilizado (50 µg/mL), a substância ativa da planta contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos esteja presente em menor quantidade que na própria fração hexânica (10 µg/mL).

Já a proteção contra o veneno de Bjssu foi observada em todas as frações (*p<0,05, em relação ao veneno), o que levanta uma questão bastante interessante, pois trata-se de um resultado diferente daquele da *Casearia sylvestris*, que apresentou melhor desempenho de proteção antibotrópica na fração metanólica (200 µg/mL), no mesmo modelo estudado (CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008a). Neste estudo, a melhor resposta foi obtida com a fração hexânica da espécie *Casearia gossypiosperma* numa concentração ainda menor, de 10 µg/mL, o que demonstra que as frações das duas espécies possuem interações diferentes com o veneno de Bjssu. Além disso, é interessante apontar que a fração hexânica foi a que melhor protegeu contra Bjssu e contra Cdt, ainda que parcialmente para Cdt.

Várias plantas utilizadas popularmente como antiofídicas apresentam atividades anti-inflamatórias (com intensidades diferentes), que têm sido atribuídas aos flavonóides, presentes nas espécies de plantas conhecidas como alcachofra,

cainca, contra-erva, erva-de-bugre, alcachofra, cainca, guaco, jataí, manacá, paracá e taiuá, segundo citado por Werle et al. (2009). Flavonóides também foram encontrados no extrato de *C. gossypiosperma*, identificados por cromatografia em camada delgada comparativa e quantificados por espectrofotometria (CAMARGO et al., 2010), o que demonstra sua habilidade inibitória contra o veneno botrópico.

Segundo Melo et al. (2009), a inibição contra o veneno de Bjsu é atribuída a diferentes substâncias presentes na constituição do vegetal; como exemplos, *Mikania laevigata* e *Plathymenia reticulata*, devem tal atividade à presença de cumaria e tanino, presentes respectivamente nessas espécies, o que foi também confirmado em preparações NFD com os fitoquímicos comerciais cumarina e ácido tânico.

A importância de se isolar/identificar uma substância ativa em espécies vegetais estimula o uso de fitoterápicos, que tem por objetivos prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO et al; 2003). Finalmente, o estudo fitoquímico aponta para a presença de terpenos na fração hexânica de *Casearia gossypiosperma*, e esses compostos já foram relacionados com ação antiofídica por outros autores. Como exemplos, o ácido betulínico apresentou-se como potencial inibidor da fosfolipase A₂ do veneno da cobra *Naja nigricollis* (TSENG; LIU, 2004); a glicirrizina, uma saponina triterpenóide extraída da raiz de uma Leguminosae, *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), impediu as alterações induzidas na hemostasia de *Bothrops jararaca* tanto *in vitro* como *in vivo*, sugerindo uma atividade potencial antiofídica (ASSAFIM et al., 2006); o acetato de lupeol, neutralizou a cardiotoxicidade, neurotoxicidade e alterações respiratórias induzidas pelo veneno de *Naja kaouthia* em animais experimentais, assim como neutralizou a hemorragia, edema, e a atividade fosfolipásica A₂ do veneno de *Daboia russellii*. (CHATTERJEE; CHAKRAVARTY; GOMES, 2006)

A subfração F₁₋₇ (Figura 20) foi submetida à análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), pois diante da análise da cromatografia em camada delgada comparativa, evidenciou-se uma substância predominante, caracterizada pela mancha acentuada em azul, observada por luz

UV. A mesma substância mostrou-se predominante também quando revelada com o ácido fosfomolibdico 10% em etanol. A análise por RMN ^1H desta fração mostrou, porém, que a subfração correspondia a uma mistura de terpenos, evidenciada pelos sinais desprotegidos do espectro.

Por apresentar uma pureza maior, evidenciada pelo espectro de RMN ^1H (Figura 22), a subfração $\text{F}_{1-5\text{ D}}$ foi submetida também à RMN ^{13}C e HMQC (Figura 22 e 23), porém, devido à pequena quantidade de amostra, os sinais obtidos nesses espectros não foram suficientes para a elucidação da estrutura química da substância.

Os espectros de RMN ^1H corroboraram os resultados obtidos em CCDC de que a subfração $\text{F}_{1-5\text{ D}}$ estava mais pura do que a subfração F_{1-7} .

Esses resultados mostram-se promissores para a continuidade de estudos das demais frações orgânicas (FDM, FAE e FMET) em busca de substâncias puras e ativas contra os venenos ofídicos.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato liofilizado da *Casearia gossypiosperma* Briquet não apresentou ação protetora contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), mas a fração hexânica protegeu parcialmente e significativamente este veneno.

Em contrapartida, todas as frações de diferentes polaridades com o veneno de *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) foram capazes de impedir total e significativamente o bloqueio neuromuscular *in vitro*, sendo a fração a mais eficaz com uma proteção superior a 90% e com uma concentração menor que as demais.

REFERÊNCIAS

ALAIN-MICHEL B. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2722–2735, 2007.

ALBU, S. et al. Potential for the use os ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.*, v. 11, p. 261-265, 2004.

AMARAL, C. F. S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 33, p. 251-255, 1991.

AMARAL, C. F. S. et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, v. 28, p. 220-227, 1986.

AMORIM, M. F.; MELLO, R. F.; SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 34, p. 137-157, 1969.

ASSAFIM, M. et al. Counteracting effect of glycyrrhizin on the hemostatic abnormalities induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Br. J. Pharmacol.*, v. 148 , p. 807-813, 2006.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente Crotálico. In: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H; MALAQUE, C.M.S; HADDAD-JÚNIOR, V. *Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, 2^a ed ,p. 108-11, 2009.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in himans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*, v. 25, p. 1163-1168, 1987.

BANCHER, W. et al. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus, 1758. *Mem. Inst. Butantan*, v.37, p. 137-148, 1973.

BARRIO, A. Estudio electroforético del veneno de serpiente de cascabel. Cien. Invest., v. 10, p. 368-370, 1954.

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. Acta Physiol. Lat. Am., v.11, p.24,1961.

BELLUOMINI, H. E. Produção de veneno de serpentes em cativeiro. Arq. Inst. Biol., n. 31, p. 149-154, 1964.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic Toxins Snake Venoms. Toxin. Rev., v. 7, p. 121-209, 1988.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ, v. 19, p. 7-16, 2003.

BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. Comp. Biochem. Physiol. Part B, v. 127, p. 21-30, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras de cobras. Rev. Med. São Paulo, São Paulo, SP, v. 6, p. 265-278, 1903.

BÜLBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Br. J. Pharmacol., v. 1, p. 38-61,1946.

CAMARGO, T. M. et al. *Bothrops jararacussu* venom-induced neuromuscular blockade inhibited by *Casearia gossypiosperma* Briquet hidroalcoholic extract. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., v. 16, p. 432-441, 2010.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Quím. Nova, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHATTERJEE, I.; CHAKRAVARTY, A. K.; GOMES, A. *Daboia russellii* and *Naja kaouthia* venom neutralization by lupeol acetate isolated from the root extract of Indian sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R. Br. J. Ethnopharmacol., v. 106, p. 38-43, 2006.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bulletin of the World Health Organization, v. 76, p. 515-524, 1998.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Antibothropic Action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) Extracts. Phytother. Research, v. 22, p. 784-790, 2008a.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Effects of commonly used solubilizing agentes on a model nerve-muscle synapse. Lat. Am. J. Pharm., v. 27, p. 721-726, 2008b.

CIRILO, V. K.; Manual de Plantas Medicinais, Ed. Assessorar, Francisco Beltrão, PR, p. 102, 1993.

COLLAÇO, R. C. O. et al. Propriedade antiofídica do extrato metanólico de *Mikania laevigata* sobre as ações biológicas induzidas pelo veneno de *Philodryas olfersii* na junção neuromuscular. REU, Sorocaba, SP, v. 36, p. 105-113, 2010

DEUTSCH, H. F.; DINIZ, C. R. Proteolytic activities of snake venoms. J. Biol. Chem., n. 216, p. 283-288, 1955.

DI STASI, L. C. Arte, ciência e magia. In: Di Stasi, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, p. 18, 1996.

FRANÇA, R. F. et al. Acute hepatotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in rats. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., v. 15, p. 61-78, 2009.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. Biochem. Pharmacol., v. 20, p. 1549-1556, 1971.

FRYE, F. Reptile Care – Na Atlas of Diseases and Treatments. T. F. H. Publications, v. 2, p. 475-511, 1991.

GONÇALVES, J. M.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras, I. Análise eletroforética. An. Acad. Bras. Ciên., v. 22, p. 141-150, 1950.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. Toxicon, v. 7, p. 1223-1235, 2010.

HARRIS, J. B.; Toxic phospholipases in snake venom: an introductory review. In: THOPE, R. S., WÜSTER, W., MALHOTRA, A. Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite. Claredon Press, Oxford, p. 235-250, 1997.

HELUANY, N. F. et al. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. Toxicon, v. 30, p. 1203-1210, 1992.

HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. Biochemistry, v. 26, p. 780-787, 1987.

HOMMA, M.; TU, A. T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. Br. J. Exp. Pathol., v. 52, p. 538-542, 1971.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. Toxicon, v. 26, p. 615-627, 1988.

IBAMA – Instituto de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Plantas Medicinais, 2001 <http://www.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm> Acesso em: 29 mai. 2010.

JIA, L. G. et al. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. Toxicon, v. 34, p. 1269-1276, 1996.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the *Bothrops* genus. J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, SP, v. 3, p. 264- 272, 1997.

KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. South american snake venoms affecting haemostasis. J. Toxicol.-Toxin Reviews, v. 14, p. 359-374, 1995.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon*, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

LAGO, L. A. et al. Serological biochemical profile of bovines poisoned experimentally with free iodized crotoalic poison and iodized incorporated in liposomes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p. 653-657, 2004.

LEITÃO FILHO, H. F. A flora arbórea dos Cerrados do Estado de São Paulo. *Hoehnea*, v.19, p. 151-163, 1992.

LOMONTE, B. et al. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopy study. *Toxicon*, v. 32, p. 41-55, 1994.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, vol. 1, p. 19-27, 2006.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, p. 368, 2000.

MAGALHÃES, R. A.; RIBEIRO, M. M. F.; REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S. Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 28, p. 228-233, 1986.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 102, p. 364-370, 2005.

MARQUETE, R.; TORRES, R. B.; MEDEIROS, E. *Salicaceae in* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol. Ther.*, v. 48, p. 223-236, 1990.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JÚNIOR, V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, p. 33-61, 2003.

MELO, R. S. et al. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In: KELLER, R. B. Flavonoids: biosynthesis, biological effects and dietary sources. Nova Science Publishers, p. 249-262, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500>. Acesso em: 19 mar. 2012.

MOLANDER, C. et al. Cross-cultural comparison of medicinal floras used against snakebites. J. Ethnopharmacol., v.139, p. 863-872, 2012.

MORS, W. B. et al. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. Phytochemistry, v. 55, p. 627-642, 2000.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. Toxicon, v. 29, p. 713-723, 1991.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. Thromb Haemost, v. 41, p. 314-328, 1979.

NAZATO, V. S. et al. *In Vitro* Antiophidian Properties of *Dipteryx alata* Vogel Bark Extracts. Molecules, v. 15, p. 5956-5970, 2010.

NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M. Acidente crotálico em animais domésticos. Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária, v. 10, n. 31, 2004.

OLIVEIRA, S. G. D. O. et al. Na ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. J. Ethnopharmacol., v. 140, p. 428-437, 2012.

OSHIMA-FRANCO, Y. et al . Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-i, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, v. 11, p. 465-478, 2005.

OWNBY, C. L. Structure, functions and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. J. Toxicol. Toxin. Rev. 17, 2: p. 213-238, 1998.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Artigo de revisão: Ofidismo. Ver. Ass. Med. Brasil, v. 47, p. 24-29, 2001.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. J. Bras. Nefrol., vol. 22, p. 162-168, 2000.

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Toxicon, 19, p. 875-87, 1981.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience, v. 10, p. 475-489, 1983.

RODRIGUES-SIMIONI, L. et al. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A2 myotoxin. Toxicon, v. 33, p. 1479-1489, 1995.

ROSENFELD, G. Syntomatology, Pathology and Treatment of snake bites in South America. In: Bücherl, W. and Buckley, E. (Eds). Venomous Animals and Their Venoms. New York, Academic Press, v. 2, p. 345-384, 1971.

RUPPELT, B. M. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom--I. Analgesic and anti-inflammatory activities. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 86, p. 203-251, 1991.

SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L. Distúrbios Hemostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. JR. Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 289-309, 2003.

SANTORO, M. L. et al. Comparison of biological activities in venoms from three subspecies of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., v. 122, p. 61-73, 1999.

SILVA, A. C. et al. Inhibition of NTPDase, 5'-nucleotidase, Na⁺/K⁺ - ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. Phytomedicine, v. 23, p. 509-514, 2006.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C. F. S. Extraction parameters from *Cinchona pubescens* Vahl using farmacopeia and no farmacopeia methods. Braz. J. Pharmacogn., v. 19, p. 776-780, 2009.

SIMÕES, M. O. S. et al. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 5^a ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS / Ed. da UFSC, 2004.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 30 out. 2011.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Schlangengifte, III. Mitteilung Reinigung und Krystallization des Klapperschlangengiftes. Ber. Dtch. Chem. Ges., v. 71, p. 1076-1081, 1938.

SOARES, A. M. et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. Curr. Med.Chem., v. 12, p. 2625-2641, 2005.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. Rev. Lecta, Bragança Paulista, v. 21, p. 7-13, 2003.

TORRENT, R. M. R. et al. Neurotoxicological effects of trombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake. Toxicon, v.50, p. 144-152, 2007.

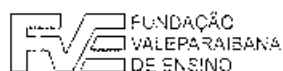
TSENG, H. C.; LIU, Y. C. Immobilized betulinic acid column and its interactions with phospholipase A2 and snake venom proteins. J. Sep. Sci., v. 27, p. 1215-1220, 2004.

TU, A. T. Venoms of crotalidae (Crotalids, pit vipers). In: Venoms: Chemistry and Molecular Biology. New York, 1977.

VIEIRA JR, G. M. et al. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*. J. Nat. Prod., v. 72, p. 1847-1850, 2009.

WERLE, A. L. B. et al. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. Rev. Bras. Farmacogn., v. 19 (2A), p. 400-402, 2009.

WHO – World Health Organization. Rabies and envenomings: a neglected public health issue, 2007. Disponível em:
<http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf>. Acesso em 25 out. 2011.

ANEXO A

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
INSTITUTO DE PESQUISA & DESENVOLVIMENTO – IP&D

CERTIFICADO

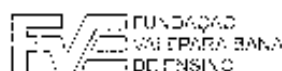
Certificamos que o Protocolo n.º A001/CEUA/2011, sobre “**Fracionamento biomonitorado do extrato hidroalcoólico da *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o veneno da *Bothrops jararacussu*”**”, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Yoko Oshima Franco** esta de acordo com a **LEI 11.794/2008**, que Regulamenta o inciso VII do 1º § do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, sendo considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos que o pesquisador (a) responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório parcial após **Doze Meses** e um relatório final no prazo máximo de **Dois Anos** a contar da data de emissão deste certificado.

São José dos Campos, 11 de Março de 2011.

Prof. Dr. Wellington Ribeiro
Presidente da Comissão de Ética
no Uso de Animais – CEUA

ANEXO B



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
INSTITUTO DE PESQUISA & DESENVOLVIMENTO – IP&D**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A002/CEUA/2011, sobre “**Eficácia farmacológica *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel).** sob a responsabilidade da Profa. Dra. Yoko Oshima Franco esta de acordo com a LEI nº 1.794/2006 que Regulamenta o inciso VII do 1º § do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, sendo considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos que o pesquisador (a) responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório parcial após Doze Meses e um relatório final no prazo máximo de Dois Anos a contar da data de emissão deste certificado.

São José dos Campos, 1º de Março de 2011.

Prof. Dr. Wellington Ribeiro
Presidente da Comissão de Ética
no Uso de Animais – CEUA