

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PRÓ-REITORIA ACADÊMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Miriéle Cristina Ferraz

ESTUDO BIOMONITORADO DE COMPOSTOS ISOLADOS DA
PLANTA *Dipteryx alata* VOGEL CONTRA VENENOS OFÍDICOS

Sorocaba/SP
2013

Miriéle Cristina Ferraz

ESTUDO BIOMONITORADO DE COMPOSTOS ISOLADOS DA
PLANTA *Dipteryx alata* VOGEL CONTRA VENENOS OFÍDICOS

Dissertação de Mestrado 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
2013

Ficha Catalográfica

F434e Ferraz, Miriéle Cristina
Estudo biomonitorado de compostos isolados da planta *Dipteryx alata* Vogel contra venenos ofídicos / Miriéle Cristina Ferraz. -- 2013. 108 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2013.

1. Plantas medicinais. 2. Fitoquímicos. 3. Neurofarmacologia. 4. Cobra venenosa – Veneno. I. Franco, Yoko Oshima, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

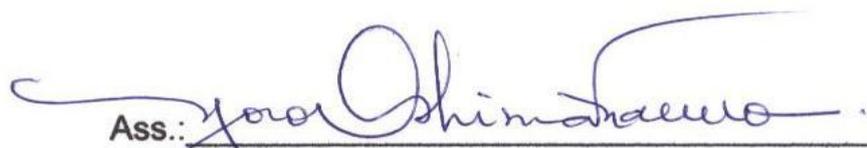
Miriéle Cristina Ferraz

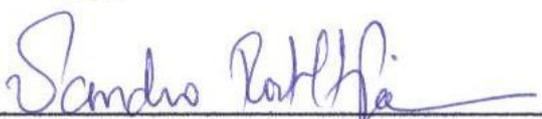
**ESTUDO BIOMONITORADO DE COMPOSTOS ISOLADOS DA
PLANTA *Dipteryx alata* VOGEL CONTRA VENENOS OFÍDICOS**

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: 27/02/2013

BANCA EXAMINADORA:

Ass.: 
Pres.: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Universidade de Sorocaba - UNISO

Ass.: 
1º Exam.: Prof. Dr. Sandro Rostelato Ferreira
Universidade Paulista - UNIP

Ass.: 
2º Exam.: Profa. Dra. Marisa M. T. Rocha
Instituto Butantan - IBU

DEDICO...

*A Deus,
minha eterna fonte de sabedoria. Obrigada Pai, pelo presente da vida,
por guiar meus passos e por me presentear com mais essa conquista.
Também agradeço pelas pedras colocadas em meu caminho, pois foram
elas que me lapidaram como um melhor ser humano.*

*À minha Santa de Devoção,
Nossa Senhora Desatadora dos Nós,
que roga por mim junto ao Pai.
Obrigada minha mãe
por toda sua intercessão!*

*À Miriam, minha querida mãe,
pelo apoio em minhas decisões, pelos valores passados
e pelo imenso amor. Você é meu alicerce!*

*Ao meu irmão Jonathan,
pelo companheirismo, carinho e suporte
prestado durante esta jornada.*

*À Profa. Dra. Yoko Oshima Franco,
pelos ensinamentos e apoio desde
o início da graduação em Farmácia.
Por ter acreditado no meu
desenvolvimento pessoal e profissional,
me dando suporte e orientando
com dedicação e profissionalismo!*

*A todos os animais utilizados,
que deram suas vidas sem direito de escolha:
"Ninguém pode exercer tirania ou
crueldade para com qualquer
criatura animal que habitualmente
é utilizada para auxiliar nas tarefas do homem."
Obrigada pela contribuição científica!
A vocês eu dedico todo o meu respeito e agradecimento.
(British Anticruelty Act, 1822)*

AGRADECIMENTOS

À Família...

À minha mãe Miriam, quanto amor e dedicação! Que exemplo de boa mãe você é para mim. Quando eu for mãe quero ser como você! Mesmo quando não podia sempre colocou seus filhos na frente de seus propósitos pessoais. Ensinou-me que sapatos nunca valerão mais que livros, muito embora seja bom tê-los. Que a aparência nunca terá mais valor do que o caráter. Ensinou-me a lutar pelo querer e a trabalhar duro por minhas conquistas. Sei o quanto você se orgulha de mim! Obrigada por passar grande parte de sua vida cuidando da minha. Amo você!

Ao Jonathan (Jô), aquele que me viu nascer e a quem eu carinhosamente chamava de “mão”. Meu companheirinho das artes infantis! E foram tantas! E quantas brincadeiras! E quantas descobertas! Aquele que nunca me abandonou, exatamente quando eu mais precisei. Aquele que ficou abraçado comigo enquanto me ouvia dizer que eu não era nada e que morre de rir das minhas piadas sem graça. Jô, sem dúvida eu tenho o melhor irmão do mundo! Obrigada pelo companheirismo.

À tia Marta, puxa mais que tia mais legal! Agradeço pelo imenso amor e por todo o apoio desde a época da iniciação científica. Também agradeço pelas correções do meu curriculum lattes e da minha dissertação, você é especialista nisto! Sempre gosto de me lembrar das estórias de infância que você e minha mãe me contam e das boas risadas dadas! Somente Deus pode pagar pela ajuda prestada nos momentos mais difíceis de nossas vidas. Nunca esquecerei tudo o que você fez pela minha mãe e conseqüentemente por todos nós. Tenho a certeza que sem sua ajuda eu não teria chegado até aqui. Obrigada por tudo! Você é demais! Amo você!

Aos tios Manasses e Circe, um casal mais que harmonioso! Agradeço pela presença e companheirismo de vocês tanto nos momentos felizes quanto nos menos felizes. É muito bom tê-los para uma boa conversa e saborosas risadas compartilhadas durante as xícaras de chá. Obrigada pelo apoio e incentivo em meus estudos. Vocês são muito queridos!

Ao meu pai Jorge, tão dedicado a sua música e política quanto eu sou a minha ciência. Pai que ama do seu jeito. Agradeço por aquela conversa numa certa noite de 2005, onde você me disse que eu poderia cursar farmácia na Uniso e que você e minha mãe financiariam meus estudos. Agradeço pela ajuda durante a etapa da graduação. Apesar de eu querer, agradeço por não ter me permitido trabalhar, o que fez com que eu principiasses a iniciação científica. Agradeço pelo incentivo financeiro. Você tem contribuição por eu ter escolhido o caminho da pesquisa. Obrigada!

Aos avós Antônio e Elisa, pelos bons conselhos, pelo imenso amor e carinho a mim dispensados. Sei que nestes últimos anos não estive presente muitas vezes, e levei vários puxões de orelha por isto. Mas no fundo vocês sempre entenderam a importância dos estudos para mim. Obrigada por tudo. Amo vocês!

À tia e madrinha Isabel (Bel), pelo seu carinho de sempre. Desde que eu era pequenina incentivou a mim e as outras sobrinhas a ter gosto pelo universo feminino. E como eu me achava o máximo com meu batom de moranguinho e meu perfuminho da Barbie, aprendendo com ela algum passo de dança bem divertida. Tia Bel é um sinônimo de feminilidade e divertimento. Obrigada por tudo tia!

Ao tio e padrinho Oswaldo, que está sempre muito disposto para o trabalho. Adoro ver a dedicação, o amor e o respeito que ele tem com suas plantas. Obrigada pelo carinho e pelos bons conselhos a mim dispensados!

Aos tios Roberto (Beto) e Jussara (Ju) pelos bons conselhos, por todo o carinho, amor e amizade. Adoro vocês!

Aos primos Fernando, Fábio, Henrique, Thaís, Jade e Érika, pelos raros e ricos momentos de descontração em família.

À Lilica, Babi, Bingo e Nino (in memoriam), que sem dúvida tornaram cada um dos meus dias mais leves e felizes através dos seus latidos, miados, lambidas e balançar de caudas. Como é bom dar e receber carinho! Eu amo vocês!

Aos Docentes e entidades científicas...

À minha mãe científica Dra. Yoko Oshima Franco, quanto continuo aprendendo com você minha querida Profa. Yoko! Você exerceu grandes transformações em minha vida. Tenho a certeza que grande parte do que eu sou hoje eu devo a você. Sem dúvida tive muitas oportunidades ao seu lado durante esses anos de tão boa convivência. Agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho. Obrigada por acreditar em meu potencial, pela nossa amizade tão especial e por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, por sua colaboração e pela ferramenta de trabalho.

Aos professores: Dra. Helena Oshini Ferraz e Dr. Humberto Gomes Ferraz, pela valiosa colaboração e parceria.

Ao Prof. Ms. Jorge Amaral Filho, por seu apoio durante a etapa da histologia. Muito obrigado pela contagem cega e por todas as piadas contadas. Você é muito divertido!

Ao Prof. Dr. Sandro Rostelato Ferreira, pelo seu desvelo em algumas das etapas deste trabalho. Pelas valiosas orientações e por seus conselhos. Obrigada por partilhar seus conhecimentos, pelo apoio e amizade.

À Profa. Ms. Valéria de Campos Orsi, grande amiga e muito companheira. Extremamente prestativa e sempre pronta a ajudar. Obrigada por tudo o que fez por mim desde o princípio, pela paciência para ensinar e compartilhar comigo seus conhecimentos sobre os equipamentos do laboratório. Tenho grande admiração por você.

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, por me permitir adentrar em seu laboratório com isto pude avançar em meus conhecimentos. Obrigada pelo acolhimento!

À Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila e Prof. Dr. Silvio Barberato Filho, pelo desvelo com a reserva técnica do meu projeto e por pacientemente gerenciá-la. Muito Obrigada!

À Profa. Dra. Silvia Travaglia Cardoso pelas fotografias cedidas. Também agradeço pela amizade.

Ao corpo docente presente na banca de qualificação e defesa, pela extrema colaboração, professores Dr. Sandro Rostelato Ferreira (Unip), Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha (Instituto Butantan), Dra. Márcia Gallacci (Unesp) e Dra. Priscila Randazzo de Moura (Puc).

Às professoras Dra. Maricene Sabha e Dra. Sara de Jesus Oliveira que torceram por mim nesse período, por seus conselhos, broncas e pela boa convivência. Agradeço pelas piadas e risadas compartilhadas. Adoro vocês!

A todos os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais – Uniso, professores: Ms. César Alexandre Pequeno da Silva, Dra. Maricene Sabha, Esp. Paulo José Sanchez, Dra. Renata Lima, Dra. Sara de Jesus Oliveira, Ms. Valquíria Miwa Hanai Yoshida. Agradeço pela oportunidade em participar da CEUA como membro e pelo rico aprendizado sobre as Ciências dos Animais. Obrigada pela experiência norteadora!

A todos os professores do colegiado do Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Dra. Cristiane de Cássia Bergamaschi, Dr. Fernando de Sá Del Fiol, Dr. Jose Martins Oliveira Júnior, Dra. Luciane Cruz Lopes, Dr. Marco Vinicius Chaud, Dra. Maricene Sabha, Dra. Marli Gerenutti, Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila, Dr. Silvio Barberato Filho e Dra. Yoko Oshima Franco. Obrigada pela rica convivência e aprendizado durante o período da minha representação discente!

À Profa. Dra. Marli Gerenutti pela confiança em meu trabalho. Agradeço pelas oportunidades.

Ao Prof. Dr. Luiz Madaleno Franco, que de forma indireta colaborou com minha formação. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Renata Vasques da Silva Tavares, pela sua paciência e extrema dedicação ainda quando eu era aluna de iniciação científica e nada sabia sobre o mundo da fitoquímica. Agradeço por ter contribuído com a minha formação. Obrigada por tudo!

À Profa. Ms. Magali Glauzer Silva, por contribuir com a minha formação ainda durante o período da graduação. Agradeço por partilhar seus conhecimentos farmacobotânicos e farmacognósticos. Valeu Magá!

À Universidade Federal do Tocantins (UFT) pela doação das plantas medicinais.

À Universidade Federal de Salamanca (USAL) pela obtenção dos fitoquímicos.

À Capes/Prosup-Cursos Novos e à UNISO pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro para compra dos materiais de consumo.

Aos amigos...

Ao Jhones, pelo apoio dispensado durante a execução deste trabalho. Obrigada pelo companheirismo. Você é um grande amigo Jhou!

À Luciane, por todo o apoio na etapa da análise histológica deste trabalho. Lu, eu te vi desabrochar e amadurecer ao longo de nossa convivência em laboratório. Sei que fui dura com você por diversas vezes, mas só não desiste de quem se gosta. Tenho orgulho do que você se tornou. Obrigada pela força, carinho e amizade!

Ao Joel, pela colaboração e cumplicidade. Agradeço pela convivência, pelas risadas, pelos lanches da tarde e pela boa amizade. Obrigada por tudo Joelzito!

À Maria Silvia (Máh), pela cumplicidade. Quanta disposição para ajudar. Seu espírito de equipe é algo maravilhoso! Foi sempre muito bom tê-la conosco no laboratório. Você é muito divertida! Obrigada pela contagem cega na histologia e pela amizade tão especial!

À Profa. Ms. Juliana de Oliveira Soares Silva, por sua amizade e apoio. Ju minha amiga mais ciumenta e dedicada, eu agradeço-a pela sua prontidão em ajudar-me. Agradeço pelo ombro e carinho de sempre. Obrigada por cuidar de mim!

À Lourdita, pela sua amizade, apoio, pela companhia durante as disciplinas da pós-graduação, pela rica convivência em laboratório. Agradeço pelas risadas e cafezinhos.

À Adriana (Dri) grande parceira durante a graduação, iniciação científica e mestrado. Dri minha amiga, a você eu desejo o melhor que Deus possa lhe dar. Agradeço pela força, apoio e amizade tão especial. Bem vinda ao mundo Sophia!

À Mariana Donato (Coelho) uma grande amiga da graduação e do mestrado, que torce por mim e que torna meus dias mais alegres. Que capacidade é essa que você tem de arrancar um sorriso meu até nos momentos mais difíceis? Má, obrigada pela amizade tão especial!

Ao Evandro, por cuidar carinhosamente dos meus animais por diversas vezes. Agradeço também pela confiança em meu trabalho, isso representa muito para mim. Agradeço pela amizade e pela boa convivência.

Ao Gildo, por sua paciência para me ensinar. Que pessoa admirável! Os poucos dias em que estive em sua companhia foram suficientes para notar quanta sabedoria mora com você. Obrigada por toda a ajuda!

À Ana Beatriz e à Karine, companheiras, amigas e muito dedicadas, que tantos momentos agradáveis compartilhamos. As sextas-feiras, com a presença de vocês, eram sempre repletas de trabalho, risadas e muita alegria!

À Maria Lúcia e à Stéfani, a dupla de TCC mais harmoniosa que tivemos na linha de pesquisa. Ambas muito dedicadas à pesquisa, a Stéfani com toda a sua meiguice e a Maria Lúcia com seu senso crítico e poder de decisão, faziam as tardes de quarta serem repletas de trabalho e divertimento.

À Gleidy, grande companheira durante a graduação. Agradeço por pacientemente me ajudar com a histologia. Também pela boa amizade.

À Emília, grande amiga durante a graduação. Com quem eu pude conviver também durante o período do mestrado. Minha querida, eu te agradeço pela colaboração prestada e por toda a sua amizade.

À Fernanda Vianna e à Priscila Carmo, grandes amigas da época da graduação e que muito torcem por mim. Obrigada pela amizade tão boa de vocês meninas!

Ao Alexandro (Careca) e à Natália (Náti). Com vocês eu tive que ser dura. Mas era necessário que vocês aprendessem o significado da palavra parceria. E como foi bom vê-los trabalhando juntos. Admiro muito a força de vontade do Careca para vencer na vida. E a Náti, que encontrava dificuldades para estar presente no laboratório, mas que também conseguiu vencer. Agradeço pela convivência e pelas risadas.

À Débora, doce, meiga e com um senso de responsabilidade que eu admiro muito. Obrigada querida, pela amizade e convivência.

À Monique, a quem eu pude acompanhar o crescimento durante esses anos de tão boa convivência. Vai deslanchar no mundo da pesquisa! Obrigada por tudo!

Ao Jean, sempre muito gentil e disposto a ajudar os amigos. Agradeço pela amizade, risadas e boa convivência. Valeu "Joan"!

À Améris Letícia, pela convivência, apoio e amizade.

Ao Edson Yoshida, disposto ao trabalho e muito competente. Edinho apesar da amizade ainda recente, eu sei que posso contar com você! Agradeço pela torcida e apoio.

À Valquíria Miwa Hanai Yoshida, sempre muito disposta a dar-me um bom conselho. Val eu te agradeço pela amizade, torcida e apoio. Também agradeço pela companhia nos eventos da CEUA.

À Márcia Rebelo e à Jaqueline Machado, companheiras e extremamente dedicadas à pesquisa. Admiro muito vocês meninas! Obrigada pela amizade tão especial e pelos cafezinhos.

À Márcia e à Elis, alunas super dedicadas. É bonito ver mãe e filha se darem tão bem até no mundo da pesquisa. Obrigada por tão boa convivência!

À Laura Fávaro (Laurinha), que torce muito por mim. Agradeço por confiar no meu trabalho. Para um futuro docente conquistar respeito e admiração ainda sendo discente é algo maravilhoso. Obrigada pelo carinho Laura!

À Ana Caroline e à Liana, pela boa amizade de vocês e pela convivência em laboratório.

Ao Leandro Feitosa e à Celi Ribeiro pela rica convivência durante os anos do mestrado. Obrigada pela boa amizade de vocês.

Ao Amaury, meu companheiro de estrada. Muito prestativo e dedicado. Obrigada pela amizade!

Aos funcionários e estagiários dos laboratórios de Saúde: Néia, Fabiana, José Carlos, Gustavo, Mariane, Thamar, Isolda, Márcia e Gabi agradeço pela ajuda e boa convivência.

Às funcionárias Dona Shirley, Mara e Rosana (Rô), por tornarem felizes as horas do "happy hour". Absolutamente tudo fica mais aconchegante depois de uma xícara de café ou de chá. Muito Obrigada!

Às funcionárias Néia e Elisa, por tornarem o ambiente de trabalho sempre muito limpo e organizado.

À Profa. Dra. Amábile, por seus conselhos e amizade. Foi muito bom ter sua companhia nos almoços de sexta-feira. Obrigada!

À Rita de Cássia Collaço e ao Rafael Stuani Floriano, pelo acolhimento na Unicamp.

Às amigas do Instituto Butantan: Danusa (Dan), Circe, Dra. Silvia, Dra. Marisa (Mah) e Patrícia (Pati), pela torcida para aprovação do projeto perante a Capes. Obrigada pela amizade meninas!

Aos amigos do Programa Escola da Família: Alessandro (Alê), Eulália, Luciana (Lu), Marina (Má), Talita (Tá), Thiago (Thi) e Luzia. Agradeço pela amizade, pelas risadas e pela boa companhia de vocês. Obrigada pela torcida, apoio e amizade!

Ao Dimas, ao Leandro, ao Rafael (Rafa), à Luana e especialmente à Virgínia, por todo companheirismo de vocês quando eu nada sabia e tudo precisava aprender. Agradeço pela paciência e amizade.

A outras amigas tão queridas: Thaís Helena, Carla e Vanessa. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao Silvano pela amizade durante o período da graduação. Por ter gentilmente me apresentado a Profa. Yoko. Obrigada Sil!

À Teresa, uma grande amiga! Minha irmã gêmea de barriga diferente! Grande companheira desde a época do berçário. Muito obrigada pelo imenso carinho e por dividir comigo momentos bons e não tão bons da vida. Minha eterna gratidão. Te adoro loira!

Finalizando, agradeço as demais pessoas não citadas acima pela convivência durante o andamento deste trabalho: colegas e funcionários. Foi muito gratificante poder compartilhar esse período da minha vida com todos vocês!

*Posso, tudo posso,
Naquele que me fortalece.
Nada e ninguém no mundo
vai me fazer desistir.
Quero sem medo Te entregar meus projetos.
E deixar me guiar pelos caminhos
que Deus desejou pra mim.
Vou perseguir tudo aquilo que
o Senhor já escolheu pra mim.
E realizar o sonho mais lindo
que Deus sonhou.
E na espera de um novo
que vai chegar!
Vou persistir, continuar
a esperar e crer.
Mesmo quando a visão se turva
e o coração só chora,
Na alma, a certeza da vitória!
Pois eu posso, tudo posso,
em Jesus!*

Celina Borges

RESUMO

Em estudos prévios, o extrato seco de cascas da planta *Dipteryx alata* Vogel impediu o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (VBjssu), mas não de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt). Posteriormente, foram isolados e elucidados estruturalmente 18 fitoquímicos da planta. Neste estudo, foram biomonitorados 8 desses fitoquímicos, classificados como triterpenóides, ácidos fenólicos e flavonóides, contra a irreversível paralisia nervo-músculo induzida pelos venenos VBjssu e VCdt. Os registros miográficos dos diferentes protocolos experimentais foram obtidos através de técnica miográfica convencional, utilizando-se preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (*ex vivo*) ou preparações nervo ciático poplíteo externo-tibial anterior de ratos (*in situ*). Assumiu-se que o protocolo experimental resultante de ensaios *ex vivo* de neutralização (incubação prévia de veneno e fitoquímico) de maior eficácia, comparativamente à neutralização dos venenos pelo antiveneno botrópico comercial (AVB), seria posteriormente ensaiado *in situ* com o veneno mais sensível aos fitoquímicos. Os ensaios *in situ* tiveram como referência o antiveneno botrópico administrado intravenosamente. A miotoxicidade foi avaliada através de microscopia óptica de preparações resultantes dos bioensaios *ex vivo*. Os resultados *ex vivo* obtidos mostraram que o bloqueio característico induzido por VBjssu foi impedido: a) quando pré-incubado com os triterpenóides: Lupeol, Betulina, Lupenona e 28-OH-Lupenona, que ao final de 120 minutos tiveram a resposta aumentada para $70,1\% \pm 7,9$ (n=5); $68,3\% \pm 7,0$ (n=11); $45,2\% \pm 9,4$ (n=7); $54,3\% \pm 5,4$ (n=4), respectivamente; b) quando pré-incubado com os ácidos fenólicos: Ácido Vanílico, Vanilina e Ácido Protocatecuico para $53,9\% \pm 3,1$ (n=4); $27,9\% \pm 1,8$ (n=4); $23,6\% \pm 3,6$ (n=4), respectivamente; c) quando pré-incubado com 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxiisoflavona para $83,8\% \pm 5,0$ (n=4); e d) comparativamente ao AVB $72,6\% \pm 3,4$ (n=4), não havendo diferença significativa do tratamento com a Betulina em relação ao AVB. Para o bloqueio característico induzido por VCdt, a resposta foi aumentada significativamente ($p < 0,05$) e ao final de 120 min. encontraram-se $39,5\% \pm 8,9$ (n=9) e $49,5\% \pm 8,1$ (n=4) de fibras que respondiam ao estímulo indireto quando pré-incubadas com Betulina e Lupenona, respectivamente, mas não quando incubadas com Lupeol (n = 6) e 28-OH-

Lupenona (n = 4). A média da quantificação do dano morfológico (n=3, cada protocolo) mostrou que o VBjssu provocou lesões de 50,27% ± 5,4, que passaram para níveis de 18% ± 2,4 e 24% ± 3,7 quando tratadas com Betulina e Lupeol, sendo que estes sozinhos induziram danos de 16% ± 1 e 13,0% ± 2,6, respectivamente. Já os níveis de lesões ocasionados por VCdt foram de 43,9% ± 4,1, que passaram para níveis de 13,0% ± 2,6 e 27% ± 3,2, quando tratadas com a Betulina e a Lupenona, sendo que estes sozinhos induziram danos de 16% ± 1 e 22% ± 3, respectivamente. Os resultados da resposta contrátil obtidos *in situ* frente à incubação com VBjssu (40 µg/mL, 120 min) foram de 73,25% ± 1,68 (n=4) e aumentada para 92,23% ± 0,45 (n=4), com AVB administrado intravenosamente. Conclui-se que em modelo *ex vivo*, dentre os ácidos fenólicos, o Ácido Vanílico foi o que apresentou melhor capacidade neutralizante contra o efeito bloqueador induzido pelo veneno VBjssu, assim como o flavonóide - 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona e o triterpenóide Betulina. Este fitoquímico foi o mais investigado neste estudo, pois protegeu contra os efeitos miotóxicos e neurotóxicos de ambos os venenos, sendo indicado para estudos futuros em modelo *in situ*, administrado intraperitoneal ou intravenosamente após a injeção intramuscular dos venenos, em modelo simulado de acidente ofídico.

Palavras chave: Betulina. *Bothrops jararacussu*. *Crotalus durissus terrificus*. *Dipteryx alata* Vogel. 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona.

ABSTRACT

Previously, the dry extract from *Dipteryx alata* Vogel barks prevented against the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* (VBjssu), but not against *Crotalus durissus terrificus* (VCdt). Later, 18 phytochemicals from hydroalcoholic extract were isolated and structurally elucidated. In this study, 8 of them classified as triterpenoids, flavonoids and phenolic acids were biomoned against nerve-muscle paralysis induced by VBjssu and VCdt venoms. The myographic registers were obtained by a conventional myographic technique using mouse phrenic nerve-diaphragm preparations (*ex vivo*) or rat popliteal external nerve/ anterior tibialis muscle (*in situ*). It was assumed that the more efficacious experimental protocol resulting from *ex vivo* neutralization assays (preincubation of venom plus phytochemical) comparatively to commercial bothropic antivenom (BAV), it would be, later, assayed *in situ* with the most sensitive venom to the phytochemicals. The *in situ* assays had BAV administered intravenously as reference. The myotoxicity was evaluated by light microscopy in preparations submitted to *ex vivo* bioassays. The *ex vivo* results showed that the characteristic paralysis induced by VBjssu was stopped and at the end of 120 minutes the response was increased to: a) $70.1\% \pm 7.9$ (n=5) $68.3\% \pm 7.0$ (n=11); $45.2\% \pm 9.4$ (n=7) $54.3\% \pm 5.4$ (n=4), when preincubated with triterpenoids: Lupeol, Betulin, Lupenone and 28-OH-Lupenone respectively; b) to $53.9\% \pm 3.1$ (n=4) $27.9\% \pm 1.8$ (n=4) $23.6\% \pm 3.6$ (n=4), when preincubated with the phenolic acids: Acid Vanillic, Vanillin and Protocatechuic Acid, respectively; c) to $83.8\% \pm 5.0$ (n=4) when preincubated with 3',7,8-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone; and d) comparatively to BAV $72.6\% \pm 3.4$ (n=4), with no statistically difference with betulin treatment. When preparations were submitted to VCdt, which also causes irreversible paralysis, the response was significantly increased ($p < 0.05$) and at the end of 120 min were found $39.5\% \pm 8.9$ (n=9) and $49.5\% \pm 8.1$ (n=4) of functioning fibers when preincubated with Betulin and Lupenone, respectively, but not with Lupeol (n=6) and 28-OH-Lupenone (n=4). The average measurement of morphological damage (n=3, each protocol) showed that the lesions caused VBjssu $50.27\% \pm 5.4$ decreased to $18\% \pm 2.4$ and $24\% \pm 3.7$ levels, when treated with Betulin and Lupeol, and these alone

induced damages of $16\% \pm 1$ and $13.0\% \pm 2.6$, respectively. VCdt caused $43.9\% \pm 4.1$ of cell damage, which decreased to $13.0\% \pm 2.6$ and $27\% \pm 3.2$ when treated with Betulin and Lupenone, which in turn induced damages of $16\% \pm 1$ and $22\% \pm 3$, respectively. The *in situ* incubation with Bjssu ($40 \mu\text{g/mL}$, 120 min) resulted in $73.25\% \pm 1.68$ ($n=4$) of operational fibers and increased to $92.23\% \pm 0.45$ ($n=4$) with BAV intravenously administered. It is concluded that among the phenolic acids, the Vanillinic Acid was the better phytochemical in neutralizing the blocking effect induced by *Bothrops jararacussu* in *ex vivo* model, whereas among the flavonoids and triterpenoids were, respectively, 3',7,8-Trihydroxy-4'-Dimethoxyisoflavone and Betulin. This phytochemical was the most investigated in this study since it protected against neurotoxic and myotoxic effects of VBjssu and VCdt exposed to *ex vivo* neuromuscular preparations, being indicated to future studies *in situ*, intraperitoneous or intravenously administered after intramuscular injection of the venoms, in a simulated model of ophidian accident.

Key-words: Betulin. *Bothrops jararacussu*. *Crotalus durissus terrificus*. *Dipteryx alata* Vogel. 3',7,8-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Bothrops jararacussu</i> (jararacuçu).	32
Figura 2 - <i>Crotalus durissus terrificus</i> (cascavel).	34
Figura 3 - Distribuição geográfica do Baru	40
Figura 4 - <i>Dipteryx alata</i> Vogel (Baru).	41
Figura 5 - Estrutura química dos triterpenóides.	46
Figura 6 - Estrutura química do flavonóide.	46
Figura 7 - Estrutura química dos ácidos fenólicos.	47
Figura 8 - Esquematização do isolamento da preparação NFD.	50
Figura 9 - Foto pronta para contagem.	54
Figura 10 - Padrão utilizado para a contagem e tipos de células.	55
Figura 11 - Esquematização do isolamento da preparação NPE	57
Figura 12 - Registro miográfico de preparação NFD	59
Figura 13 - Registros miográficos de preparações NFD.....	59
Figura 14 - Efeito farmacológico dos triterpenóides..	60
Figura 15 - Neutralização do VBjssu com os triterpenóides.	61
Figura 16 - Neutralização do VCdt exercida por Betulina e Lupenona..	62
Figura 17 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD	64
Figura 18 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD.	65
Figura 19 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD	66
Figura 20 - Efeito farmacológico dos ácidos fenólicos.....	68
Figura 21 - Neutralização do VBjssu com os ácidos fenólicos	69
Figura 22 - Efeito farmacológico do flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'- metoxi- isoflavona)	70
Figura 23 - Neutralização do VBjssu com o flavonóide.	71
Figura 24 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD	73
Figura 25 - Efeito farmacológico da Betulina e do AVB.....	74
Figura 26 - Neutralização do VBjssu com a Betulina e AVB	75
Figura 27 - Registro miográfico da preparação NPE	76
Figura 28 - Efeito farmacológico da preparação NPE.	77
Figura 29 - Desenho experimental	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVB	Antiveneno botrópico comercial
Bjssu	<i>Bothrops jararacussu</i>
VBjssu	Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-I	Bothropstoxina-I
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
VCdt	Veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
<i>D. alata</i>	<i>Dipteryx alata</i> Vogel
DMSO	Dimetilsulfóxido
PEG 400	Polietilenoglicol 400
mg	Miligrama (s)
µg	Micrograma (s)
min.	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
µL	Microlitro (s)
mg	Miligrama (s)
mOsm/L	miliosmol por litro
PLA₂	Fosfolipase A ₂
NaCl	Cloreto de sódio
KCl	Cloreto de potássio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
n	Número de experimentos

NFD	Nervo frênico-diafragma
NPE	Nervo ciático poplíteo externo
CG	Células <i>ghost</i>
CM	Condensação das miofibrilas
e	Edema
LD	Lesão delta
RN	Região Necrótica

Sumário

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1. Acidentes ofídicos	26
2.2. Serpentes peçonhentas.....	28
2.3. O veneno ofídico	29
2.4. Gênero <i>Bothrops</i> Wagler.....	30
2.4.1. <i>Bothrops jararacussu</i>	31
2.5. Gênero <i>Crotalus</i> Linnaeus.....	33
2.5.1. <i>Crotalus durissus terrificus</i>	34
2.6. Tratamento Soroterápico.....	35
2.7. Importância do estudo com plantas medicinais.....	36
2.8 <i>Dipteryx alata</i> Vogel	39
2.9. Fitoquímicos	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. GERAIS.....	44
3.2. ESPECÍFICOS	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. Material botânico	46
4.1.1. Solubilização dos Fitoquímicos	47
4.2. Veneno	47
4.3. Antiveneno Botrópico Comercial (AVB).....	48
4.4. Animais.....	48
4.5. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD) – Modelo <i>ex vivo</i>	49
4.5.1. Controles Experimentais dos Fitoquímicos	51
4.5.2. Ensaio de neutralização da atividade bloqueadora do VBjssu – NFD.....	51
4.5.3. Ensaio de neutralização da atividade bloqueadora do VCdt – NFD.....	52
4.6. Análise Morfológica	52
4.6.1. Microscopia de luz.....	52
4.7. Escolha do fitoquímico para formulação de injetável e ensaios farmacológicos em preparação <i>ex vivo</i> e <i>in situ</i>	55
4.7.1. Comparação dos efeitos de neutralização do AVB e da Betulina - NFD.....	56

4.7.2. Preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE)	56
4.7.2.1. Controles Experimentais	57
4.7.2.2. Ensaio de neutralização da atividade bloqueadora do VBjssu – NPE	58
4.7.3. Elaboração e produção do Fitoquímico Injetável	58
4.8. Análise Estatística	58
5. RESULTADOS	59
5.1. Atividade neuromuscular de preparações nervo frênico diafragma de camundongos (NFD) - Controles Experimentais	59
5.2. Atividade neuromuscular de preparações NFD submetidas aos controles dos triterpenóides	60
5.2.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelos triterpenóides - NFD	61
5.2.2. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VCdt pelos triterpenóides - NFD	62
5.2.3. Análise morfológica em preparações NFD incubadas com os venenos de Bjssu e Cdt e neutralizações com os triterpenóides	63
5.3. Atividade neuromuscular de preparações NFD submetidas aos controles dos ácidos fenólicos	68
5.3.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelos ácidos fenólicos - NFD	69
5.4. Atividade neuromuscular de preparações NFD submetidas ao controle do flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona)	70
5.4.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelo flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona) - NFD	71
5.4.2. Análise morfológica em preparações NFD com o VBjssu e neutralização com o flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona)	72
5.5. Atividade neuromuscular em preparações NFD submetidas aos controles do antiveneno botrópico (AVB) e do triterpenóide (Betulina)	74
5.5.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelo antiveneno botrópico e pelo triterpenóide (Betulina)	75
5.6. <i>Screening</i> Farmacológico em preparações nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE), submetidas aos controles salina, antiveneno botrópico e do agente solubilizante polietilenoglicol 400	76

5.6.1. Resposta da atividade neuromuscular de preparações NPE submetidas ao controle salina, VBjssu e neutralização com antiveneno botrópico (AVB)	77
5.7. Elaboração e produção do Fitoquímico Injetável de Betulina.....	78
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO A	107
ANEXO B	108

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países megadiversos do mundo (BARTHLOTT; LAUER; PLACKE, 1996; LEWINSOHN; PRADO, 2005; OVERBECK et al., 2007). É contemplado por seis biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa (IBGE, 2004), sendo um dos países mais ricos em diversidade biológica e cultural (SOUZA; FELFILI, 2006). Em termos globais, este é um momento de plena valorização do naturalismo. Desta forma, o Brasil vem buscando avançar em políticas de longo prazo para a utilização dos recursos naturais de forma efetiva, responsável e consciente, garantindo o desenvolvimento futuro (EMBRAPA, 2010).

As serpentes sempre estiveram presentes na vida do homem e o ofidismo continua sendo um grave problema de saúde pública pela sua grande intensidade e gravidade (NUNES, 2007; CARDOSO; WEN, 2003) essencialmente em países tropicais, pela assiduidade que os acidentes ofídicos ocorrem e pelas morbimortalidade que ocasionam (PINHO; PEREIRA, 2001). No Brasil, somente no ano de 2010 foram notificados 29.635 casos de acidentes ofídicos (BRASIL, 2011).

Investigações de espécies vegetais de utilização medicinal empírica resultaram em alguns avanços terapêuticos e se encontram disponíveis atualmente (DI STASI, 1996; CALIXTO, 2005). Neste sentido, o uso de extratos vegetais e compostos quimicamente isolados (fitoquímicos) como antídotos para o envenenamento é uma prática comum e representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, que não dispõem da soroterapia (SOARES et al., 2005). Estudos farmacológicos têm demonstrado que extratos, frações e compostos isolados (fitoquímicos) obtidos de plantas medicinais e utilizados na medicina tradicional possuem diversas propriedades entre elas a antiofídica (MORS et al., 2000; JANUÁRIO et al., 2004; FERRAZ, et al., 2012) sendo conveniente sua exploração científica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Acidentes ofídicos

O envenenamento por animais peçonhentos tem recebido pequena atenção das autoridades de saúde, da indústria farmacêutica e mesmo das agências de fomento nas diversas partes do mundo. Entretanto, o ofidismo foi inserido como doença negligenciada (OMS, 2007) e os programas de saúde instituídos pelas autoridades, por entidades produtoras de soro antiofídico e por grupos de pesquisa, foram motivados na busca de soluções para essa temática.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorrem por ano no mundo cerca 421.000 acidentes, sendo que destes casos 21.000 levam à morte e cerca do triplo de casos, ou seja, 63.000 evoluem para amputação e invalidez permanente (OMS, 2011). As regiões mais atingidas são o sudeste da Ásia e a América Tropical. Dentre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes por ano (CARVALHO; NOGUEIRA, 1998).

Os acidentes ofídicos no Brasil são observados desde o período pré-colonial. Os primeiros registros sobre serpentes peçonhentas com interessantes observações clínico-epidemiológicas foram feitas por José de Anchieta, em 1560 na carta de São Vicente.

“... Até aqui tenho falado dos animais que vivem na água; tratarei agora dos terrestres, alguns dos quais são desconhecidos dessa parte do mundo. Primeiramente direi das diversas espécies de cobras venenosas. Algumas, chamadas jararacas, abundam nos campos, nas matas e até mesmo nas casas, onde muitas vezes as encontramos: a sua mordedura mata no espaço de vinte e quatro horas, posto que se lhe possa aplicar remédio e evitar algumas vezes a morte. Isto acontece com certeza entre os índios: se forem mordidos uma só vez e escapam à morte, mordidos daí por diante, não só não correm risco de vida, como sentem até menos dor, o que tivemos mais de uma vez ocasião de observar. A outra variedade denominam de boicininga, que quer dizer, “cobra que tine”, porque tem na cauda uma espécie de chocalho, com o qual soa quando assalta alguém. Vivem nos campos, em buracos subterrâneos; quando estão ocupadas na procriação atacam a gente; andam pela grama em saltos

de tal modo apressados, que os índios dizem que elas voam; uma só vez que mordam, não há mais remédio: paralisam a vista, o ouvido, o andar e todas as ações do corpo, ficando somente a dor e o sentimento do veneno espalhados pelo corpo todo, até que no fim de vinte e quatro horas se expira...” (CARTA DE SÃO VICENTE, 1560).

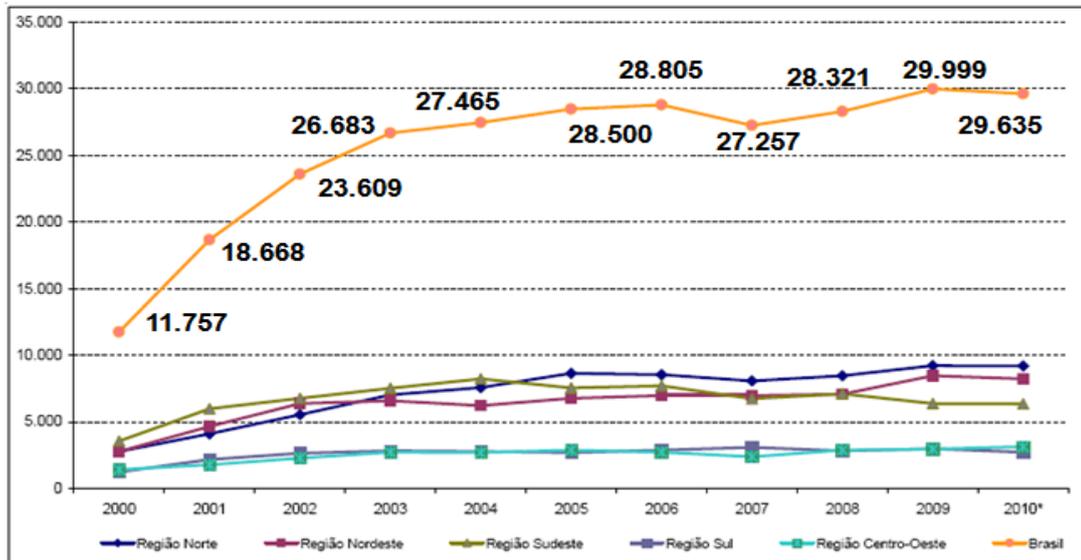
Os primeiros estudos epidemiológicos sobre acidentes ofídicos começaram a ser realizados por Vital Brazil em 1901 (BRASIL, 1901). A partir daí deu-se início à produção dos primeiros tubos de soros anti-peçonhentos para o consumo (VAZ, 1950). Logo em seguida, foram introduzidos os “Boletins para observação de accidentes ophidicos”. Estes eram enviados juntamente com as ampolas de soro, devendo ser preenchidos pelo usuário e devolvidos ao laboratório produtor. Esta estratégia foi adotada pelo Instituto Serumtherapico (atual Instituto Butantan) e posteriormente pelo Instituto Vital Brazil (CARDOSO; WEN, 2003). Os dados relatados destas notificações tornaram possível inúmeras publicações sobre ofidismo no Brasil, como o do próprio Vital Brazil (1911), Penteado (1918), Amaral (1930), Barroso (1944), Fonseca (1949) e Magalhães (1958) (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

O Sistema Nacional de Informações Tóxico – Farmacológicas registrou em 2004 a segunda principal causa de intoxicações em humanos que foram originadas por envenenamento de animais peçonhentos onde as estatísticas apontam um percentual de 24,75% perdendo apenas para as intoxicações provocadas por medicamentos com percentual 28,95% dos casos notificados (SINITOX, 2007).

O número de notificações de ofidismo no Brasil vem aumentando com os anos (Gráfico 1), sendo as serpentes peçonhentas as maiores responsáveis pelos números de casos, alcançando em 2010 uma porcentagem de 85% de acidentes (BRASIL, 2011). No entanto, os relatos de acidentes graves em humanos por serpentes não peçonhentas também vêm sendo descritos (ROCHA, 2005). Alguns casos foram ocasionados por espécies não peçonhentas denominadas de colubrídeos (BERNARDE, 2011) que estão atualmente classificadas na família Dipsadidae (ZAHER et al., 2009). A correta identificação dos gêneros de serpentes não peçonhentas também se faz importante para que seja poupado o uso desnecessário de soroterapia e complicações como choque anafilático em pacientes

que receberem soroterapia inadequada (SALOMÃO; ALBOLEA; ALMEIDA-SANTOS, 2003).

Gráfico 1 - Notificações dos casos de acidentes por serpentes no Brasil.



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) / Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde - atualizado em 01/04/2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_casos_por_mes_2010.pdf>. Acesso em: 22. jan. 2012.

2.2. Serpentes peçonhentas

Há, atualmente, cerca de 2900 espécies de serpentes, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (FRANCO, 2003). Estas serpentes são frequentemente encontradas nas regiões tropicais e em proximidades da linha do Equador, mas podem ser encontradas em todas as regiões do planeta, com exceção da Antártida (WHO, 2007).

A fauna de serpentes do Brasil é considerada uma das mais ricas do planeta com 366 espécies (BÉRNILS, 2009), sendo que 15% (55 espécies) dessas são peçonhentas e pertencentes às famílias Elapidae e Viperidae. As serpentes alocadas na família Viperidae são responsáveis pelos acidentes: botrópico, crotálico e laquético; e as serpentes presentes na família Elapidae são responsáveis pelo acidente elapídico (ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL, 2003).

2.3. O veneno ofídico

Segundo Frye (1991), as serpentes chamadas peçonhentas apresentam uma glândula salivar modificada e dentes especializados para a inoculação de suas substâncias tóxicas.

Os venenos de serpentes são considerados uma mistura de toxinas e enzimas que estão envolvidas na captura e digestão das presas, bem como defesa contra predadores (HODGSON; WICKRAMARATNA, 2002). Sua composição química e atividade biológica variam entre as famílias e os gêneros das serpentes (DOS-SANTOS, 2005). De maneira geral, os venenos ofídicos apresentam-se como misturas complexas de substâncias iônicas simples como o cálcio, que é um importante cofator de ação de algumas enzimas proteolíticas e das fosfolipases A₂; o magnésio, o zinco e substâncias como as proteínas incluindo as fosfolipases, miotoxinas, metaloproteases hemorrágicas e outras enzimas; neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, entre outros. Estes componentes possuem efeitos farmacológicos como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, edema, efeito anticoagulante, inibição da agregação plaquetária e, por fim, a letalidade (JIA et al., 1966; TU, 1977; BORGES et al., 2000).

Um dos maiores alvos dos venenos de serpentes é o sistema nervoso somático, em particular a junção neuromuscular. A inibição do neurotransmissor neste sítio resulta na paralisia dos músculos bulbares e oculares, assim como paralisia dos músculos respiratórios (LALLOO et al., 1996), resultando em morte.

As neurotoxinas dos venenos de serpentes que alteram a transmissão no nervo motor terminal tem sido de considerável importância clínica e objeto de inúmeras pesquisas, com a elucidação de suas estruturas proteicas e modo de ação. Devido aos avanços nas técnicas da química de proteínas, as neurotoxinas são continuamente isoladas do veneno de diversas espécies de serpentes (TU, 1996). Elas são as responsáveis pela paralisia neuromuscular e podem agir na junção pré-sináptica, através do bloqueio da liberação de acetilcolina, como na junção pós-sináptica, bloqueando os receptores nicotínicos (DAMICO et al., 2005).

Já as miotoxinas são geralmente definidas como componentes naturais dos venenos, que induzem danos irreversíveis às fibras do músculo esquelético (mionecrose) após injeção em animais superiores. Algumas miotoxinas atuam

localmente, danificando as fibras musculares no local e em áreas próximas da injeção do veneno, entretanto, outras atuam sistemicamente, causando danos musculares em locais distantes à injeção do veneno (LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

2.4. Gênero *Bothrops* Wagler

A nomenclatura zoológica sempre alternou períodos de estabilidade e instabilidade, resultantes de estudos taxonômicos que modificam o entendimento das relações filogenéticas (evolutivas) entre os táxons. A classificação das serpentes se torna necessária para o reconhecimento das espécies de importância médica, base para os estudos toxicológicos e de importância crítica para as estratégias de formulação do antiveneno no tratamento dos pacientes (WÜSTER; GOLAY; WARRELL, 1997; 1998; 1999). A importância e necessidade dessas mudanças na classificação estão no fato de apresentarem as relações de parentesco entre as espécies e isso implica nas similaridades e diferenças entre a complexa variação dos venenos (MACKESSY, 2009). Recentemente, o gênero *Bothrops* cujos acidentes são denominados botrópicos (FRANÇA; MALAQUE, 2003) passou por mudanças em sua nomenclatura, sendo este gênero distribuído em outros cinco (*Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis*) (FENWICK et al., 2009). No entanto, depois da avaliação taxonômica feita por Carrasco et al., (2012), foi sugerida uma retificação e um rearranjo demonstrando que o gênero *Bothrops* se mostra como monofilético e suporta cinco sinapomorfias. Desta forma, este gênero foi restabelecido e aceito pela sociedade brasileira de herpetologia, responsável pela produção e atualização da lista brasileira de répteis.

O gênero *Bothrops* é um dos grupos mais importantes de serpentes peçonhentas do Brasil. É representado por mais de 60 espécies encontradas em todo o território brasileiro. As principais espécies são: *Bothrops atrox*, o ofídio mais encontrado na Amazônia, principalmente em beiras de rios e igarapés; *Bothrops erythromelas*, abundante nas áreas litorâneas e úmidas da região Nordeste; *Bothrops jararaca*, que possui grande capacidade adaptativa, ocupa e coloniza tanto áreas silvestres como agrícolas e periurbanas, sendo a espécie mais comum da região Sudeste; *Bothrops moojeni*, a principal espécie dos cerrados, capaz de se

adaptar aos ambientes modificados, com comportamento agressivo e porte avantajado; *Bothrops jararacussu*, a espécie que pode alcançar o maior comprimento e que produz a maior quantidade de veneno dentre as serpentes do gênero, predominante nas regiões Sul e Sudeste; e *Bothrops alternatus*, que vive em campos e outras áreas abertas, da região Centro-Oeste a Sul (BRASIL, 2005).

Apresentam fosseta loreal, cauda lisa e presa inoculadora de veneno. Possuem hábitos variados, podendo ser encontradas penduradas em árvores, enterradas, entocadas, à beira dos rios ou dentro da água (BOCHNER, 1999). São geralmente encontradas em áreas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos e ou regiões próximas à vegetação densa, pois elas buscam alimentos como os roedores. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruído (MELGAREJO, 2003).

Os venenos botrópicos possuem enzimas proteolíticas que degradam diversos substratos naturais como caseína, hemoglobina, elastina e colágeno. De maneira geral, o envenenamento por *Bothrops* causa dor intensa, inflamação (edema e eritema), equimose, bolhas e necrose (ação proteolítica) na região da picada e, sistemicamente, ativa a cascata da coagulação podendo induzir a incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (ação coagulante) e ação hemorrágica atuando no endotélio vascular na região da picada e em locais distantes. A necrose local frequentemente afeta a pele e as camadas musculares mais profundas. Em casos mais severos pode haver a completa destruição do tecido, perda do membro, choques e insuficiência renal, podendo levar ao óbito (TU, 1977; JORGE; RIBEIRO, 1990; SILVA et al., 1991; JORGE et al., 1995; RIBEIRO; JORGE, 1997).

2.4.1. *Bothrops jararacussu*

A *Bothrops jararacussu* (*B. jararacussu* - Figura 1) é uma serpente de grande porte, podendo atingir até 1,8 m de comprimento. Possui cabeça grande, negra e estrias amarelas pós-oculares, exibindo no dorso de tom aveludado, o contraste entre o negro e o amarelo – dourado. Está distribuída geograficamente pelo território sul-americano: Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina e no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares.

Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruído (MELGAREJO, 2003).

Figura 1 - *Bothrops jararacussu* (jararacuçu).



Fonte: Silvia Cardoso

O veneno da *B. jararacussu* (VBjssu) tem sido estudado desde 1900 (BRASIL, 1903) e esta serpente é a responsável por produzir a maior quantidade de veneno dentre as serpentes de seu gênero (MELGAREJO, 2003) sendo possível obter cerca de 2 mL por extração, o que em média significa 500 mg de veneno seco (BELLUOMINI 1964).

O VBjssu possui propriedades miotóxicas e neurotóxicas (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; HELUANY et al., 1992; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1995; SOARES et al., 2002; OSHIMA-FRANCO et al., 2000; 2001; 2002; 2004) e os efeitos produzidos por ele passaram a ser descritos a partir de estudos em preparações neuromusculares de rã (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983), onde autores observaram que o veneno inibia as contrações musculares evocadas direta e indiretamente e abolia o potencial de ação composto do nervo e do músculo. Após o fracionamento do veneno, estas atividades foram reproduzidas por uma subfração, denominada Pool IV, composta de dois polipeptídeos com um peso molecular de aproximadamente 14 kDa, que continha 30% do conteúdo protéico do veneno total. A fração ativa apresentava baixos níveis de atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂), era desprovida de atividade proteolítica e induzia um rápido e pronunciado efeito despolarizante. Este último foi considerado o responsável pelo bloqueio do potencial de ação do composto. Mais tarde, o Pool IV foi purificado e caracterizado como uma

miotoxina, a Bothropstoxina-I (BthTX-I), com estrutura PLA₂, desprovida de atividade catalítica, componente responsável pela atividade miotóxica do veneno bruto (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; CINTRA et al., 1993). A miotoxicidade é uma ação específica do VBjssu sobre o músculo esquelético, causado por 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). A neurotoxicidade foi avaliada pela capacidade do VBjssu causar bloqueio neuromuscular (OSHIMA-FRANCO et al., 2000).

2.5. Gênero *Crotalus* Linnaeus

As cascavéis (gênero *Crotalus*) são espécies de serpentes robustas, ágeis e de hábitos terrestres. Estas serpentes são facilmente identificadas por apresentarem na extremidade caudal um guizo ou chocalho (MELGAREJO, 2003).

O acidente com essas serpentes é denominado crotálico (ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL; 2003; AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003) sendo considerado o acidente de maior letalidade entre os ofídicos (PINHO; OLIVEIRA; FALEIROS, 2004; BARRAVIERA; PEREIRA, 1999). Apresenta índices com elevada mortalidade. No ano 2010, dos 29.635 acidentes ocorridos 10,2% eram crotálicos (BRASIL, 2010).

A representação deste gênero no Brasil se dá por uma única espécie, a *Crotalus durissus*, a qual apresenta uma vasta distribuição geográfica. Este gênero de serpente está distribuído por todo território brasileiro, podendo ser encontrado desde os cerrados do Brasil central, até as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, seguindo pelo extremo Sul e Norte do país. Essa espécie é subdividida em cinco subespécies: a *Crotalus durissus terrificus*, predominante das regiões Sudeste e Sul; a *Crotalus durissus collilineatus*, comum da região centro-oeste até o estado de Rondônia; a *Crotalus durissus cascavella*, a cascavel nordestina, 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).

2.5.1. *Crotalus durissus terrificus*

A subespécie *Crotalus durissus terrificus* (Figura 2) é a principal responsável pelos acidentes notificados no país e responsável por quase todos os casos que ocorrem do gênero crotálico. Possui ampla distribuição geográfica, desde os cerrados do Brasil central, regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, até os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. Estas serpentes possuem um eficiente aparelho inoculador de peçonha. Portanto, provavelmente inocula o veneno por via intramuscular e/ou subcutânea (RIBEIRO et al., 1993; BRASIL 2005).

Figura 2 - *Crotalus durissus terrificus* (cascavel).



Fonte: Silvia Cardoso

As toxinas presentes no veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) segundo VARANDA; GIANNINI, (1994) são a crotamina, crotapotina, crotoxina, fosfolipase A₂, giroxina e convulxina. A crotapotina e a fosfolipase A₂, formam uma fração do veneno chamada crotoxina (ctx) que provoca alterações anatomopatológicas após quatro a seis horas da inoculação e causam paralisia neuromuscular semelhante ao efeito causado pelos curares (BARRAVIERA, 1990). A interação entre as duas subunidades, fosfolipase A₂ e crotapotina, confere ao componente ctx sua alta toxicidade (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978), e representa cerca de 60% do

veneno total, além de ser a principal responsável pela neurotoxicidade deste veneno (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938; BREITHAUPT, 1976).

O envenenamento humano causado por *Crotalus durissus terrificus*, 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 VCdt, os pacientes apresentam quadro de rabdomiólise generalizada e consequente mioglobínúria (MAGALHÃES et al., 1986; AZEVEDO-MARQUES et al., 1987; SANTORO et al., 1999). Esses efeitos, associados a outros fatores como desidratação e hipotensão, podem provocar insuficiência renal aguda com comprometimento de néfrons (AMORIM; FRANCO DE MELLO; SALIBA, 1969), principal causa de óbito nesses envenenamentos (AMARAL et al., 1986).

Apesar dos efeitos sistêmicos marcantes, nos acidentes causados pela subespécie *Crotalus durissus terrificus*, não são observados sinais inflamatórios significativos no local da picada, (AMORIM; FRANCO DE MELLO; SALIBA, 1951; ROSENFELD, 1971) diferente do que é observado em acidentes causados por outros gêneros de serpentes, entre eles, o gênero *Bothrops* (ROSENFELD, 1971; GUTIERREZ; LOMONTE, 1989).

2.6. Tratamento Soroterápico

A soroterapia constitui o tratamento específico em casos de acidentes com animais peçonhentos, desde que administrada em tempo, dose e via adequados, sendo considerado o tratamento mais apropriado em casos de acidentes com serpentes. A produção nacional do soro cabe às entidades governamentais: Instituto Butantan em São Paulo, Fundação Ezequiel Dias em Minas Gerais, Instituto Vital Brazil no Rio de Janeiro e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiologia (CPPI) no Paraná (BRASIL, 2001).

Apesar da eficiência na neutralização dos efeitos sistêmicos, a soroterapia tem ação limitada para a melhoria do quadro local devido à elevada ação proteolítica dos

venenos de serpentes (BRASIL, 2001; ZAMUNER et al., 2004), resultando no aparecimento de sequelas graves e perda tecidual. A efetividade da soroterapia em prevenir o dano tecidual local é limitada, pelo menos em parte, pela rápida ação das toxinas comparada com a distribuição lenta de anticorpos (LOMONTE; LEON; HANSON, 1996).

O soro é caracterizado como neutralizador do veneno, não determinando a regeneração das hemácias, do endotélio e dos tecidos em geral, apenas evitando a progressão destes fenômenos, fazendo-se necessário instituir medidas de suporte como a elevação do membro afetado, uso de analgésicos, hidratação e antibioticoterapia (ARAÚJO et al., 2003). Sgarbi et al. (1995) afirmam que o tratamento com soro antiofídico será mais eficiente quando administrado o quanto antes, melhorando assim, o prognóstico do paciente.

Algumas alternativas como o uso de extratos de plantas medicinais, têm sido propostas como coadjuvantes dos antivenenos, devido a várias plantas já apresentarem atividade antiofídica (MORS et al., 2000). No entanto, é função da pesquisa investigar e comprovar cientificamente se uma planta é realmente dotada de ações farmacológicas.

2.7. Importância do estudo com plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Essa tendência pode ser explicada por diferentes fatores, destacando-se entre eles o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos fármacos sintéticos, preferência dos consumidores por “produtos naturais”, a certificação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do Controle de Qualidade, o desenvolvimento de novas formas de preparação e administração de produtos fitoterápicos, um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados (DI STASI, 1996; CAÑIGUERAL; DELLACASSA; BANDONI, 2003; VIEIRA, 2001).

Os autores Teske; Trentini (2001) trazem diversos aspectos históricos sobre o descobrimento das propriedades curativas das plantas. Segundo estudos de

arqueologia, ainda em épocas a.C. os homens buscavam nas ervas a cura para suas afecções, de forma meramente intuitiva. Os Egípcios tiveram seus conhecimentos difundidos mais tarde para a Mesopotâmia, mas foram, os gregos, e em seguida os romanos, que herdaram e aperfeiçoaram os conhecimentos egípcios. Hipócrates reuniu a totalidade dos conhecimentos médicos de seu tempo no conjunto de tratados conhecidos pelo nome de *Corpus Hipocraticum*, onde, para cada enfermidade, descreve um remédio vegetal e o tratamento correspondente. Já no início da era cristã, Dioscórides, descreve minuciosamente em seu tratado *De Materia Medica* (ao pé da letra, matéria medicinal), mais de 500 drogas de origem vegetal, mineral ou animal. Este tratado foi à última palavra no assunto durante cerca de quinze séculos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; TESKE; TRENTINI, 2001). Finalmente, o grego Galeno, ligou o seu nome ao que ainda se denomina "farmácia galênica", onde as plantas não eram mais utilizadas na forma de pó e sim em preparações, feitas utilizando-se solventes como álcool, água ou vinagre, que serviam para conservar e concentrar os componentes ativos das plantas, empregados para preparar unguentos, emplastos e outras formas galênicas. No período histórico conhecido como Idade Moderna (século XV) houve uma preocupação em catalogar um grande número de vegetais, identificando-os e classificando-os de acordo com a procedência, e características dos princípios ativos. Finalmente, os esforços de classificação culminaram, em 1735, com a publicação de *Systema Naturae*, de Lineu (TESKE; TRENTINI, 2001).

Gradualmente, à medida que crescia o conhecimento sobre medicamentos, surgiu a necessidade de criar disciplinas especializadas. No início do século XIX, a *Matéria Médica* começou a ser dividida em farmacologia (estudo da ação dos medicamentos) e em farmacognosia (estudo de todos os aspectos dos medicamentos, com menor ênfase na ação). No fim do século XIX, os químicos começaram, cada vez mais, a sintetizar um grande número de compostos orgânicos com estruturas complexas, alguns dos quais úteis terapêuticamente. Com isso, os estudos dos medicamentos ganham uma nova ciência, a química farmacêutica. Mas, foi nas últimas décadas do século XX, que ocorreram três fatos importantes que produziram mudanças fundamentais.

Em primeiro lugar, a insatisfação com a eficácia e o custo da medicina moderna aliada à admiração pelas coisas "naturais" e "orgânicas", levou milhões de pessoas no mundo todo a apreciar melhor o uso de medicamentos naturais clássicos para o

tratamento de muitas doenças. A revolução “verde” em termos de medicina natural atingiu incrível popularidade nos Estados Unidos, e não há dúvidas de que a demanda dos consumidores fará crescer cada vez mais o interesse pelas plantas medicinais clássicas, usando-as na forma dos tradicionais medicamentos de origem vegetal. Além disso, as principais indústrias farmacêuticas reconheceram que determinadas plantas utilizadas na medicina popular provavelmente eram as melhores fontes de componentes para novos medicamentos. Diversas indústrias farmacêuticas já assinaram acordos de cooperação com pessoas físicas ou órgãos públicos, para a investigação de plantas medicinais em alguns países entre os quais, Costa Rica, China, México, Bornéu, Samoa e o Brasil (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Contando com uma abundante flora e despertando o interesse de comunidades científicas, o Brasil vem se destacando pela sua diversidade biológica, que pode ser explorada para o estudo, conservação e utilização racional dos recursos naturais (SOUZA; FELFILI, 2006). A diversidade vegetal brasileira conta com mais de 60 mil espécies catalogadas de um total de 350.000 a 550.000 (SIMÕES, 2000; IBAMA, 2001). O surgimento de uma medicina popular com uso das plantas deveu-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus. Esse processo de miscigenação gerou uma diversificada bagagem de usos para as plantas e seus aspectos medicinais, que sobreviveram de modo marginal até a atualidade (ARAÚJO, 1979).

Acidentes ofídicos podem causar sequelas, muitas vezes incapacitantes e, por isso, a investigação de substâncias que atenuem os efeitos tóxicos locais dos venenos é extremamente desejável. As plantas, por sua vez, representam uma interessante alternativa, pois estão presentes de forma abundante na natureza e são de fácil acesso. Elas têm sido frequentemente usadas pelos humanos contra numerosas doenças causadas por diversos agentes patológicos (MORS et al., 2000; MAISTRO; CARVALHO; MANTOVANI, 2004).

A aplicabilidade de plantas medicinais com poder antiofídico vem sendo registrada em diversos estudos e acredita-se que isso se deve a presença dos inúmeros compostos ativos presentes nas mesmas (SOARES et al., 2005), podendo-se citar como exemplo a *Casearia sylvestris* Swartz (RUPPELT et al., 1991; BORGES et al., 2000; CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008b) a *Casearia gossypiosperma* Briquet (CAMARGO et al., 2010; SILVA, 2012), a *Diospyros kaki*

(CHILPA; ESTRADA, 1995), a *Plathymentia reticulata* Benth (FARRAPO, 2010), a *Mikania glomerata* (MAIORANO et al., 2005) e a *Mikania laevigata* (COLLAÇO et al., 2012).

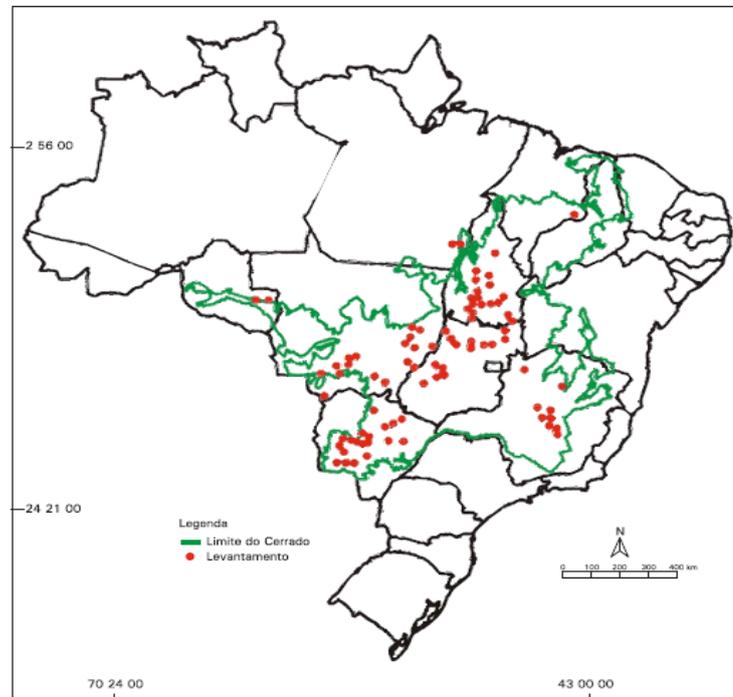
2.8 *Dipteryx alata* Vogel

O bioma cerrado possui mais de 6.000 plantas vasculares (MENDONÇA et al., 1998), muitas dessas plantas possuem valor alimentício e medicinal. A biodiversidade e o potencial econômico do cerrado brasileiro, desde 1886, já eram descritos em inventários (ALMEIDA et al., 1998), testemunhando a sua riqueza em plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, tintas, cordoaria, lixas, substâncias tóxicas, têxteis, forragem e ornamentação.

O potencial deste bioma também pode ser salientado citando-se a espécie *Dipteryx alata* Vogel (*D. alata*), popularmente conhecida como Baru, árvore da família Leguminosae que faz parte do grupo das espécies nativas usadas pela população regional como fonte de renda familiar. É uma das espécies mais promissoras para cultivo, devido a seu uso múltiplo, alta taxa de germinação de sementes e de estabelecimento de mudas (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

No Brasil, a *D. alata* tem ocorrência em 84 localidades (Figura 3), em 8 estados da federação (RATTER et al., 2003). Além disso, essa espécie pode ser encontrada também no Paraguai e nas cercanias do complexo do Pantanal (RATTER et al., 2000). A ocorrência foi esparsa nos Estados de Tocantins, Goiás e Mato Grosso do Sul, enquanto em Mato Grosso, concentrou-se ao sul e a leste do Estado (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

Figura 3 - Distribuição geográfica do baru em 84 localidades entre 316 levantamentos no Bioma Cerrado.



Fonte: Ratter et al., (2000).

O nome popular varia de acordo com o local, os mais conhecidos são baru nos Estados de Goiás, Tocantins, Minas Gerais e Distrito Federal, e, cumaru ou cumbaru em São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Os outros nomes que incluem diferentes espécies são: barujó, castanha-de-burro, castanha-de-ferro, coco-feijão, cumaru-da-folha-grande, cumarurana, cumaru-roxo, cumaru verdadeiro, cumbaru, emburena-brava, feijão-coco, fruta-de-macaco, meriparagê, pau-cumaru. No exterior, o baru é conhecido como tonka beans (PIO CORRÊA, 1984; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

A planta *D. alata*, é uma espécie nativa e apresenta, também, grande importância ecológica, podendo ser classificada como espécie-chave do Cerrado, uma vez que seu fruto amadurece na época seca e alimenta várias espécies da fauna dessa região, incluindo o gado. As espécies nativas, em oposição às plantas exóticas, raramente são cultivadas, sendo obtidas na quase totalidade das formações vegetais brasileiras por processos de extrativismo (SCHEFFER; MING; ARAUJO, 2002), entretanto, há de se pensar que o extrativismo quando excessivo pode provocar desequilíbrio para várias espécies da fauna nativa. Seu uso

sustentável pode contribuir na conservação da biodiversidade desse bioma, podendo ser valorizado como produto que contribui para a conservação da natureza e aplicado em diversas formas, desde alimentar, forrageiro, madeireiro, industrial, paisagismo e medicinal (SANO; RIBEIRO; BRITO 2004).

A *D. alata* (Figura 4) é uma árvore reta com altura média de 15 m, podendo alcançar mais de 25 m em solos mais férteis. A copa pode ser alongada ou larga, de 6 a 11 m de diâmetro. As folhas são alternas, compostas e pecioladas. Possuem nervuras medianas planas na fase ventral e nervuras secundárias numerosas, ascendentes, igualmente salientes nas duas faces (ALMEIDA et al., 1998; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

A inflorescência do tipo panícula é formada na parte terminal dos ramos e nas axilas das folhas superiores, com cerca de 200 a 1000 flores. As flores são hermafroditas com aproximadamente 0,8 cm de comprimento (ALMEIDA et al., 1998).

Figura 4 - *Dipteryx alata* Vogel (Baru).



Fonte: Márcia Aparecida de Brito.

Os frutos da *D. alata* são descritos como sendo drupas tendo por volta de 1,5 a 5 cm de comprimento, com polpa rica em proteína, aromática, muito consumida pelo

gado, animais silvestres (LORENZI, 1992) e pelo homem, na forma de doces (TOGASHI, 1995).

As propriedades medicinais descritas a respeito da *D. alata* tratam do óleo extraído da semente, que também é comestível e nutritiva. Produz um óleo muito fino com 81% de insaturação, comparável ao de oliva (RIZZINI, 1976; PIO CORRÊA, 1984; LORENZI, 1992), podendo ser empregado como antirreumático (FERREIRA, 1980; BARROS, 1982), além de apresentar propriedades sudoríferas, tônicas e reguladoras da menstruação (CORRÊA, 1931). Fonteles et al. (1988) e Matos et al. (1988) isolaram o betafarneseno que apresenta ação inibidora sobre atividades mediadas por acetilcolina em animais. Da casca do tronco, usada na cura de dores na coluna, foram extraídos três triterpenos pentacíclicos: Lupeol, Lupen-3-ona e Betulina (KAPLAN et al., 1966). A Ichimaru Pharcos Inc. solicitou patente, em 2002, ao obter uma substância que inibe a formação de melanina, a partir de extrato etanólico, não divulgando qual parte da planta foi utilizada (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

2.9. Fitoquímicos

As plantas apresentam substâncias ativas que são classificadas em substâncias do metabolismo primário e substâncias do metabolismo secundário. Os compostos denominados metabólitos primários, são substâncias indispensáveis à vida do vegetal tais como carboidratos, aminoácidos e lipídios. Os metabólitos secundários são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários (SIMÕES, 2000; LÓPEZ, 2006). Para os aspectos funcionais da vida vegetal os metabólitos secundários são substâncias que garantem vantagens para sobrevivência e perpetuação da espécie. De acordo com HARBORNE (1988) a riqueza dos metabólitos secundários nas plantas é explicável pelo simples fato delas estarem enraizadas no solo, não poderem se deslocar e responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais. Os metabólitos secundários 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).

Os metabólitos secundários são denominados fitoquímicos. O termo “fitoquímico” refere-se a um grupo amplo de compostos produzidos e acumulados nas plantas (PIOVACARI, 2009), eles compreendem um grupo numerosíssimo de substâncias tais como: alcalóides, taninos, mucilagens, saponinas, cumarinas, flavonóides, antraderivados, óleos essenciais, resinas, gomas, glicosídeos, etc (GÜNTZEL, 2008). Estes constituintes vêm sendo considerados como potências terapêuticas quando isolados de plantas medicinais representando uma ajuda adicional na terapia sérica tradicional, sendo úteis como modelos moleculares para novos fármacos de baixo preço, poucos efeitos colaterais e facilmente distribuídos nas comunidades de longe acesso ao medicamento (SOARES et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007).

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).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e dos fitoquímicos, 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.

Estudos prévios com extrato etanólico de cascas da planta *Dipteryx alata*, demonstraram grande capacidade em impedir o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu*, mas não de *Crotalus durissus terrificus* (NAZATO et al., 2010), mostrando que o efeito protetor depende do tipo de veneno. Desta forma, a partir da identificação estrutural dos constituintes da planta, é possível estabelecer os possíveis mecanismos de ação do veneno, da planta, da interação veneno-planta e avançar para possíveis terapias alternativas e inovadoras. Sendo assim, frações de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) obtidas do extrato etanólico de *Dipteryx alata* Vogel foram purificadas até obtenção de compostos isolados (fitoquímicos) que resultaram em 18 compostos fitoquímicos (PUEBLA et al., 2010). Neste sentido, a premissa deste trabalho foi avaliar farmacologicamente a ação de três grupos de fitoquímicos (triterpenóides, ácidos fenólicos e flavonóides) frente aos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS

Realizar o estudo biomonitorado com os fitoquímicos isolados da planta *Dipteryx alata* Vogel contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*.

3.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar farmacologicamente, contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus* em preparações *ex vivo* (nervo frênico-diafragma de camundongos), os triterpenóides (Lupeol, Betulina, 28-Hidroxilupenona e Lupenona) obtidos das frações hexano e diclorometano do extrato de *Dipteryx alata*.
 - Realizar estudos morfológicos com os músculos diafragmas resultantes do tratamento acima com melhor ação neutralizante contra os venenos.

- ✓ Eleger dentre os triterpenóides, o fitoquímico com melhor ação neutralizante contra o veneno de *Bothrops jararacussu*, e:
 - Conduzir ensaios de neutralização em preparações *ex vivo* em comparação com o antiveneno botrópico comercial;
 - Formular um fitoquímico injetável e avaliar sua osmolaridade em comparação ao soro fisiológico injetável.

- ✓ Realizar ensaios em preparações *in situ* (nervo ciático-poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato) com salina, Polietilenoglicol 400, antiveneno botrópico comercial, veneno de *Bothrops jararacussu* e ensaios com administração do veneno de *Bothrops jararacussu* seguido de injeção intravenosa de antiveneno botrópico comercial.

- ✓ Avaliar farmacologicamente, contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, os ácidos fenólicos (Ácido Protocatecuico, Ácido Vanílico e Vanilina) comerciais, pois os mesmos foram isolados da fração diclorometano da *Dipteryx alata*, em pequena quantidade.

- ✓ Avaliar farmacologicamente, contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* a atividade do flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona) obtido da fração diclorometano da *Dipteryx alata*.
 - Realizar estudos morfológicos dos músculos diafragmas resultantes do tratamento acima.

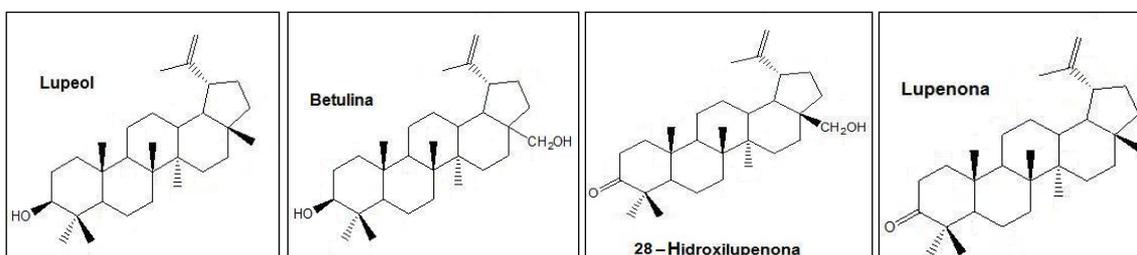
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material botânico

As frações hexano e diclorometano obtidas do extrato etanólico de *Dipteryx alata* Vogel foram cromatografadas exaustivamente até obtenção de compostos elucidados (fitoquímicos), na Universidade de Salamanca (Processo Fapesp 2007/53883-6 e 2009/11005-5), resultando em 18 fitoquímicos. Em seguida, 8 fitoquímicos foram doados pela Profa. Dra. Yoko Oshima Franco e ensaiados farmacologicamente.

Todos os triterpenóides (Figura 5): Lupeol (1500 mg), Betulina (216 mg), 28-Hidroxilupenona (180 mg) e Lupenona (330 mg), foram obtidos em maior rendimento. Também foi adquirido comercialmente o fitoquímico Betulina para formulação do injetável.

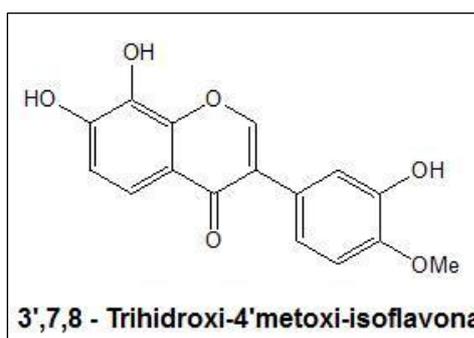
Figura 5 - Estrutura química dos triterpenóides.



Fonte: OSHIMA-FRANCO, 2009.

O flavonóide (Figura 6): 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona (19 mg) obtido apresentou pequeno rendimento não estando disponível comercialmente.

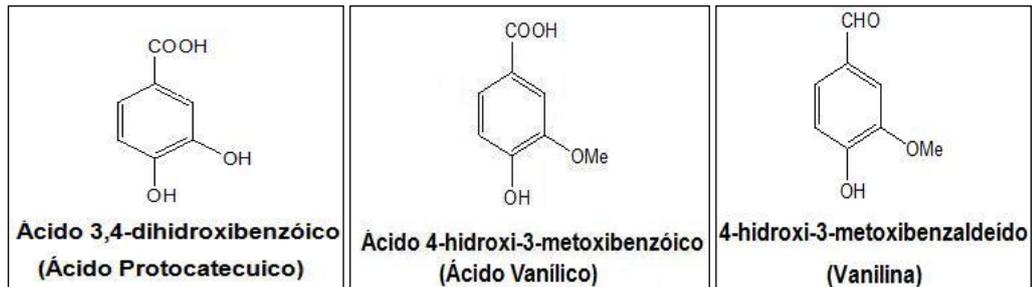
Figura 6 - Estrutura química do flavonóide.



Fonte: OSHIMA-FRANCO, 2009.

E os ácidos fenólicos (Figura 7): Ácido Protocatecuico (200 mg), Ácido Vanílico (8 mg) e Vanilina (12 mg), todos encontrados em frações do extrato de *Dipteryx alata* Vogel e disponíveis comercialmente. Neste trabalho todos os ensaios foram realizados com os ácidos fenólicos comerciais.

Figura 7 - Estrutura química dos ácidos fenólicos.



Fonte: OSHIMA-FRANCO, 2009.

4.1.1. Solubilização dos Fitoquímicos

De acordo com Cintra-Francischinelli et al., (2008a) Dimetil Sulfóxido (DMSO, F. Maia®) e Polietilenoglicol 400 (PEG 400, Synth®) são os melhores veículos para solubilização de compostos em experiências com animais uma vez que agentes de solubilização geralmente têm efeitos farmacológicos que podem interferir com a substância em estudo.

Para solubilização levaram-se em consideração as características apolares ou polares dos três grupos de fitoquímicos sendo realizados testes de solubilização para identificação do melhor agente solubilizante (DMSO ou PEG 400). Em todos os ensaios farmacológicos os fitoquímicos foram solubilizados com 30 µL de DMSO ou com 15 µL de PEG 400 (concentração utilizada que não apresenta interferência na resposta basal da preparação).

4.2. Veneno

Os venenos brutos foram obtidos a partir de dois exemplares adultos de *Bothrops jararacussu* e dezoito exemplares adultos *Crotalus durissus terrificus*, mantidos “*in natura*” no Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) -

Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D) – Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, São José dos Campos, SP. Em seguida os venenos foram liofilizados, certificados e doados pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo.

4.3. Antiveneno Botrópico Comercial (AVB)

O antiveneno botrópico (AVB) que já exibiu prazo de validade excedido, foi doado pela Vigilância Epidemiológica de Piracicaba sendo proveniente do Instituto Butantan (Lote: 0911259/C - 04 frascos). Os experimentos realizados neste trabalho seguem as doses recomendadas na bula do AVB (1,0 mL de AVB para 5,0 mg de veneno de *Bothrops jararaca*).

4.4. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, pesando de 25 a 30 g, e ratos machos da linhagem *Wistar*, pesando de 300 a 400 g, adquiridos da Anilab, (Paulínia, SP). Os animais 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 um sistema fechado e com o ambiente padronizado, foram controlados e registrados a temperatura ($22\text{ °C} \pm 2$), e a umidade ($45\% \pm 15$).

Foram colocados 04 camundongos por gaiola (microambiente livre de contaminação externa, com exaustão apropriada e ventilação individual diretamente no interior da gaiola).

Foi colocado 01 rato por gaiola (microambiente livre de contaminação externa, com exaustão apropriada e ventilação individual diretamente no interior da gaiola).

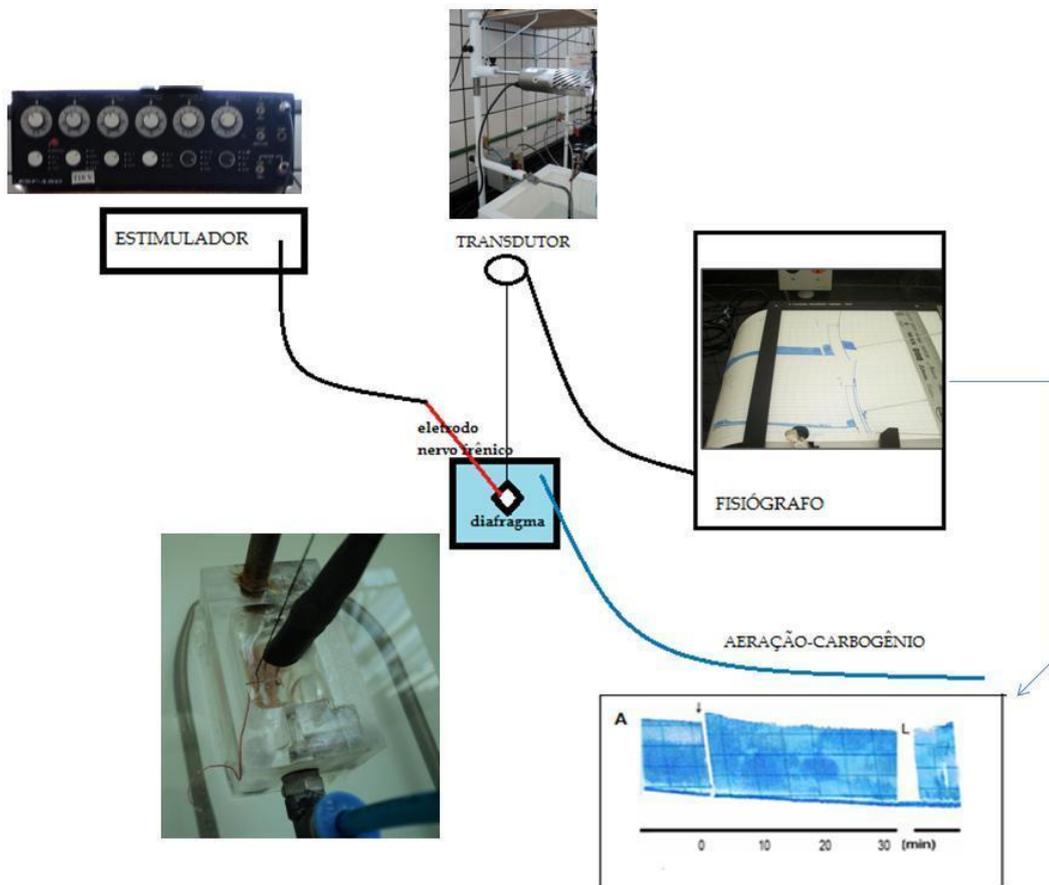
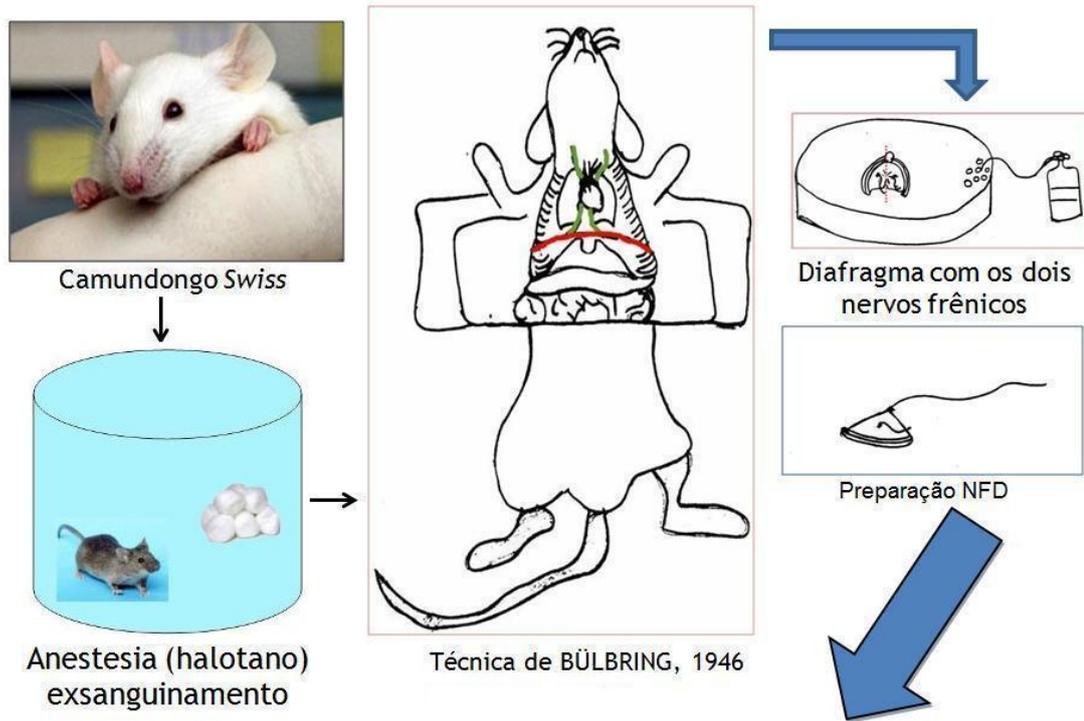
A maravalha utilizada como cama para os camundongos e ratos é livre de substâncias químicas, sendo a madeira macia e absorvente. As gaiolas são devidamente protegidas da ação direta da luz (lâmpadas frias) com ciclos de 12/12 h de luz e escuridão.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEAA) (Protocolo nº A013 / CEUA/ 2011), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

4.5. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD) – Modelo *ex vivo*

Os camundongos foram anestesiados com halotano, por via inalatória e posteriormente exsanguinados pela secção e sangria dos vasos cervicais. A preparação nervo frênico-diafragma (Figura 8) foi retirada conforme o protocolo proposto por Bülbring (1946) adaptado para camundongos e colocada em cuba com capacidade para 5 mL contendo 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, presa através dos músculos da costela por ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Uma tensão de 5 g/cm foi aplicada por meio de um fio preso a porção tendinosa. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo que se manteve em contato com a superfície da solução nutritiva. O registro da contração muscular foi alcançado através do transdutor isométrico cat. 7003, acoplado a um fisiógrafo 2-Channel Recorder Gemini cat. 7070, contendo amplificadores Basic Preamplifiers cat. 7080 (Ugo Basile®). Em seguida, a preparação, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico (estimulador fisiológico duplo ESF-15D), usando-se estímulos supraximais e frequência de 0,1 hertz com duração de 0,2 milisegundos.

Figura 8 - Esquemática do isolamento da preparação nervo frênico-diafragma.



Fonte: Rita de Cássia Collaço e Lourdita Fazano Moraes, adaptado.

Após o registro em condições controle durante 15 a 20 minutos de estabilização da preparação, foram realizados protocolos farmacológicos. Realizaram-se experimentos controles com solução nutritiva de Tyrode. Em todos os experimentos foram utilizadas concentrações de 40 µg/mL do veneno de Bjsu e 10 µg/mL para o veneno de Cdt, por apresentarem nestas concentrações bloqueio neuromuscular irreversível. A escolha destas doses foi feita após a realização de experimentos em estudos anteriores.

4.5.1. Controles Experimentais dos Fitoquímicos

Realizaram-se experimentos controles com os diversos fitoquímicos ensaiados farmacologicamente (Lupeol, Betulina, 28-Hidroxilupenona, Lupenona, Ácido Vanílico, Vanilina, Ácido Protocatecuico, 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona). Estabeleceu-se que a concentração dos fitoquímicos a ser estudada fosse de 200 µg/mL (1 mg/ 5 mL – volume da cuba donde se encontra a preparação), só devendo-se buscar outras concentrações quando a eleita apresentasse como alteração na resposta basal, o bloqueio neuromuscular.

4.5.2. Ensaio de neutralização da atividade bloqueadora do VBjsu – NFD

Para os ensaios de neutralização com o veneno de Bjsu (40 µg/mL) os fitoquímicos utilizados na concentração de 200 µg/mL foram os seguintes: Lupeol, Betulina, 28-Hidroxilupenona, Lupenona, Ácido Vanílico, Ácido Protocatecuico e 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona. O fitoquímico Vanilina apresentou bloqueio neuromuscular na concentração 200 µg/mL e por isto foram testadas as concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. A concentração eleita para os ensaios de neutralização foi a de 50 µg/mL.

Misturas do VBjsu-Fitoquímicos e VBjsu-AVB foram pré-incubadas a 37°C, por 30 minutos e, posteriormente adicionados à preparação, para determinar a capacidade neutralizante dos fitoquímicos e do antiveneno botrópico.

4.5.3. Ensaio de neutralização da atividade bloqueadora do VCdt – NFD

Para os ensaios de neutralização com o veneno de Cdt (10 µg/mL) foram selecionados os fitoquímicos que melhor neutralizaram (apresentaram maior atividade) o veneno de Cdt. Desta forma os fitoquímicos utilizados na concentração de 200 µg/mL foram: Lupeol, Betulina, 28-Hidroxilupenona e Lupenona. Misturas do VCdt-Fitoquímicos foram pré-incubados a 37°C, por 30 minutos e, posteriormente adicionados à preparação, para determinar a capacidade neutralizante dos fitoquímicos.

4.6. Análise Morfológica

Após a exposição aos diferentes tratamentos farmacológicos por 120 minutos, as preparações neuromusculares foram pré-fixadas em Bouin, por 24 horas. Para este procedimento foi utilizado n=3 para cada protocolo. Apenas os fitoquímicos com que apresentaram maior significância contra os venenos de Bjsu e Cdt foram analisados morfológicamente.

4.6.1. Microscopia de luz

Foram confeccionadas lâminas histológicas para a análise de microscopia de luz das estruturas anatômicas do músculo diafragma. O tecido muscular recebeu fixação em solução Bouin por 24 horas e em seguida, lavado com 2 mL de hidróxido de sódio- NaOH- 6M (Ecibra®) diluído em aproximadamente 400 mL de água, executando-se trocas em intervalos de 20 minutos. Para o processo de desidratação é utilizado diferentes graduações alcoólicas (70%, 85%, 96% e absoluto), iniciando com álcool 70% onde o tecido permaneceu por no mínimo dois dias e não tendo um tempo máximo pré-determinado. Após esse armazenamento a desidratação foi iniciada, não podendo mais ser interrompida. As lavagens do tecido muscular seguiram-se de hora em hora com álcool etílico. A última graduação alcoólica deve atingir seis trocas, sendo a quinta troca *overnight* e a sexta feita no dia seguinte.

Após a desidratação do tecido muscular, deu-se início a etapa de diafanização, onde as preparações nervo frênico-diafragma foram colocadas em duas trocas de Xilol (Synth®) ficando em contato por 1 hora em cada xilol. Ao término, o tecido recebeu cortes em três partes aproximadamente iguais (começo, meio e fim).

Logo após a divisão do tecido muscular deu-se início a etapa de inclusão. Os músculos diafragmas foram adicionados em diferentes frascos contendo Paraplast® Plus (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) mantido em estufa na temperatura de $56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Realizou-se três trocas de Paraplast® Plus de 3 em 3 horas sendo a última *overnight*.

No dia seguinte, os tecidos musculares inclusos foram despejados em uma bandeja plástica deixada em superfície plana para o processo de secagem e solidificação do Paraplast® Plus, permanecendo nesta bandeja até a etapa da microtomia. Os blocos em estado sólido foram retirados da bandeja plástica e modelados em formato retangular e fixados em bloco de madeira. Após a fixação, adicionou-se um bloco ao micrótomo (Criostato 300 Ancap®) sendo desbastado em seções de cortes de 30 μm até atingir o músculo diafragma. Logo após segue-se com cortes transversais e ultrafinos de 5 μm (cortes seriados) sendo dispostos em banho histológico (Ancap®) na temperatura de $39^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Em seguida, os cortes foram colocados sobre uma lâmina de vidro.

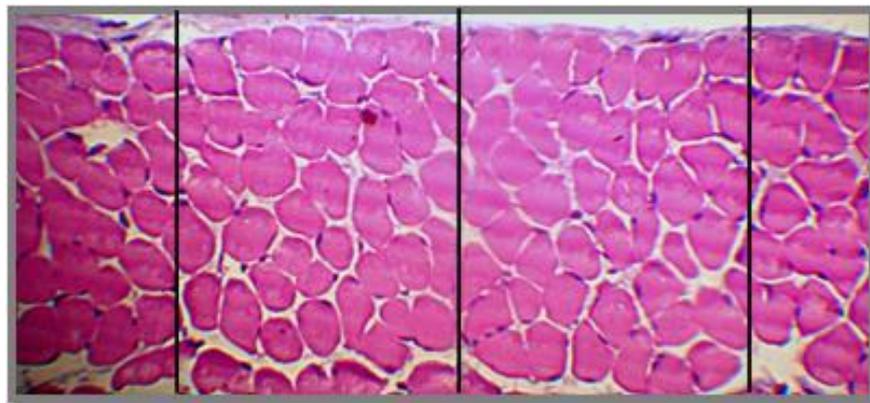
Para a etapa de desparafinização, segue-se com as lâminas organizadas em suportes e levadas a estufa na temperatura de 100°C por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram mergulhadas em três cubas contendo xilol com quantidade suficiente para cobri-las, permanecendo por 5 minutos na primeira cuba e por 10 segundos na segunda e terceira. Segue-se com a hidratação dos cortes sendo realizada na sequência, mergulhando as lâminas em cubas contendo álcool etílico em concentrações decrescentes, iniciando com o absoluto, passando para 96%, 85%, 70% por 10 segundos e finalizando com água corrente por 5 minutos.

A coloração dos cortes finaliza o processo, mergulhando as lâminas em uma cuba contendo Hematoxilina de Harris Modificada (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) por 1 minuto, passando por água corrente por 5 minutos e em álcool 70% por 10 segundos. Em seguida as lâminas são passadas em outra cuba contendo Eosina em solução alcóolica (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) por 2 minutos e novamente por água corrente por 5 minutos. Após a coloração foi realizado novamente a desidratação e a

diafanização. Cubas contendo álcool 70%, 85%, 96%, absoluto e xilol em duas trocas, com o tempo de permanência de 1 minuto em cada cuba. Uma lamínula foi fixada sobre os cortes com Entellan (Merck®).

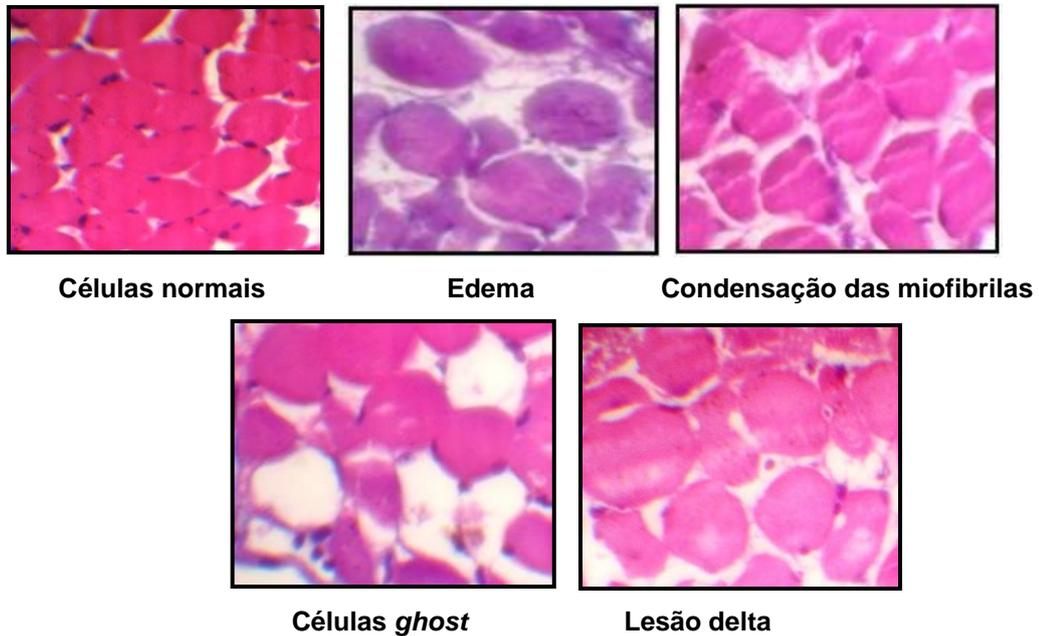
Após a montagem, segue-se com análise das lâminas em microscópio óptico. Para realizar a contagem das células foram definidas três linhas aleatórias (Figura 9). Após análise quantitativa do material histológico, o melhor corte da lâmina foi selecionado e a documentação dos resultados obtidos processada através do fotomicroscópio Zeiss AXIOSTAR Plus. As fotos foram retiradas em um aumento de 400x (objetiva de 40x, onde uma barra de 1 cm=50 μ m) com a câmera fotográfica digital Canon PowerShot A620 7.1 mega pixels.

Figura 9 - Foto pronta para contagem. Corte transversal de preparação em controle Tyrode, corada com Hematoxilina e Eosina. Objetiva de 40x.



As contagens (duplo cego) das células foram realizadas por quatro examinadores, seguindo critérios estabelecidos. Foram definidos os padrões de células normais, apresentando estrutura poligonal íntegra e núcleo periférico, ambos bem evidenciados e as lesões caracterizadas como: lesões “delta” (semelhante ao símbolo Δ vindo do grego), edema, células *ghost* ou fantasmas, representado por restos de membranas celulares e a condensação das miofibrilas (Figura 10). Todos esses tipos de células foram utilizados como parâmetro para as análises.

Figura 10 - Caracterização do padrão utilizado para a contagem e tipos de células normais, edema, condensação de miofibrilas, células *ghost* e lesões delta. Objetiva: 40x.



4.7. Escolha do fitoquímico para formulação de injetável e ensaios farmacológicos em preparação *ex vivo* e *in situ*

A partir da etapa *ex vivo* e análise morfológica das preparações NFD, foi escolhido um fitoquímico para os ensaios posteriores. Os critérios pré-estabelecidos foram os seguintes:

- ✓ O fitoquímico eleito deveria apresentar maior capacidade neutralizante contra os efeitos de miotoxicidade e neurotoxicidade para o VBjssu em relação aos demais fitoquímicos;
- ✓ Apresentar a maior capacidade neutralizante contra os efeitos de miotoxicidade e neurotoxicidade para o VCdt em relação aos demais fitoquímicos;
- ✓ Não apresentar diferença significativa em relação ao controle Tyrode nos estudos morfológicos;
- ✓ Ser disponível comercialmente.

4.7.1. Comparação dos efeitos de neutralização do AVB e da Betulina - NFD

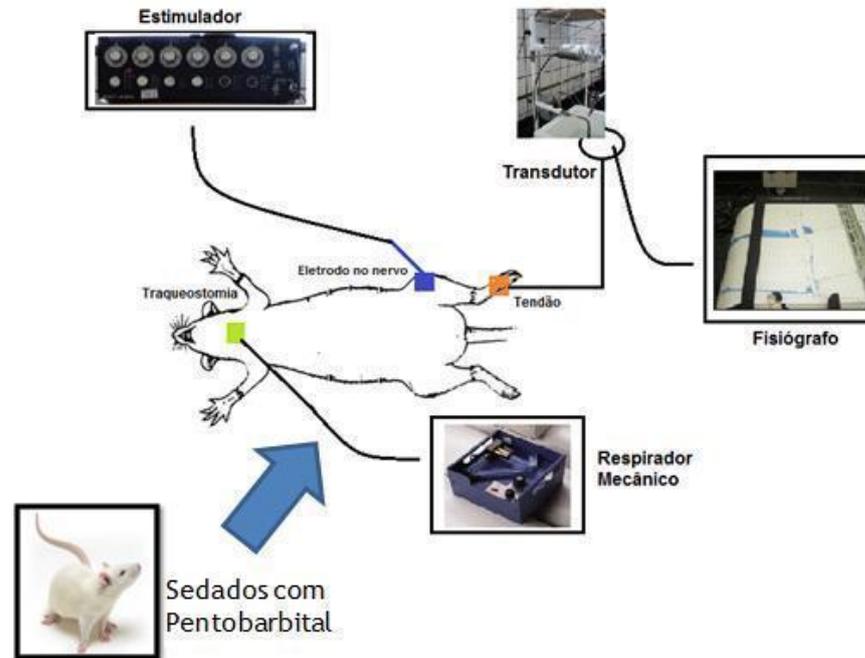
Estudos prévios em preparação NFD (*ex vivo*) foram feitos com fitoquímico eleito para formulação do injetável em comparação com antiveneno botrópico comercial. Realizaram-se experimentos controles com o fitoquímico na concentração de 200 µg/mL (1 mg/ 5 mL) e para os experimentos controle com o antiveneno botrópico (AVB) a concentração empregada foi de 4 µL/mL (20 µL / 5mL).

Para os ensaios de neutralização com o soro antibotrópico a concentração empregada em todos os experimentos de Bjsu:AVB foram de 5:1, conforme descrito na bula do antiveneno botrópico do Instituto Butantan. Misturas do VBjsu-Fitoquímico e VBjsu-AVB foram pré-incubadas a 37°C, por 30 minutos e, posteriormente adicionadas à preparação NFD, para determinar a capacidade neutralizante do fitoquímico em comparação com a do antiveneno botrópico.

4.7.2. Preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE)

Ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal). O animal foi fixado em uma plataforma de madeira e isopor. Em seguida submetido à traqueostomia para possibilitar o uso do ventilador mecânico (Ugo Basile 7025). A ventilação empregada foi controlada e padronizada para manter um volume corrente de 1,2 mL/kg de peso corporal e frequência respiratória de 70 movimentos por minuto. Após a tricotomia e secção do tendão do músculo tibial anterior e do nervo ciático-poplíteo externo foi realizada a trepanação da tibia para a fixação do membro a uma base de cortiça. Pele e tecidos adjacentes foram divulsionados e o tendão do músculo tibial anterior esquerdo foi exposto na sua porção distal, seccionado, amarrado a uma linha e conectado a um transdutor isométrico (cat. 7003) acoplado ao fisiógrafo 2-Channel Recorder Gemini cat. 7070. O nervo ciático-poplíteo externo (Figura 11) foi estimulado indiretamente (estimulador fisiológico duplo ESF-15D), utilizando-se estímulos supramaximais e frequência de 0,5 hertz com duração de 0,2 milisegundos.

Figura 11 - Esquemática do isolamento da preparação nervo ciático-poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato.



Fonte: Jhones Luis Oliveira.

Após o registro em condições controle durante 15 a 20 minutos de estabilização da preparação foram realizados protocolos farmacológicos.

4.7.2.1. Controles Experimentais

As concentrações do VBjssu foram calculadas de acordo com o peso dos animais. O estudo de Doin-Silva (2003) foi utilizado como referencial onde para cada 300 g de peso corporal aplicam-se 180 μg VBjssu para cada 20 μL de solução salina. Desta forma, cada 1 μL de solução salina solubilizou 9 μg VBjssu. Em seguida, foi estabelecido o volume fixo de 120 μL devendo-se calcular de acordo com o peso do rato a concentração de veneno a ser administrada. Também foram realizados experimentos controles com solução salina. Os controles: controle-salina, controle-VBjssu e controle do polietilenoglicol 400 (PEG 400) foram injetados no músculo tibial da coxa esquerda do animal. O antiveneno botrópico (AVB) foi injetado intravenosamente e utilizado como controle.

4.7.2.2. Ensaios de neutralização da atividade bloqueadora do veneno de Bjsu – NPE

Diferentemente do modelo *ex vivo* (NFD), nos experimentos do modelo *in situ* (NPE), o veneno não foi pré-incubado com o neutralizante. Para os protocolos de neutralização, após 15 minutos da aplicação do VBjsu no músculo tibial da coxa esquerda do animal, o AVB foi administrado intravenosamente (i.v.), sendo a concentração indicada pelo fabricante (Instituto Butantan), ou seja, na proporção de 1:5 de AVB para o VBjsu

4.7.3. Elaboração e produção do Fitoquímico Injetável

A formulação de um fitoquímico injetável (tabela 1) foi proposta pelos Profs. Dr. Humberto Ferraz e Dra. Helena Onishi Ferraz através de uma parceria entre a Universidade de São Paulo (USP) e a Universidade de Sorocaba (Uniso), sendo sua produção realizada na Uniso. Para a administração intravenosa deve-se garantir a isotonicidade da solução e estar de acordo com procedimentos preconizados nas farmacopéias. Desta forma através do osmômetro (Fiske Associates) a pressão osmótica do fitoquímico injetável foi mensurada e comparada com a pressão osmótica do soro fisiológico, na Universidade Estadual de Campinas.

Tabela 1 - Formulação do fitoquímico injetável.

Betulina -----	20 mg
PEG 400 -----	0,3 mL
Soro fisiológico -----qsp -----	1 m L

4.8. Análise Estatística

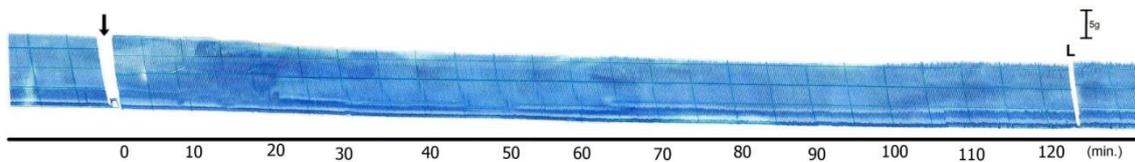
Para a avaliação estatística dos resultados farmacológicos, histológicos e bioquímicos utilizou-se o teste não pareado *t*-student, com valor $p < 0,05$ considerado como significativo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade neuromuscular de preparações nervo frênico diafragma de camundongos (NFD) - Controles Experimentais

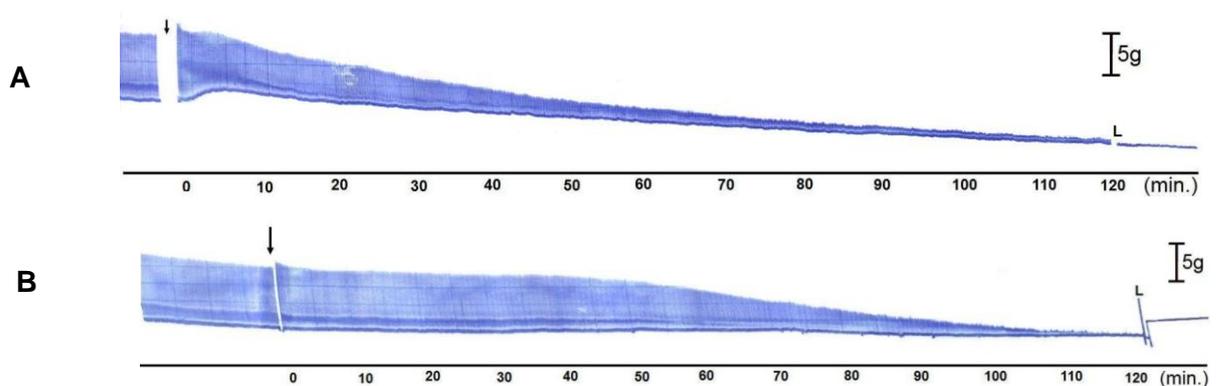
Ensaio farmacológico foram realizados com a solução nutritiva de Tyrode (Figura 12), que mantém as condições fisiológicas da preparação biológica. Durante o protocolo experimental de 120 minutos a preparação recebeu aeração de carbogênio e foi mantida em banho-maria na temperatura de 37°C, sustentando a contração muscular.

Figura 12 - Registro miográfico de preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estímulo indireto. Seta: Adição da solução nutritiva de Tyrode. L: Lavagem. Barra=tensão.



Os venenos de *Bothrops jararacussu* (VBjssu) na concentração de 40 µg/mL (n=19) e de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) na concentração de 10 µg/mL (n =10) utilizados na preparação do nervo frênico-diafragma (Figura 13) causaram bloqueio irreversível.

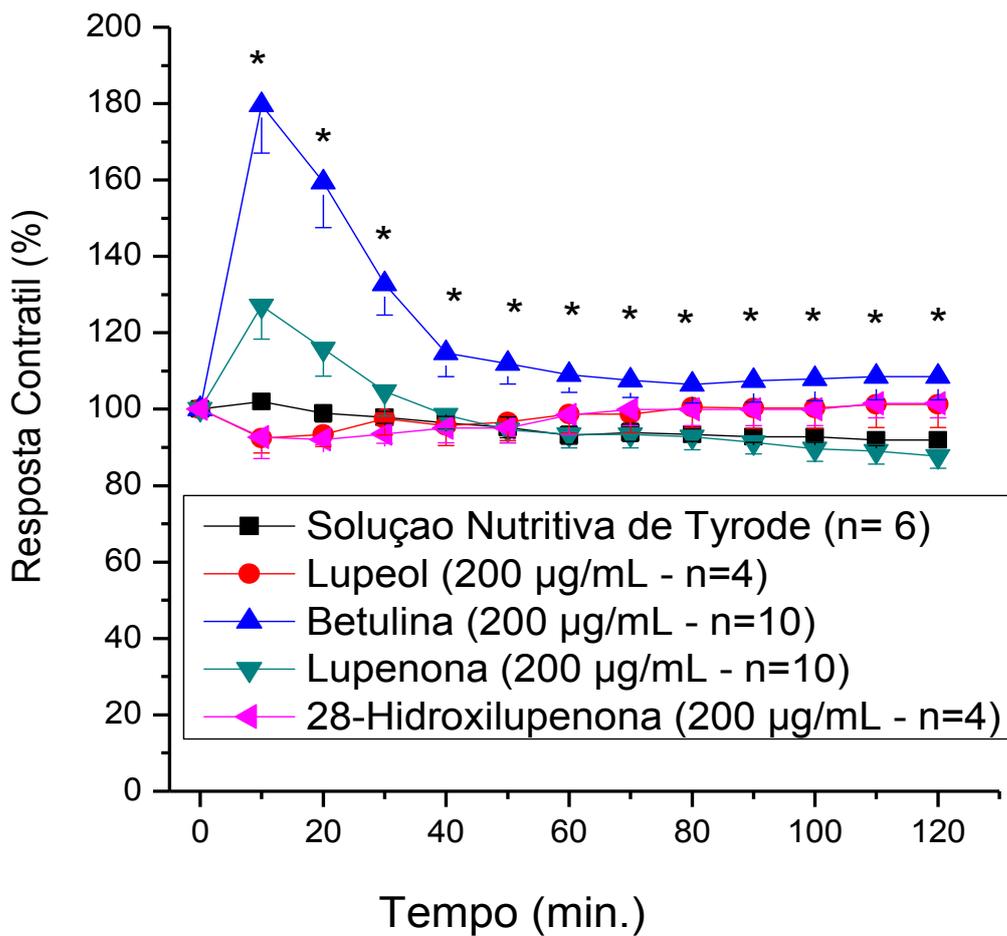
Figura 13 - Registros miográficos de preparações nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto, sendo (A): veneno de *Bothrops jararacussu* (VBjssu) com marcante contratura; seta: indicando adição do VBjssu; (B) veneno de *Crotalus durissus*. L: Lavagem. Barra=tensão.



5.2. Atividade neuromuscular de preparações NFD submetidas aos controles dos triterpenóides

A Figura 14 ilustra o efeito farmacológico dos triterpenóides, nas preparações neuromusculares, comparados ao controle (Tyrode). Observe o efeito facilitatório (aumento da amplitude da resposta contrátil) nos tempos iniciais induzidos pela Betulina (10–30 min.) e Lupenona (10-20min.) significativamente diferente do controle Tyrode ($p < 0,05$).

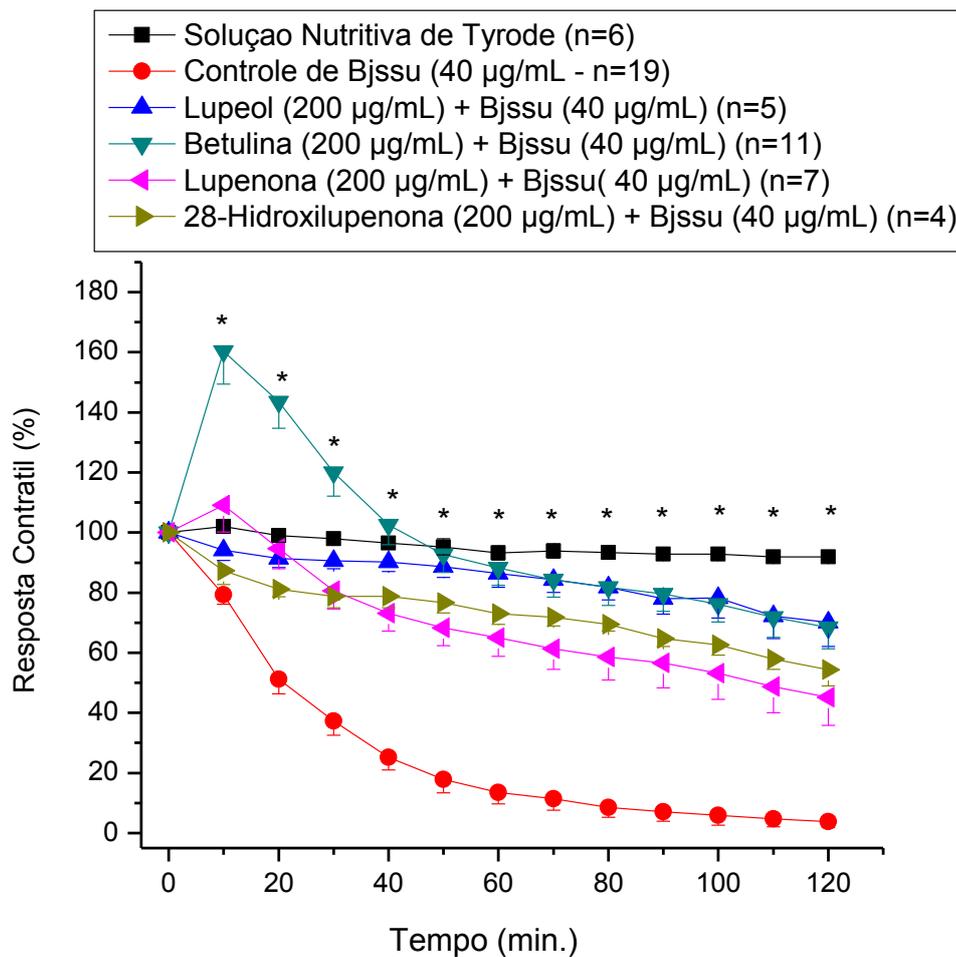
Figura 14 - Efeito farmacológico dos triterpenóides. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, em relação ao controle Tyrode.



5.2.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelos triterpenóides - NFD

Os ensaios de neutralização (Figura 15) mostraram que o efeito neurotóxico induzido pelo veneno de Bjssu foi neutralizado significativamente pelo tratamento com os triterpenóides: Lupeol, Betulina, Lupenona e 28-Hidroxilupenona, produzindo uma proteção ao final de 120 minutos de experimento em: 70,1% \pm 7,9 (n=5); 68,3% \pm 7,0 (n=11); 45,2% \pm 9,4 (n=7); 54,3% \pm 5,4 (n=4), respectivamente, todos com $p < 0,05$.

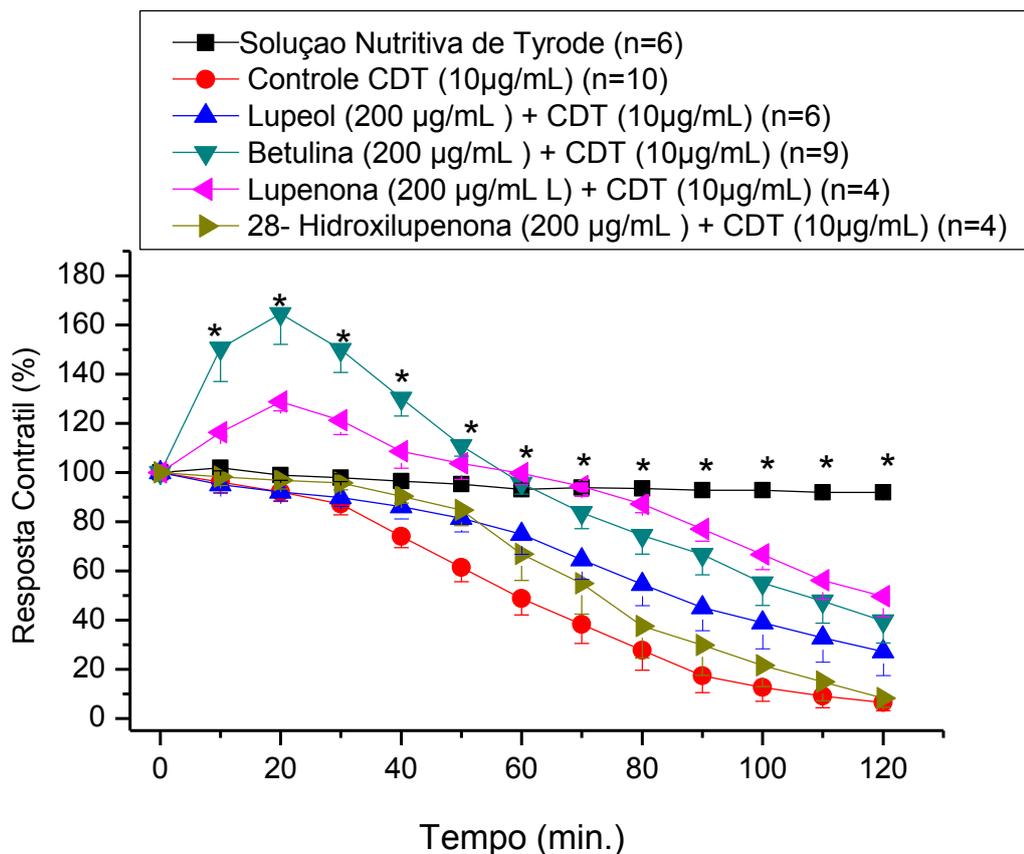
Figura 15 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Neutralização do VBjssu (veneno de *Bothrops jararacussu*) com os triterpenóides. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, comparado ao veneno.



5.2.2. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VCdt pelos triterpenóides - NFD

Os ensaios de neutralização (Figura 16) com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) foi neutralizado significativamente pelo tratamento com os triterpenóides: Betulina e Lupeolona, produzindo uma proteção ao final de 120 minutos de experimento em: $39,5\% \pm 8,9$ (n=9); $49,5\% \pm 8,1$ (n=4), respectivamente. Os triterpenóides, Lupeol (n = 6) e 28-Hidroxilupeolona (n = 4) não apresentaram proteção contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt).

Figura 16 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Neutralização do veneno de Cdt (*Crotalus durissus terrificus*) exercida por Betulina e Lupeolona. Os triterpenóides: Lupeol e 28-Hidroxilupeolona não protegeram. 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.



5.2.3. Análise morfológica em preparações NFD incubadas com os venenos de Bjsu e Cdt e neutralizações com os triterpenóides

Os resultados foram expressos (tabela 2) através da análise estatística *t-student* com um $p < 0,05$ considerado significativo, sendo que os índices de danos morfológicos (IDM_s) foram: Controle Tyrode (9,7% ± 1,6; n=3), Betulina (16% ± 1; n=3), Lupeol (13% ± 2,6; n=3), Lupenona (22% ± 3; n=3), Bjsu (50,27% ± 5,4; n=3) e Cdt (43,9% ± 4,1; n=3). Nos ensaios de neutralização do VBjsu pelos triterpenóides Betulina e Lupeol, os IDM_s foram de (18% ± 2,4; n=3) e (24% ± 3,7; n=3). Nos ensaios de neutralização do VCdt pelos triterpenóides Betulina e Lupenona os IDM_s foram de (13% ± 2,6; n=3) e (27% ± 3,2; n=3), respectivamente.

Tabela 2 - Índices de danos morfológicos em preparações NFD.

Protocolos	Alterações (%)
Tyrode (n=3)	9,7 % ± 1,6
Betulina (n=3)	16% ± 1
Lupeol (n=3)	13% ± 2,6
Lupenona (n=3)	22% ± 3*
VBjsu (n=3)	50,27% ± 5,4*
VCdt (n=3)	43,9% ± 4,1*
Betulina:VBjsu (n=3)	18% ± 2,4**
Betulina:VCdt (n=3)	13% ± 2,6**
Lupeol:VBjsu (n=3)	24% ± 3,7**
Lupenona:VCdt (n=3)	27% ± 3,2**

(n=número de experimentos realizados)

(*Apresentam diferença significativa em relação ao controle Tyrode - $p < 0,05$);

(** Apresentam diferença significativa em relação ao VBjsu ou VCdt - $p < 0,05$).

A seguir (Figuras 17, 18 e 19) mostram-se secções transversais das preparações NFD após 120 minutos de incubação sob condições controle (Tyrode, Triterpenóides, VBjsu e VCdt) e ensaios de neutralização (triterpenóides : VBjsu e triterpenóides : VCdt).

Figura 17 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD, sendo: (A) Controle Tyrode, (B) Betulina, (C) Lupeol, (D) Lupenona, apresentando os danos morfológicos: e (edema), CM (condensação das miofibrilas) e LD (lesão delta).

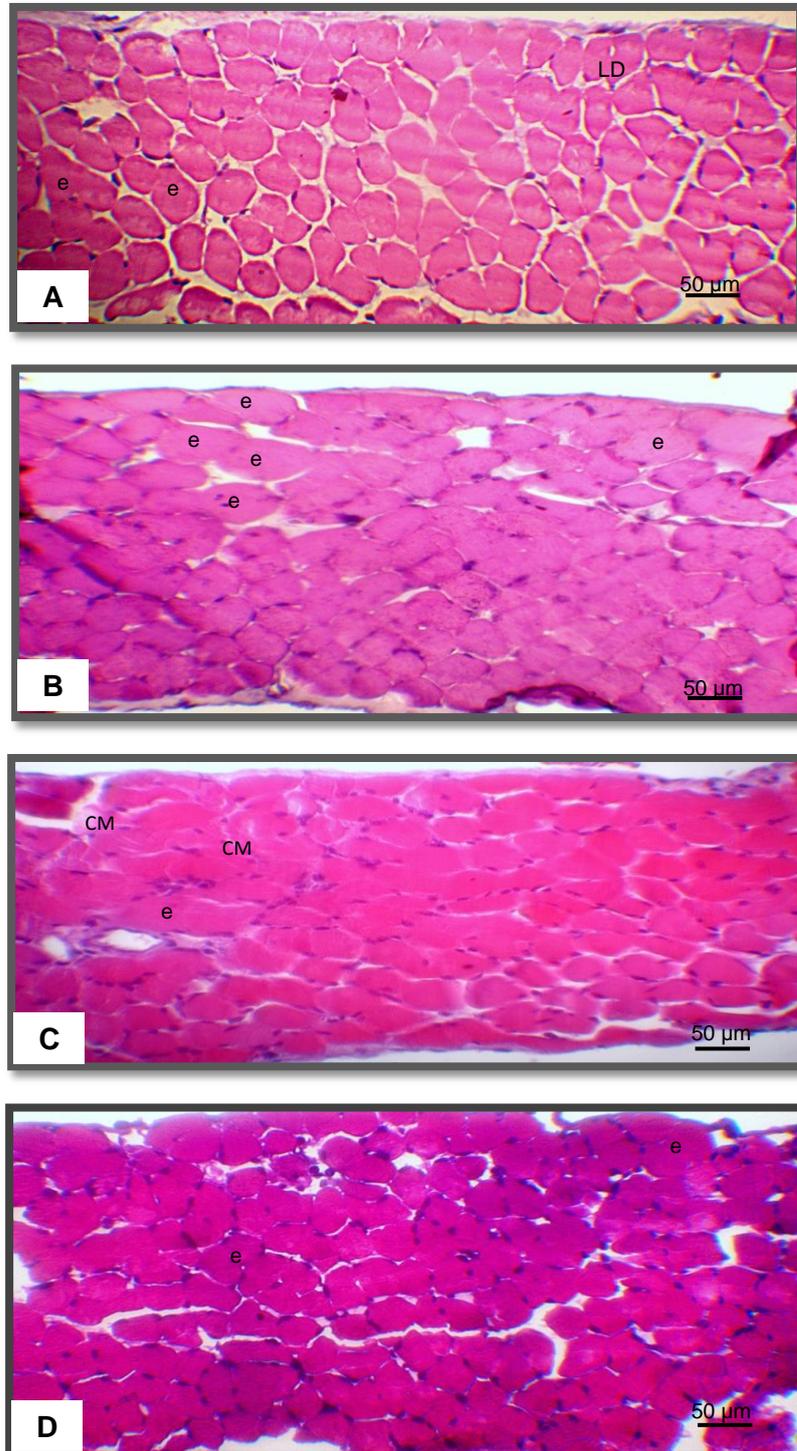
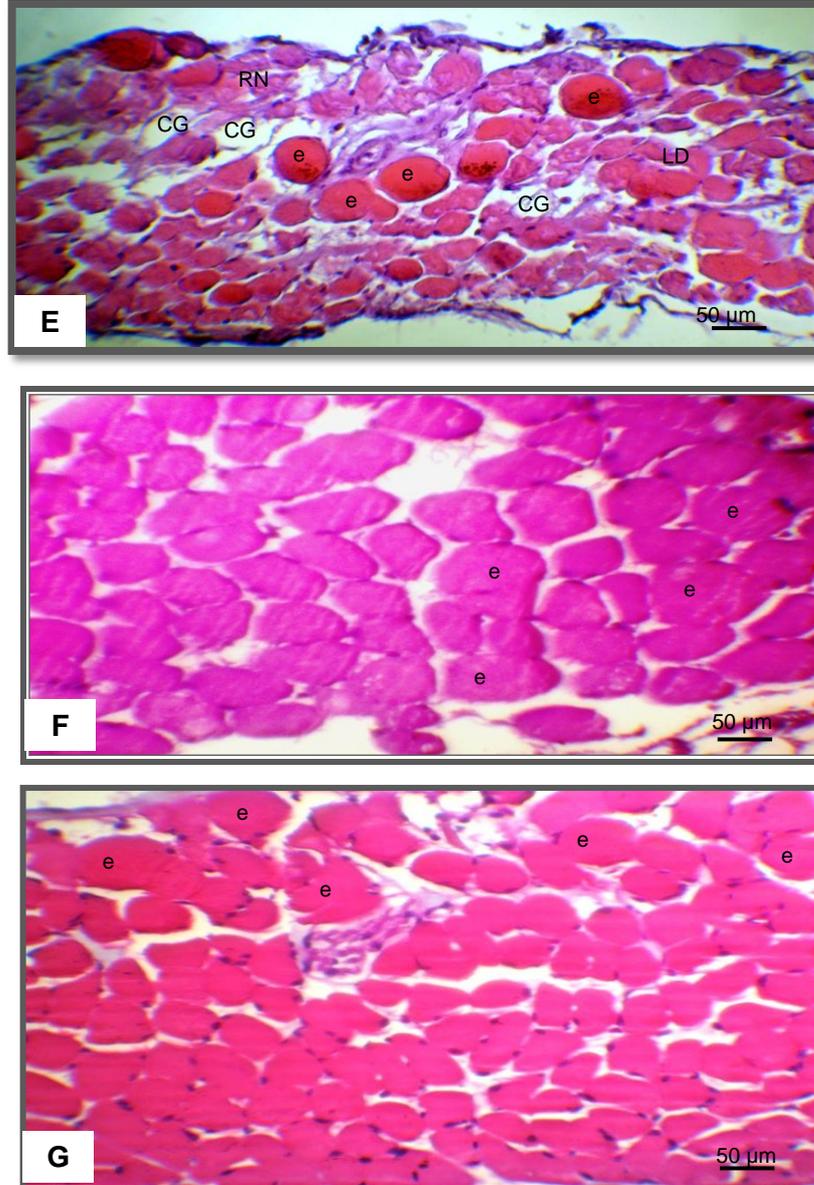


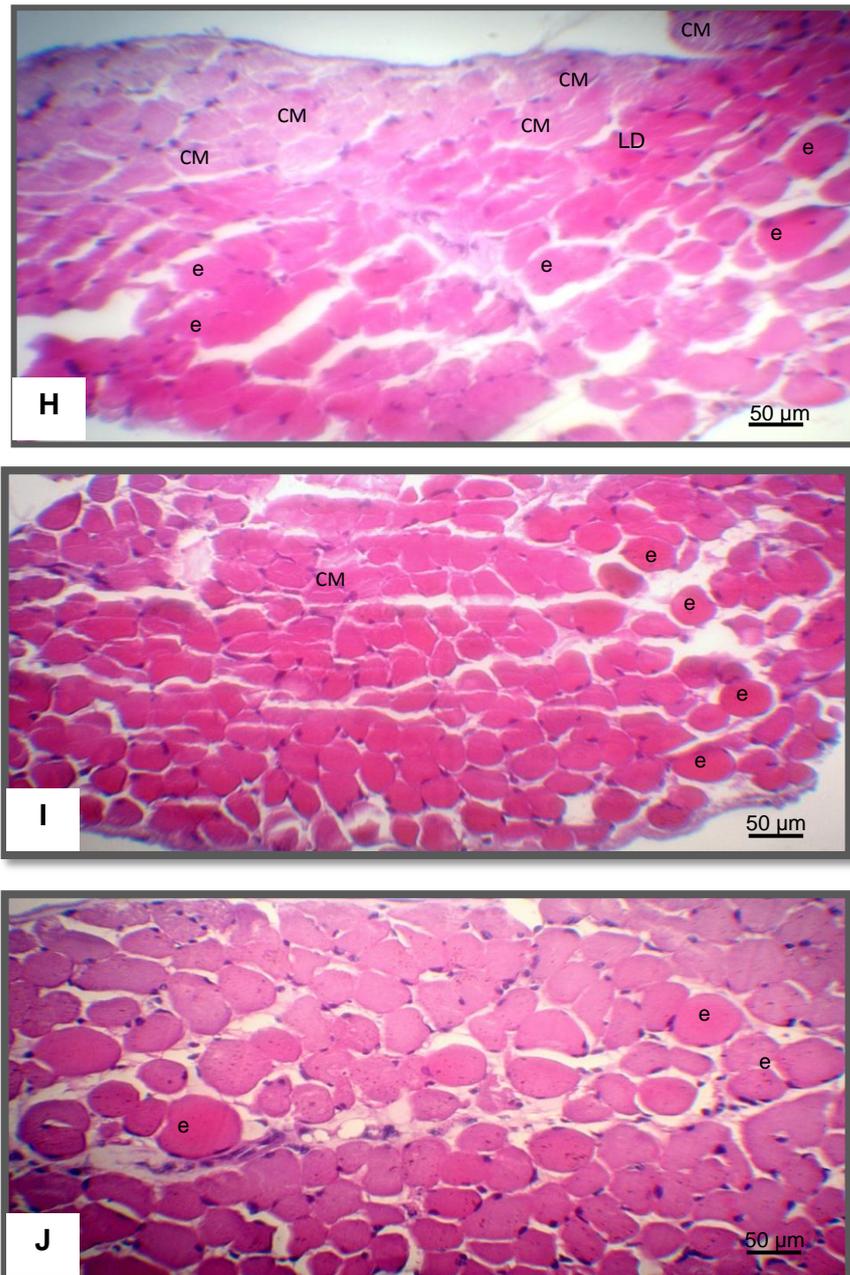
Figura 18 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD, sendo: (E) VBjssu (veneno de *Bothrops jararacussu*), (F) VBjssu + Betulina, (G) VBjssu + Lupeol, apresentando os danos morfológicos: e (edema), LD (lesão delta), CG (células *ghost*), CM (condensação das miofibrilas) e RN (região necrótica).



O veneno de Bjsu produz lesões nas fibras musculares como edema, lesão delta, células *ghost*, condensação das miofibrilas e mionecrose, apresentando diferença significativa em relação aos controles Tyrode, Lupeol e Betulina ($p < 0,05$). Para os ensaios de neutralização, utilizando Betulina e Lupeol, ambos mostraram proteção contra a miotoxicidade induzida pelo VBjssu. A porcentagem de fibras com lesões tiveram diferença significativa em relação ao controle Tyrode. A neutralização

da Betulina não apresentou diferença significativa em relação ao seu próprio controle, diferentemente da neutralização do Lupeol, onde houve diferença significativa em relação ao controle.

Figura 19 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD, sendo: (H) *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), (I) Cdt + Betulina, (J) Cdt + Lupenona, apresentando os danos morfológicos: e (edema), LD (lesão delta) e CM (condensação das miofibrilas).



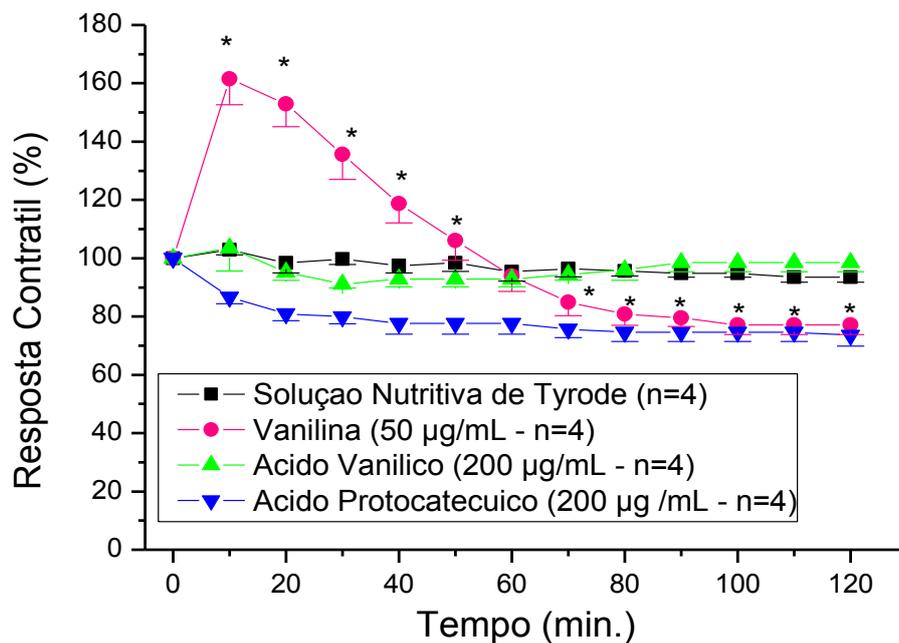
O veneno de Cdt produz lesões nas fibras musculares como edema, lesão delta, células *ghost*, condensação das miofibrilas e mionecrose, apresentando

diferença significativa em relação aos controles Tyrode, Betulina e Lupenona ($p < 0,05$). Para os ensaios de neutralização, utilizando Betulina e Lupenona, ambos mostraram proteção contra a miotoxicidade induzida pelo VCdt. A porcentagem de fibras com lesões para a neutralização com Betulina não tiveram diferença significativa em relação ao controle Tyrode e ao seu próprio controle, diferentemente da neutralização com Lupenona onde houve diferença significativa em relação ao controle Tyrode, mas não em relação ao seu próprio controle.

5.3. Atividade neuromuscular de preparações NFD submetidas aos controles dos ácidos fenólicos

A Figura 20 ilustra o efeito farmacológico dos ácidos fenólicos (Ácido Vanílico, Vanilina e Ácido Protocatecuico), nas preparações neuromusculares, comparados ao controle (Tyrode). Observe o efeito facilitatório (aumento da amplitude da resposta contrátil) nos tempos iniciais induzidos pela Vanilina (10–40 min.) significativamente diferente do controle Tyrode ($p < 0,05$).

Figura 20 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Controle dos ácidos fenólicos. 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.

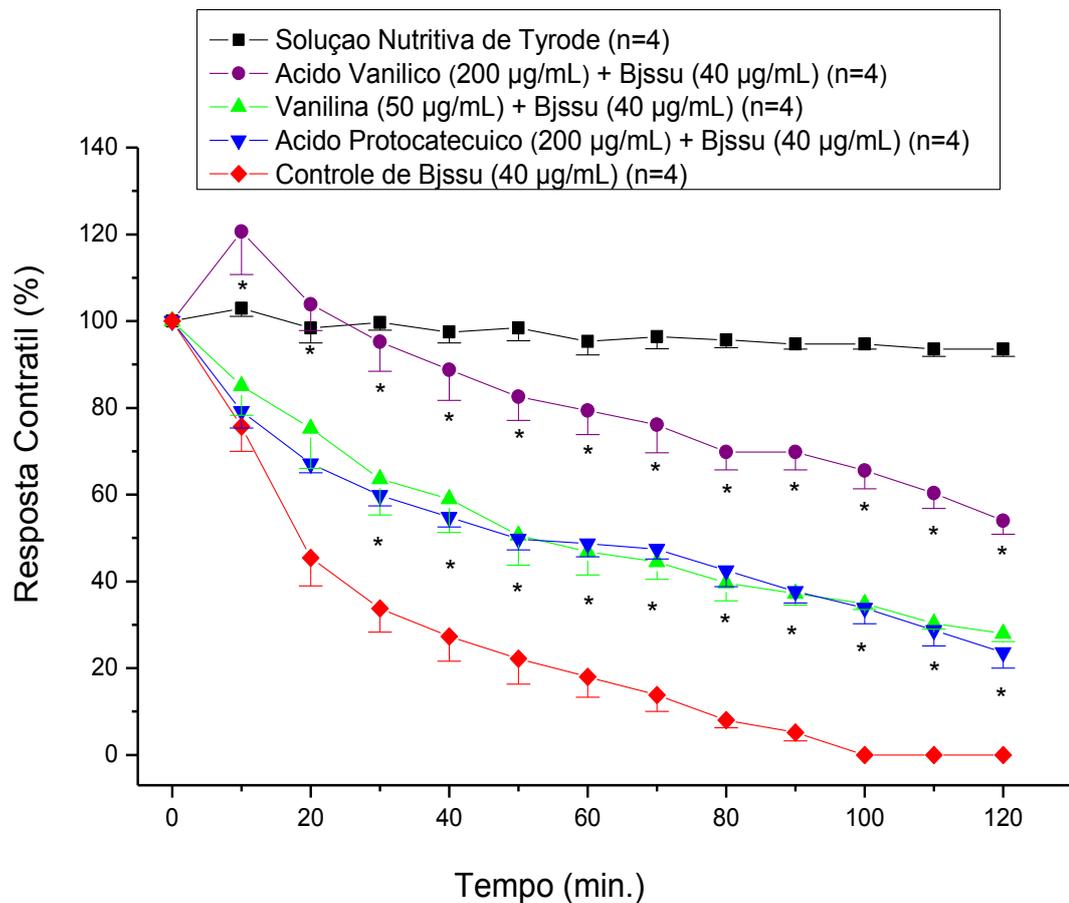


Conforme preconizado, a concentração dos fitoquímicos a ser estudada foi de 200 µg/mL. Dos ácidos fenólicos apenas a vanilina apresentou bloqueio neuromuscular nesta concentração, desta forma a dose de 50 µg/mL é que foi utilizada para os ensaios de neutralização.

5.3.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelos ácidos fenólicos - NFD

Os ensaios de neutralização (Figura 21) mostraram que o efeito neurotóxico induzido pelo VBjssu foram hostilizados parcialmente e significativamente pelo tratamento com os ácidos fenólicos: Ácido Vanílico, Vanilina e Ácido Protocatecuico, produzindo uma proteção ao final de 120 minutos de experimento em: $53,9\% \pm 3,1$ (n=4); $27,9\% \pm 1,8$ (n=4); $23,6\% \pm 3,6$ (n=4), respectivamente. Dos ácidos fenólicos o Ácido Vanílico demonstrou ser o melhor agente neutralizante contra os efeitos induzidos pelo VBjssu.

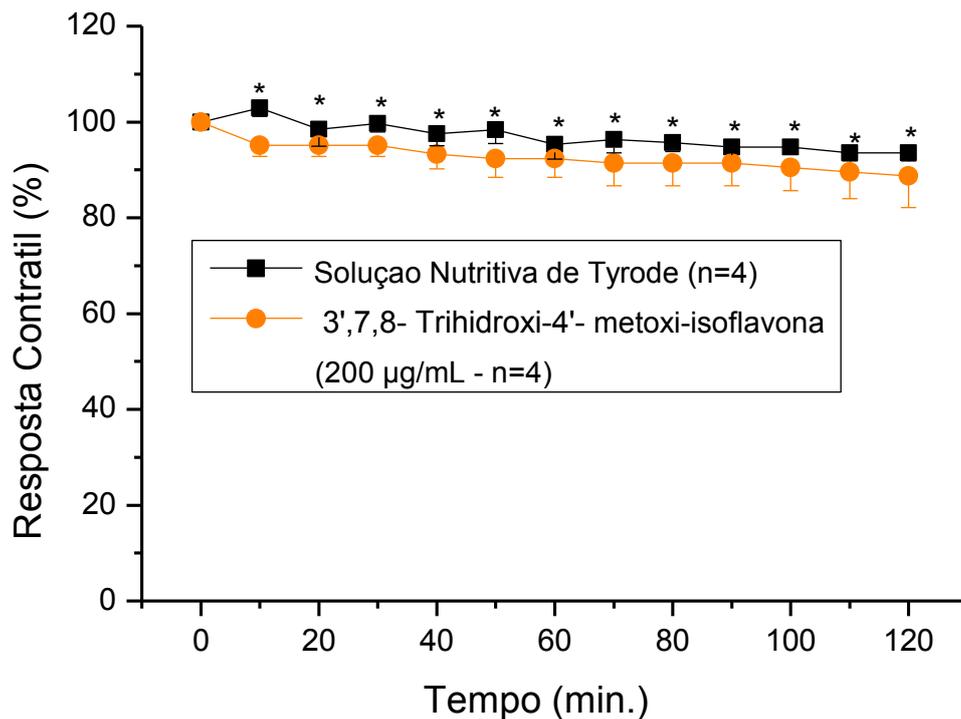
Figura 21 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Neutralização do VBjssu (veneno de *Bothrops jararacussu*) com ácidos fenólicos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, comparado ao veneno.



5.4. Atividade neuromuscular de preparações NFD submetidas ao controle do flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona)

A Figura 22 ilustra o efeito farmacológico do flavonóide 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona nas preparações neuromusculares, comparado ao controle (Tyrode). Observe o ténue bloqueio neuromuscular produzido pelo flavonóide significativamente diferente do controle Tyrode ($p < 0,05$).

Figura 22 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Controle do flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona). 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.

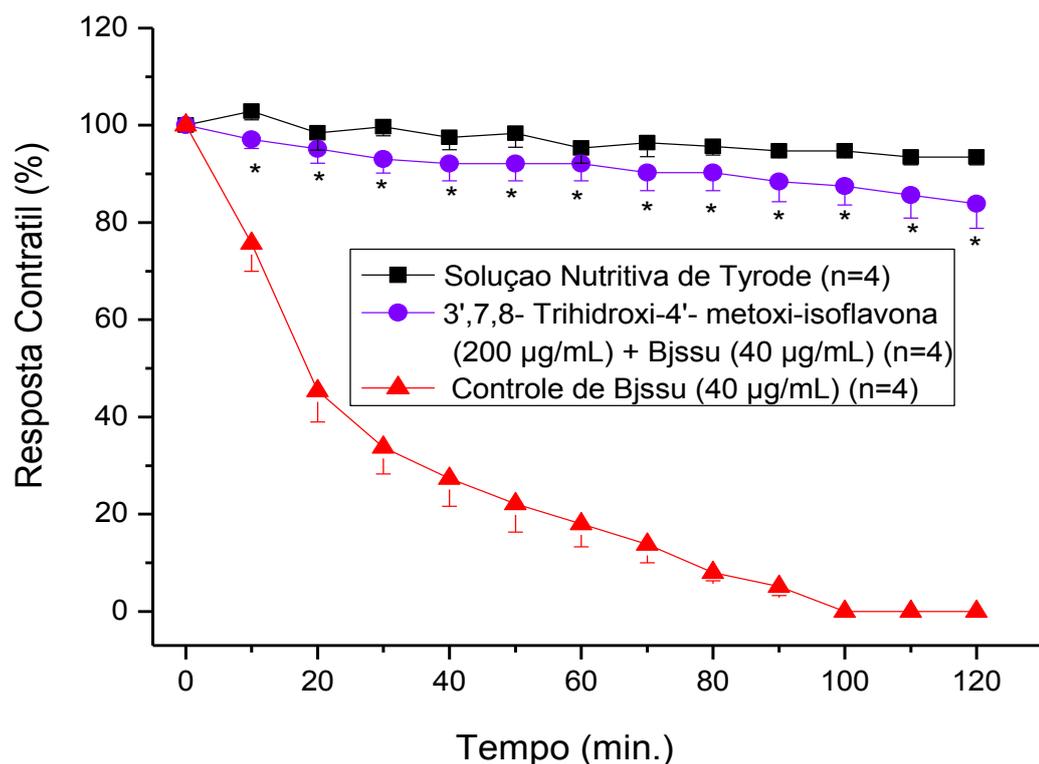


Apesar de ténue o bloqueio produzido pelo 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona a concentração de 200 µg/mL foi mantida para os ensaios farmacológicos.

5.4.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelo flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona) - NFD

Os ensaios de neutralização (Figura 23) mostraram que o efeito neurotóxico induzido pelo VBjssu foi neutralizado significativamente pelo tratamento com o flavonóide: 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona, produzindo uma proteção ao final de 120 minutos de experimento em: $83,8\% \pm 5,0$ (n=4).

Figura 23 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Neutralização do VBjssu (veneno de *Bothrops jararacussu*) com o flavonóide. 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.



5.4.2. Análise morfológica em preparações NFD com o VBjssu e neutralização com o flavonóide (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona)

Os resultados foram expressos através da análise estatística *t-student* com um $p < 0,05$ considerado significativo, sendo que os índices de danos morfológicos (IDM_s) foram: Controle Tyrode (9,7% ± 1,6; n=3) 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona (9,2% ± 1,7; n=3). Não houve diferença significativa do tratamento com o flavonóide em relação ao controle Tyrode. O veneno Bjssu (50,27% ± 5,4; n=3) apresentou diferença significativa em relação ao controle Tyrode e 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona. Nos ensaios de neutralização do VBjssu com o flavonóide 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona, os IDM_s foram de (17,9% ± 2,4; n=3).

Tabela 3 - Índices de danos morfológicos em preparações NFD.

Protocolos	Alterações (%)
Controle Tyrode (n=3)	9,7 % ± 1,6
3',7,8-Trihidroxi-4'- metoxi-isoflavona (n=3)	9,2 % ± 1,7
Veneno de Bjssu (n=3)	50,27% ± 5,4*
3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona + Bjssu (n=3)	17,0 % ± 3,4**

(n=número de experimentos realizados)

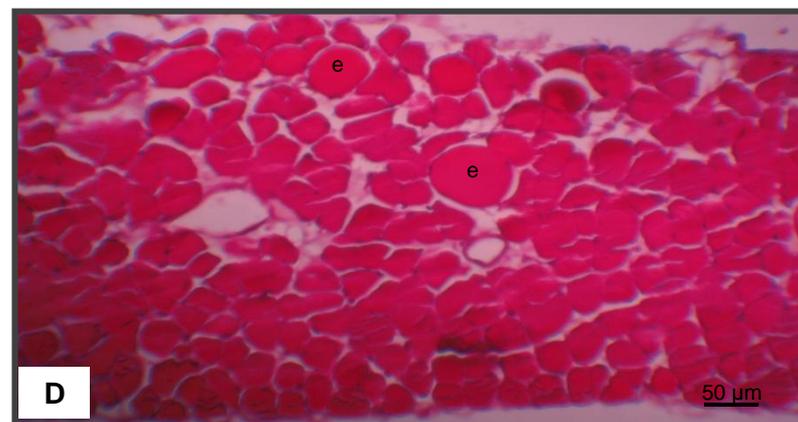
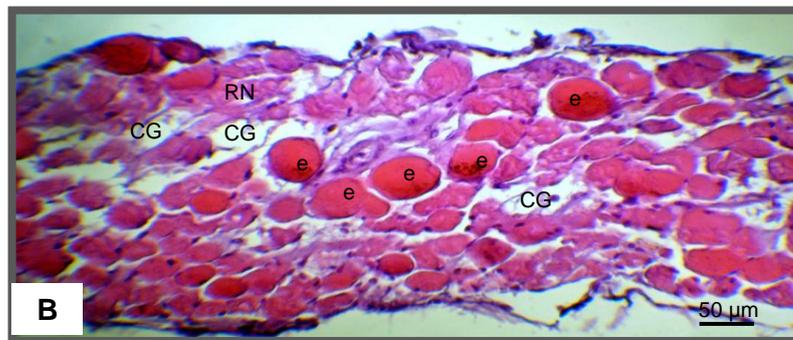
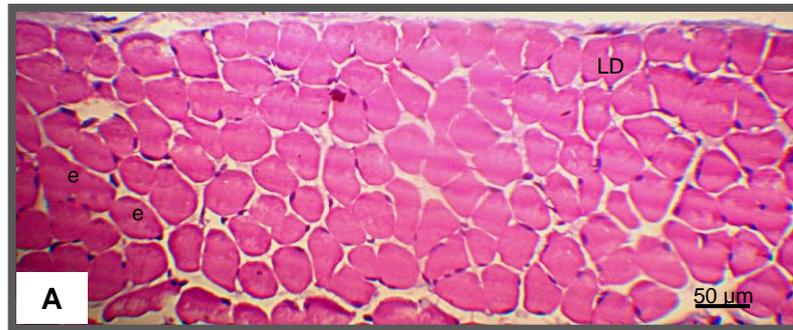
(*Apresentam diferença significativa em relação ao controle Tyrode - $p < 0,05$);

(** Apresentam diferença significativa em relação ao VBjssu - $p < 0,05$).

O veneno de Bjssu produz lesões nas fibras musculares como edema, lesão delta, células *ghost*, condensação das miofibrilas e mionecrose, apresentando diferença significativa em relação aos controles Tyrode e 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona ($p < 0,05$). Nos ensaios de neutralização, o flavonóide Trihidroxi-4'-Dimetoxiisoflavona demonstrou proteção contra a miotoxicidade induzida pelo VBjssu. A porcentagem de fibras com lesões tiveram diferença significativa em relação ao controle Tyrode e em relação ao seu próprio controle (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona).

A seguir (Figura 24) mostram-se secções transversais das preparações NFD após 120 minutos de incubação sob condições controle (Tyrode, 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona e VBjssu) e ensaios de neutralização (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona:VBjssu).

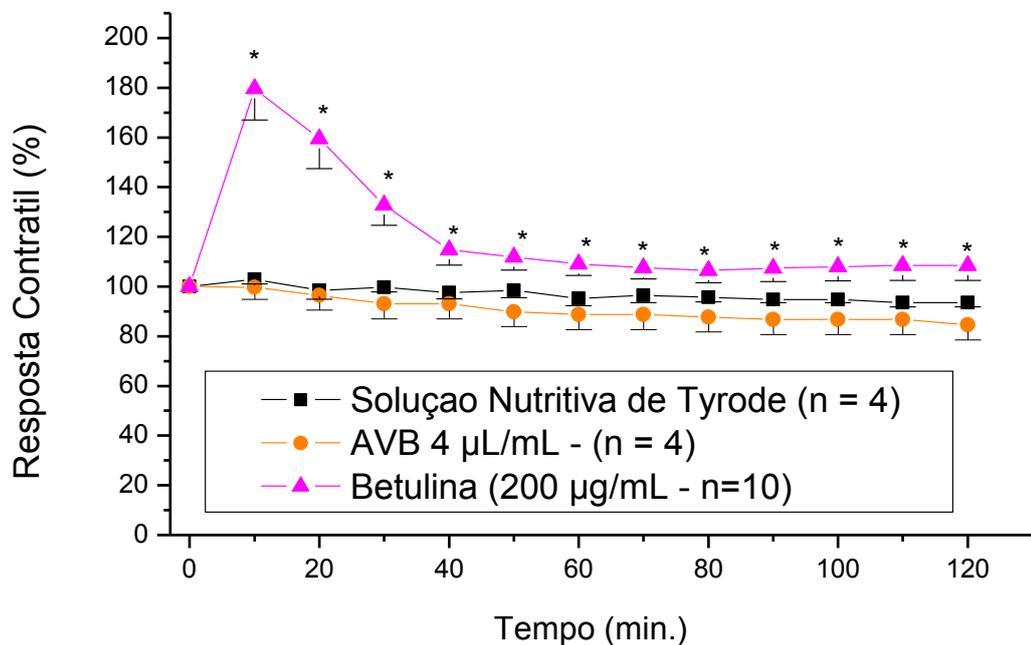
Figura 24 - Fotomicrografias de cortes transversais de preparações NFD, sendo: (A) Controle Tyrode, (B) VBjssu (veneno de *Bothrops jararacussu*), (C) 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona, (D) VBjssu + 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona, apresentando os danos morfológicos: e (edema), LD (lesão delta), CG (células *ghost*), CM (condensação das miofibrilas), CG (células *ghost*) e RN (região necrótica).



5.5. Atividade neuromuscular em preparações NFD submetidas aos controles do antiveneno botrópico (AVB) e do triterpenóide (Betulina)

A Figura 25 ilustra o efeito farmacológico do triterpenóide comparado ao controle (Tyrode) e antiveneno botrópico comercial (AVB). Observe o efeito facilitatório (aumento da amplitude da resposta contrátil) nos tempos iniciais induzidos pela Betulina (10–30 min.) significativamente diferente do controle Tyrode e do AVB ($p < 0,05$).

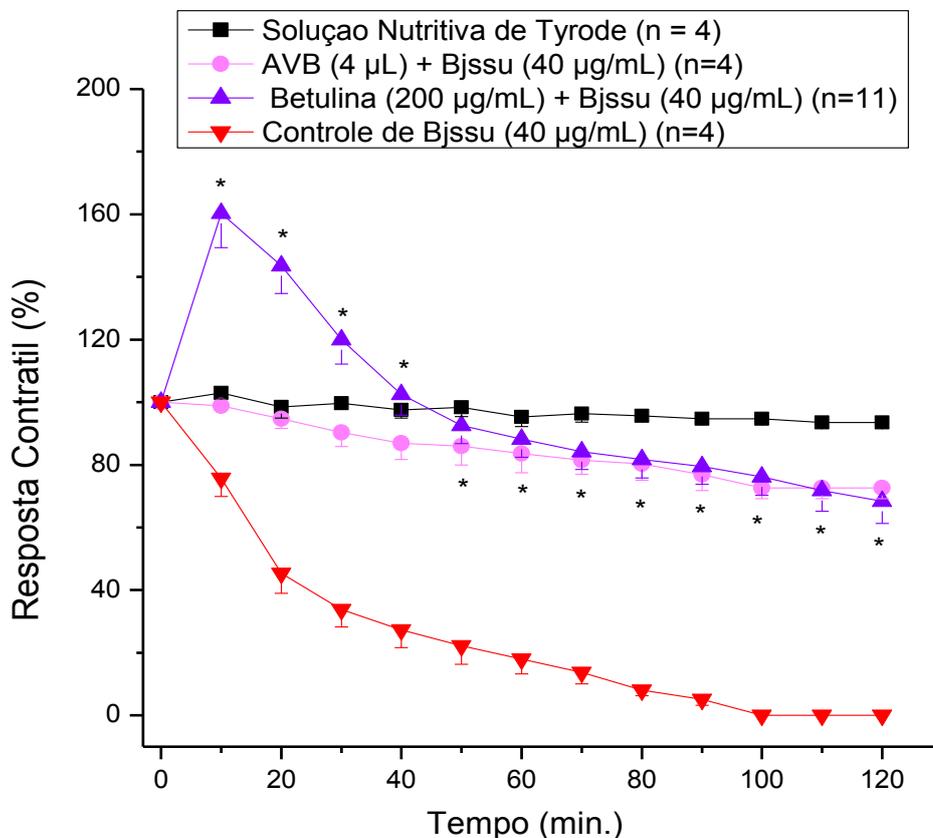
Figura 25 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Controle da Betulina e do antiveneno botrópico comercial (AVB). Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média, do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. *, $p < 0,05$, em relação ao controle Tyrode.



5.5.1. Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do VBjssu pelo antiveneno botrópico e pelo triterpenóide (Betulina)

Os ensaios de neutralização (Figura 26) mostraram que o efeito neurotóxico induzido pelo VBjssu foram hostilizados significativamente pelo triterpenóide Betulina e AVB, produzindo uma proteção ao final de 120 minutos de experimento em: 68,3% \pm 7,0 (n=11); 72,6% \pm 3,4 (n=4) respectivamente. Observe o efeito facilitatório (aumento da amplitude da resposta contrátil) nos tempos iniciais induzidos pela Betulina (10–30 min.) significativamente diferente do controle Tyrode (p<0,05). Não houve diferença significativa do tratamento com a Betulina em relação ao AVB.

Figura 26 - Efeito farmacológico em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto. Neutralização do VBjssu (veneno de *Bothrops jararacussu*) com a Betulina e antiveneno botrópico comercial (AVB). 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.

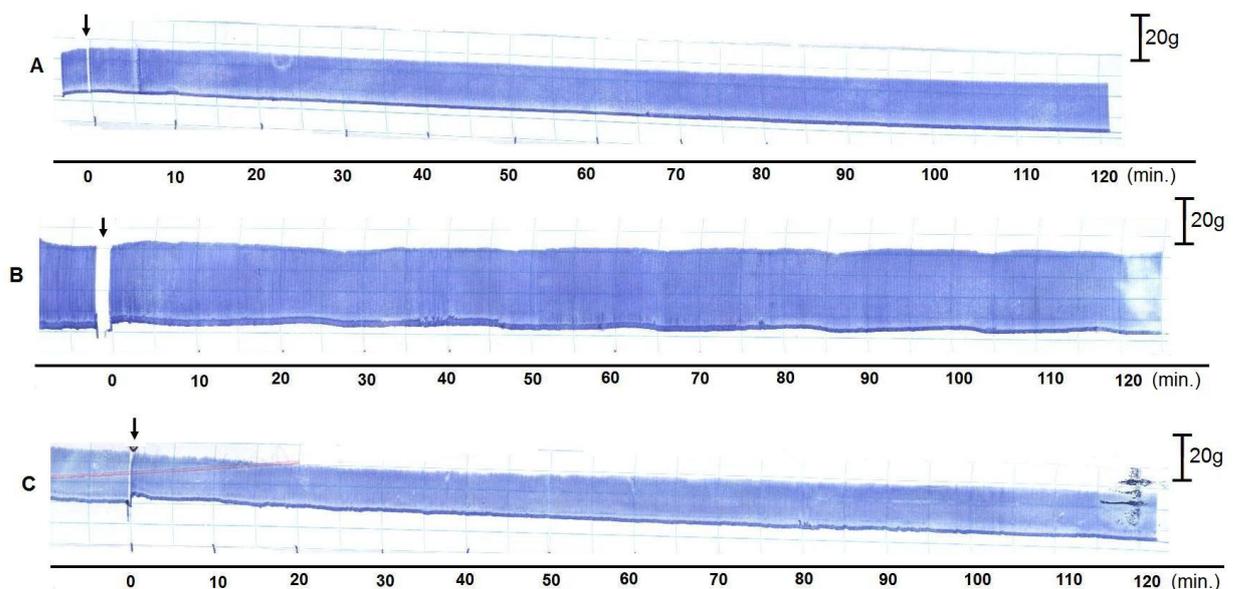


5.6. *Screening* Farmacológico em preparações nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE), submetidas aos controles salina, antiveneno botrópico e do agente solubilizante polietilenoglicol 400

O efeito farmacológico do AVB é comparado ao controle salina (Figura 27 A e B) na preparação NPE durante 120 min. de experimento. Foi observado que o controle salina produz um tênue efeito facilitatório durante todo o protocolo e sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) do controle do AVB que apresenta uma resposta contrátil estável em 100% até o final do protocolo (120 min.).

Para a formulação da Betulina Injetável, o PEG 400 foi adicionado para solubilização deste fitoquímico, sendo realizado um *screening* (Figura 27 C) para observação de seu efeito farmacológico. Foram injetados 150 μ L de PEG 400 no músculo tibial da coxa esquerda do animal que produziu ao longo dos 120 min. uma resposta contrátil de 91,67% sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) do controle salina.

Figura 27 - Registro miográfico da preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE), sob estímulo indireto. (A) Controle salina; (B) Controle de antiveneno botrópico (AVB); (C) Controle de polietilenoglicol 400 (PEG 400). Setas: indicando o momento da adição. Barra=tensão.

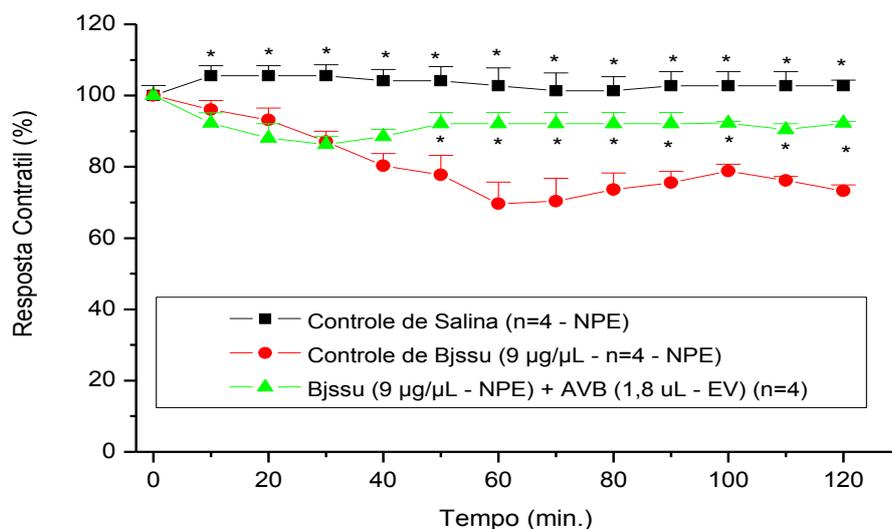


5.6.1. Resposta da atividade neuromuscular de preparações NPE submetidas ao controle salina, VBjssu e neutralização com antiveneno botrópico (AVB)

Observe na Figura 28 que a preparação submetida ao controle salina, apesar de apresentar um ténue efeito facilitatório ($102,7\% \pm 3,9 - n=4$), mantém estabilidade nas respostas contráteis na preparação NPE de rato. Os animais que receberam a injeção de Bjssu apresentaram uma diminuição significativa da resposta contrátil a partir dos 10 min. permanecendo até o final do experimento (120min.).

Para os ensaios de neutralização do VBjssu, o AVB foi administrado intravenosamente sendo infundido em 30 minutos. Foram seguidos protocolos preconizados de soroterapia (BRASIL, 2001). O resultado mostrou que o efeito neurotóxico induzido pelo VBjssu foi neutralizado significativamente pelo AVB, produzindo uma proteção ao final de 120 min. de experimento em: $92,2\% \pm 0,45$ ($n=4$).

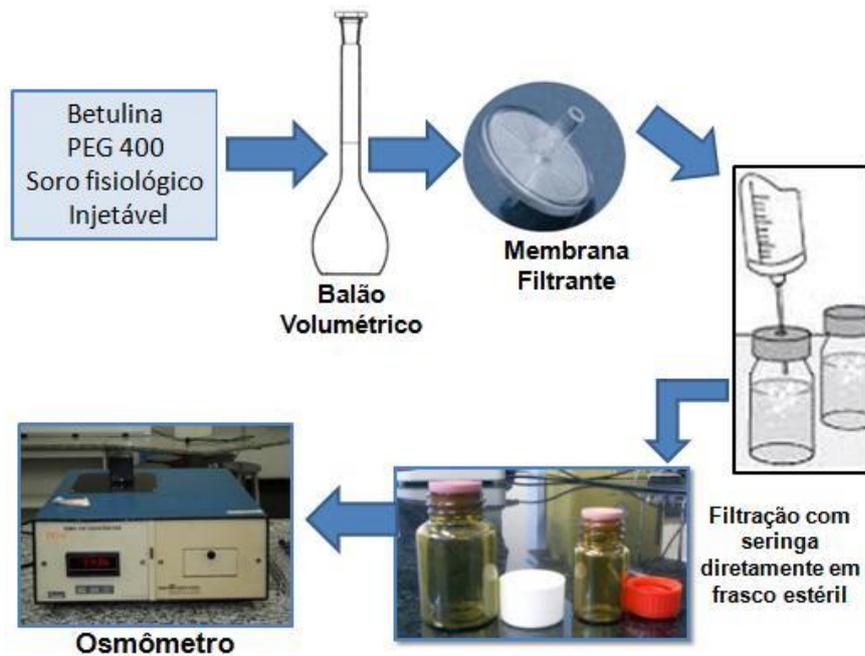
Figura 28 - Efeito farmacológico da preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE), sob estímulo indireto. Resposta contrátil do controle salina, ação neuromuscular do VBjssu e neutralização do VBjssu (veneno de *Bothrops jararacussu*) com antiveneno botrópico comercial (AVB). 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.



5.7. Elaboração e produção do Fitoquímico Injetável de Betulina

A formulação do fitoquímico injetável de Betulina (Figura 29) foi preparada em balão volumétrico. Após, a solução foi filtrada com membrana de 0,22 μM . Em seguida, a formulação foi diretamente transferida para uma ampola estéril. A isotonicidade da solução de Betulina injetável foi avaliada através da mensuração da pressão osmótica em comparação com a pressão osmótica do soro fisiológico.

Figura 29 - Desenho experimental demonstrando as etapas de formulação do fitoquímico injetável de Betulina.



Utilizando o osmômetro (Fiske Associates) às leituras da pressão osmótica do soro fisiológico e do fitoquímico injetável de Betulina obtidas foram às seguintes:

Soro Fisiológico - 281 miliosmol por litro (mOsm/L);

Soro Fisiológico - 283 mOsm/L;

Betulina Injetável - 3162 mOsm/L;

Betulina Injetável - 3134 mOsm/L.

6. DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes contêm 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; IWANAGA; SUZUKI, 1979; BJARNASON; FOX, 1988/89).

O veneno da *Bothrops jararacussu* apresenta em sua composição componentes tais como fosfolipases A₂ miotóxicas, metaloproteinases e sua principal fração, a Bothropstoxina-I (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). As metaloproteinases são uma família numerosa de enzimas proteolíticas dependentes de zinco que exercem múltiplos efeitos deletérios, em nível local, como hemorragias (BORKOW, GUTIÉRREZ; OVADIA, 1993; FRANCESCHI et al., 2000), mionecrose (RUCAVADO et al., 1995), edema (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995), formação de bolhas (RUCAVADO, NÚÑEZ; GUTIÉRREZ, 1998), dermonecrose (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000), e atividades pró-inflamatórias (RUCAVADO et al., 2002). As metaloproteinases também atuam no nível sistêmico, provocando hemorragia, coagulação, defibrinogenação, e inibição da agregação plaquetária (KAMIGUTI et al., 1996). Apesar deste veneno não conter em sua composição neurotoxinas que provoquem efeitos neurotóxicos, exibe um importante bloqueio neuromuscular em preparações nervo-frênico diafragma de camundongo (HELUANY et al., 1992).

Diferentemente, o veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta em sua composição toxinas, enzimas e peptídeos, sendo os componentes mais abundantes as fosfolipases e as neurotoxinas (NOGUEIRA; SAKATE, 2004). Quatro diferentes grupos de toxinas compõem este veneno sendo elas: crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2009). Estes componentes conferem a este veneno três ações principais: neurotoxicidade, miotoxicidade e coagulabilidade. A crotoxina é o componente mais abundante do veneno do gênero *Crotalus*. Trata-se de um composto neurotóxico composto por duas subunidades, a Crotoxina A (uma crotapotina) e a Crotoxina B (uma fosfolipase A₂) (BANCHER; ROSA; FURLANETO et al., 1973), sendo o principal efeito desta PLA₂, o bloqueio da neurotransmissão pré e pós-sinapse (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 trabalho 4 fitoquímicos denominados triterpenóides, foram extraídos das frações hexano e diclorometano da *D. alata* e ensaiados com os venenos de *Bothrops jararacussu* e de *Crotalus durissus terrificus*. Todos exibiram habilidade em neutralizar os efeitos do VBjssu, assim como Lupenona e Betulina para o VCdt. Na literatura, os triterpenóides também são descritos como saponinas triterpênicas. As saponinas mais frequentemente encontradas na natureza possuem 30 átomos de carbono e núcleo triterpênico, podendo ser originado dependendo do rearranjo, triterpenos tetracíclicos e os triterpenos pentacíclicos (ABE; ROHMER; PRESTWICH, 1993). O comportamento anfífilo das saponinas e a capacidade de formar complexos com fosfolídeos de membranas, esteróides e proteínas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias (JENTSCH; SPIEGL; FUCHS, 1961). Desta forma, supõe-se neste estudo que o efeito protetor dos triterpenóides contra o VBjssu e VCdt, se dê através da formação de complexos com as proteínas presentes nos venenos, no entanto, deve ser levado em consideração as características bioquímicas de ambos os venenos, assim como as características químicas de cada um dos triterpenóides estudados.

Até agora, poucos triterpenóides apresentaram propriedades antiofídicas. O acetato de lupeol demonstrou neutralizar significativamente a letalidade, hemorragia, edema e fosfolipase A_2 induzidos pelo veneno de *Daboia russelii*. Também demonstrou habilidade em neutralizar a letalidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e alterações respiratórias induzidas pelo veneno de *Naja kaouthia* em modelos animais (CHATTERJEE; CHAKRAVARTY; GOMES, 2006). O ácido betulínico foi relatado por ter diversos efeitos farmacológicos, incluindo atividades antitumorais e ações antiinflamatórias, além de exibir potencial para inibir a fosfolipase A_2 do veneno de *Naja nigricollis* (TSENG; LIU, 2006). Os triterpenóides extraídos da *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae) popularmente conhecida como vassoura,

exibiram efeitos antiinflamatórios contra reações inflamatórias induzidas por fosfolipase A₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (ZALEWSKI et al., 2011).

A Betulina, segundo SOUZA; FELFILI (2006) apresenta atividade antiinflamatória e mostra ser um potente inibidor da fosfolipase A₂. Partindo-se de premissas que substâncias com ação antiinflamatória tem elevado potencial antifóbido (SOARES et al., 2005), pressupõe-se sua potencial capacidade de proteção contra os efeitos dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*, aqui demonstrados. Além disso, através da análise morfológica foi verificado que a Betulina é o triterpenóide que melhor protege contra os efeitos de miotoxicidade e neurotoxicidade em preparações neuromusculares *ex vivo* para ambos os venenos. A Betulina também apresentou ação facilitadora na junção neuromuscular. Fitoquímicos que induzem efeitos facilitadores na junção neuromuscular são pouco relatados na literatura, provavelmente porque suas propriedades medicinais estão focadas em outras áreas de interesse. BASU et al., (2005) foram os pioneiros no estudo da ação facilitadora de fitoquímicos. Eles mostraram que a fração teaflavina de chá preto foi responsável por este efeito na junção mioneural esquelética, pelo mecanismo envolvendo cálcio e óxido nítrico como fatores moduladores da resposta contrátil. Assim, o mecanismo de facilitação exibido pela Betulina merece esclarecimentos em estudos posteriores.

Neste trabalho a Betulina foi eleita para formulação de um injetável. No entanto, a formulação obtida apresentou alta osmolaridade, não podendo ser administrada intravenosamente. Os líquidos (soluções) injetados pela via intravenosa devem sempre ser isosmóticos e neste caso a bibliografia assume valores que estão em torno de 285-310 mOsm/L. Soluções hiperosmóticas quando infundidas intravenosamente levam à lesões vasculares, podendo ocorrer perda de células do endotélio venoso, reação inflamatória local, edema ou trombose, ocasionando uma flebite que também poderá levar a coágulos sanguíneos dificultando a circulação do sangue. Neste sentido, para minimizar ou evitar danos vasculares, a *Infusion Nurses Society* (INS) estadia o risco de se desenvolver flebite atendendo à osmolaridade da solução. Soluções com uma osmolaridade menor que 450 mOsm/L apresentam baixo risco; entre 450-600 mOsm/L apresentam risco moderado e acima de 600 mOsm/L apresentam alto risco (STRANZ; KASTANGO, 2002). Como a formulação da Betulina injetável apresentou uma pressão osmótica

acima de 3000 mOsm/L tornou-se claro que a solução não poderia ser administrada intravenosamente, pelo elevado risco de causar dano vascular.

Ainda assim, ensaios de neutralização em modelo *in situ* com o VBjssu e com o antiveneno botrópico foram conduzidos. Os resultados obtidos deixaram claro que a via intravenosa também se mostra uma eficaz via de administração para experimentação. Neste sentido, observou-se que a eficácia da neutralização do veneno está relacionada ao tempo em que o soro antibotrópico é administrado. Quando infundido em 30 minutos, conforme os protocolos preconizados de soroterapia (BRASIL, 2001), obteve-se sucesso em todos os ensaios realizados.

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SERAFINI; MAIANI; FERRO-LUZZI, 1997). Podem ser formados a partir de duas rotas biogênicas: pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos ou pela via do acetato-polimalato a partir da acetil-coenzima A ou malonil-coenzima A. A origem biogênica determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Desta forma, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição orto, que se formam a partir do ácido cinâmico ou benzóico, dando origem aos ácidos fenólicos. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em meta, como é o caso dos flavonóides (SIMÕES, 2000).

Diversos flavonóides exibem ação antiofídica. Eles são descritos por terem a habilidade de ligar-se aos polímeros biológicos, e têm mostrado inibir PLA₂ (MORS et al., 2000). O efeito inibitório da rutina que foi isolada da planta *Phyllanthus klotzchianus* demonstrou eficiência contra os venenos de *Vipera russelli* e *Crotalus atrox* (CHIPPAUX et al., 1997). Segundo CINTRA-FRANCISCHINELLI et al. (2008b) o extrato metanólico de *Casearia sylvestris* demonstrou habilidade contra o veneno de *Bothrops jararacussu* e foi sugerido que esta proteção deveria ocorrer através de um fitocomplexo contendo rutina. Outro exemplo são os constituintes de *Primula denticulata* sendo eles: primetina, quercetina, hesperidina, quercitrina, isoquercitrina, luteolina, canferol, e apigenina. Todos estes flavonóides mencionados mostram a característica estrutural da proximidade do grupo hidroxila fenólica no átomo de carbono 5 e a carbonila pirônica (MORS et al., 2000).

O flavonóide 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona, estudado neste trabalho, também exibiu atividade antiofídica contra o veneno de *Bothrops jararacussu*,

corroborando com estudos retroativos executados por Puebla et al. (2010) que descreveram que a subfração F7 da *D. alata* era a que exibia maior atividade contra os efeitos do VBjssu. Nesta fração estavam presentes os fitoquímicos, Ácido Vanílico, 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona e 3', 4', 6-trihydroxyaurona. A pequena quantidade do 3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona obtida pelo fracionamento da *D. alata* e sua não disponibilidade comercial nos levaram a não investir neste fitoquímico em testes contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Uma diversidade de compostos fenólicos vem sendo descritos por suas atividades farmacológicas podendo-se citar: ação bactericida, fungicida, antiviral, inibição da peroxidação de lipídeos e sequestrador de radicais livres e ação antitumoral (SIMÕES et al., 2007).

Eles também vêm sendo estudados como potenciais antiofídicos. Isoladas de uma planta popularmente chamada “cabeça-de-negro” a cabenegrina A-I e A-II são os principais ingredientes do “Específico Pessoa”, um remédio usado popularmente no Nordeste do Brasil contra envenenamento por picada de serpente (NAKAGAWA et al., 1982). O edunol foi isolado de *Harpalyce brasiliana*, uma planta também encontrada no Nordeste Brasileiro e usada contra picada de serpente. Este composto apresenta atividade antimiotóxica e antiproteolítica contra peçonha de *Bothrops jararacussu*, além de expressiva propriedade inibitória de PLA₂ (DA SILVA et al., 2004).

A wedelolactona um tipo de cumestano, foi encontrada por ser ativa contra peçonhas da *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Lachesis muta*, além de serpentes da América do Norte, como *Crotalus viridis viridis* e *Agkistrodon contortrix* (MELO et al., 1994; MORS et al., 2000). Estes cumestanos, isolados de *Eclipta prostrata*, e alguns de seus derivados sintéticos estão entre os produtos mais ativos. A concentração 30 µM de wedelolactona antagonizou a liberação de creatinoquinase (CK) induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu* no músculo esquelético (DA SILVA et al., 2001).

O ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzóico isolado e purificado do extrato metanólico da raiz de *Hemidesmus indicus* neutralizou a inflamação induzida pela peçonha de *Vipera russelli*. Este composto puro potencializou a neutralização do efeito letal da peçonha pelo antissoro comercial equino polivalente em modelos experimentais (ALAM; GOMES, 1998). O ácido elágico isolado do extrato aquoso de *C. sylvestris*

inibiu os efeitos miotóxicos e edematogênicos provocados pela PLA₂, Asp49 BthTX-II, isolada do VBjssu (DA SILVA, 2008).

Os ácidos fenólicos estudados neste trabalho (Ácido Vanílico, Vanilina e Ácido Protocatecuico) foram obtidos comercialmente, mas estão disponíveis em pequena quantidade na *D. alata*. Mors et al. (2000) afirmam que dos derivados do Ácido Benzóico, o Ácido 2,4-dihidroxibenzoico e 3,4 - Ácido Di-hidroxibenzoico ou o Ácido Protocatecuico foram os mais ativos desta categoria contra os efeitos do veneno de *Bothrops jararacussu*. Nos experimentos realizados neste trabalho o Ácido Protocatecuico, exibiu pouca ou baixa atividade antibotrópica. Essas diferenças podem ser consideradas como decorrentes de modelos experimentais diferentes. Em experimentos *in vivo*, podem ocorrer reações do organismo do animal que tem condições de utilizar mecanismos de defesa para neutralizar agressões ao seu organismo, enquanto no modelo *ex vivo*, a interação se dá apenas entre o veneno e o músculo isolado (ROSTELATO-FERREIRA, 2007).

O mecanismo de ação de todos os compostos fenólicos estudados (flavonóides e ácidos fenólicos) não é claro e exige maiores investigações. No entanto todos os fitoquímicos ensaiados neste trabalho são tidos como polifenóis, ou seja, substâncias caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático. Além disso, os compostos fenólicos vêm sendo relatados como substâncias antioxidantes, por possuírem uma estrutura ideal para o sequestro de radicais. Atribui-se o efeito antioxidante das plantas aromáticas devido a presença de grupamentos hidroxilas em seus compostos fenólicos (SCHAHIDI; JANITHA; WANASUNDRA, 1992). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade em frente a outros antioxidantes, solubilidade e interação com as membranas e capacidade de quelar metais de transição (BARREIROS et al, 2000). Os componentes inorgânicos mais comuns em venenos de serpentes são: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn. Alguns destes componentes exercem função de mantenedores de estabilidade estrutural de certas proteínas, como as metaloproteinases, que são fatores hemorrágicos e outros funcionam como catalisadores em funções enzimáticas específicas (FRIEDERICH; TU, 1971; BJARNASON; FOX, 1988/89). Neste sentido supõem-se, através deste trabalho, que um possível mecanismo de ação dos compostos fenólicos ocorre pela

capacidade que estes fitoquímicos possuem em quelar os metais de transição disponíveis no veneno aqui estudado (VBjssu).

A busca por plantas que concentrem os principais fitoquímicos (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, agregam valor medicinal à planta e contribuem para a sua preservação. Nas últimas décadas, diversos estudos demonstraram que a flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico que podem ser utilizadas no futuro como drogas ou como modelo para drogas de interesse médico científico (COSTA, 2010).

Por fim, este trabalho traz contribuição para a ciência e também para a saúde pública, uma vez que os fitoquímicos estudados neste modelo experimental que exibiram atividade antiofídica poderão futuramente ser utilizados para complementar a soroterapia em acidentes ofídicos. Neste sentido ensaios futuros em outros modelos experimentais bem como, o interesse de outras especialidades como a tecnologia farmacêutica, devem ser despertados para que seja possível avançar em novas terapias alternativas e inovadoras, tanto na área clínica como na veterinária (LANS et al., 2001).

7. CONCLUSÃO

Os triterpenóides estudados (Lupeol, Betulina, 28-OH-Lupenona e Lupenona) exibem diferentes graus de proteção para o VBjssu, sendo Lupeol e Betulina os que apresentam maior habilidade contra este veneno. Para o VCdt, os melhores agentes neutralizantes foram Lupenona e Betulina. Porém, através da análise morfológica verificou-se ser a Betulina o triterpenóide que melhor protege contra os efeitos de miotoxicidade e neurotoxicidade em preparações neuromusculares *ex vivo* para ambos os venenos.

Nos ensaios de neutralização contra o VBjssu em modelo *ex vivo*, ficou demonstrado não haver diferença significativa do tratamento com a Betulina em relação ao AVB.

A formulação do fitoquímico injetável de Betulina apresentou alta osmolaridade, não podendo ser administrada pela via intravenosa, na formulação estudada.

Os ensaios de neutralização em modelo *in situ* com o VBjssu e com o antiveneno botrópico injetado pela via intravenosa é eficaz quando infundido segundo os protocolos preconizados de soroterapia.

Todos os ácidos fenólicos (Ácido Vanílico, Vanilina e Ácido Protocatecuico) neutralizam de forma parcial e significativa os efeitos induzidos pelo VBjssu em modelo *ex vivo*, sendo o Ácido Vanílico o fitoquímico que melhor exhibe atividade contra os efeitos deste veneno.

O flavonóide ensaiado neste estudo (3',7,8-Trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona), neutraliza os efeitos induzidos pelo VBjssu em modelo *ex vivo*.

REFERÊNCIAS

ABE, I.; ROHMER, M.; PRESTWICH, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. **Chem. Rev.**, v. 93, n. 6, p. 2189-2206, 1993.

ALAIN-MICHEL, B. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2722-2735, 2007.

ALAM, M. I.; GOMES, A. Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant 'sarsaparilla' (*Hemidesmus indicus* R. Br.). **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1423-1431, 1998.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, J. F.; RIBEIRO, S. M. Cerrado, espécies vegetais úteis. **Embrapa - CPAC**, 1998.

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, n. 4, p. 251-255, 1991.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 220-227, 1986.

AMARAL, A. Campanhas anti-ophidicas. **Mem. Inst. Butantan.**, v. 5, p. 195-232, 1930.

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

ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos Acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L.; FRANÇA, F. O.; FAN, H. W.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD, V., ed. **Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Savier, p. 6-12, 2003.

ARAÚJO, A. A. **Medicina Rústica**. 3ª ed. São Paulo, Brasiliense, 1979.

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. (orgs.). **Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. Sarvier, 2ª ed., p. 108-11, 2009.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD-JÚNIOR, V. (orgs.). **Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 91-98, 2003.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1163-1168, 1987.

BANCHER, W.; ROSA, R. R.; FURLANETO, R. S. 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.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. p. 262-273. In: BARRAVIERA, B. **Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB, p. 411,1999.

BARRAVIERA, B. Acidentes por animais peçonhentos. **Arq. Bras. Med.**, v. 64, n. 1, p. 14-20, 1990.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2000.

BARROS, M. A. G. Flora medicinal do Distrito Federal. **Bras. Flor.**, Brasília, DF, v. 12, n. 50, p. 35-45, 1982.

BARROSO, R. D. Ofidismo no Brasil. **Bol. Inst. Vital Brazil**,. v. 26, p. 35-47, 1944.

BARTHLOTT, W.; LAUER, W.; PLACKE, A. Global distribution of species diversity in vascular plants: towards a world map of phytodiversity. **Erdkunde**, v. 50, n. 4, p. 317-327, 1996.

BASU, S.; CHAUDHURI, T.; CHAUHAN, S. P. S.; DAS GUPTA, A. K.; CHAUDHURY, L.; VEDASIROMONI, J. R. The theaflavin fraction is responsible for the facilitatory effect of black tea at the skeletal myoneural junction. **Life Sci.**, v. 76, n. 26, p. 3081-3088, 2005.

BELLUOMINI, H. E. Produção de veneno de serpentes em cativeiro. **Arq. Inst. Biol.**, v. 31, n. 4, p. 149-154, 1964.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 81, n. 1, p. 55-63, 2011.

BÉRNILS, R. S. (org.). Répteis brasileiros - Lista de espécies, 2009. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

BJARNASON, J.; FOX, J. W. Hemorrhagic Toxins Snake Venoms. **J. Toxicol. Toxin**, v. 7, n. 2, p. 121-209, 1988/89.

BOCHNER, R. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, 1999. Disponível em: <<http://www.fns.gov.br/cenepi/publicacoes.htm>>. Acesso em 13 de agosto de 2008.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, 2003.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venoms of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 31, n. 9, p. 1137-1150, 1993.

BORGES, M. H. SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.

BRASIL, Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)/ Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_casos_por_mes_2010.pdf>. Acesso em: 12 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500>. Acesso em: 25 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTAL DA SAÚDE, 2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2^a. ed. Fundação Nacional da Saúde: Brasília, 2001.

BRAZIL, V. **A Defesa Contra o Ophidismo**. São Paulo: Pocai & Weiss, 1911.

BRASIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras de cobras. **Rev. Med. São Paulo**, v. 6, n. 13, p. 265-278, 1903.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. . **Rev. Med. São Paulo**, p. 255-260, 1901.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. **Toxicon**, v. 14, n. 3, p. 221-233, 1976.

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

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

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, n. 3, p. 432-441, 2010.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 22, n. 3, p. 265-278, 2003.

CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H. Introdução ao ofidismo. **Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, SP: SARVIER, p. 3-5, 2003.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zool. Scr.**, v. 41, n. 2, p. 109-124, 2012.

CARTA DE SÃO VICENTE, 1560. Padre José de Anchieta. **Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**, v. 7, p.19-20, 1997.

CARVALHO, M. A.; NOGUEIRA, F. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, RJ, v. 14, n. 4, 1998. APUD: WORDL HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms, v. 58. Geneva: WHO Publication, 1981.

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* **J. Ethnopharmacol.**, v. 106, n. 1, p. 38-43, 2006.

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, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHILPA, R. R.; ESTRADA, M. J. Química de las plantas alexiteras. **Interciencia**, v. 20, n. 5, p. 257-263, 1995.

CHIPPAUX, J. P.; RAKOTONIRINA, V. S.; RAKOTONIRINA, A.; DZIKOUK, G. Drug or plant substances which antagonize venoms or potentiate antivenins. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 90, n. 4, p. 282-285, 1997.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M. G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LEITE, G. B.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Effects of Commonly Used Solubilizing Agents on a Model Nerve-Muscle Synapse. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 5, p. 721-726, 2008a.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M. G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LEITE, G. B.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytother. Res.**, v. 22, n. 6, p. 784-790, 2008b.

CINTRA, A. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Protein. Chem.**, v. 1, n. 12, p. 57-64, 1993.

COLLACO, R. C. O.; COGO, J. C. ; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ROCHA, T.; OSHIMA-FRANCO, Y.; RANDAZZO-MOURA, P. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 614-622, 2012.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v. 1, 1931.

COSTA, T. R. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

DAMICO, D. C. S.; BUENO, L. G. F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; NOVELLO, J. C. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. **Toxicon**, v. 46, n. 2, p. 222-229, 2005.

DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 655-666, 2008.

DA SILVA, A. J. M.; COELHO, A. L.; SIMA, A. B. C.; MORAES, R. A. M.; PINHEIRO, D. A.; FERNADES, F. F. A.; ARRUDA, E. Z.; COSTA, P. R. R.; MELO, P. A. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpanes against snake venom. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, n. 2, p. 431-435, 2004.

DA SILVA, A. J. M.; MELO, P. A.; SILVA, N. M.; BRITO, F. V.; BUARQUE, C. D.; DE SOUZA, D. V.; RODRIGUES, V. P.; POÇAS, E. S.; NOËL, F.; ALBUQUERQUE, E. X.; COSTA, P. R. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of coumestans with different patterns of oxygenation. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, n. 3, p. 283-286, 2001.

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: Unesp, p. 18, 1996.

DOIN-SILVA, R. A. **Efeitos da irradiação laser nas alterações musculares induzidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu***. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas, 2003.

DOS-SANTOS, M. C.; ASSIS, E. B.; MOREIRA, T. D.; PINHEIRO, J.; FORTES-DIAS, C. L. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian regio. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 958-961, 2005.

EMBRAPA, 2010. A Embrapa nos biomas brasileiros. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/publicacoes/institucionais/titulos-avulsos/laminas-biomas.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2012.

FARRAPO, N. M. **Efeito antibotrópico da *Plathymenia reticulata* Benth sob o parâmetro da junção neuromuscular**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, São Paulo, 2010.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, J. R. R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.

FERRAZ, M. C.; CELESTINO-PARRILHA, L. A.; DUARTE-MORAES, M. S.; AMARAL FILHO, J.; COGO, J. C.; SANTOS, M. G.; FRANCO, L. M.; GROppo, F. C.; PUEBLA, P.; FELICIANO, A. S.; OSHIMA-FRANCO, Y. The Effect of Lupane Triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the in vitro Neuromuscular Blockade and Myotoxicity of two Snake Venoms. **Curr. Org. Chem.**, v. 16, n. 22, p. 2717-2723, 2012.

FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Rev. Inf. Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, n. 61, p. 19-23, 1980.

FONTELES, M. C.; GADELHA, M. G. T.; SOUZA, N. R.; ALENCAR, V. H. M.; MATOS, F. J. A. Algumas propriedades farmacológicas de extratos de plantas do Nordeste brasileiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, n. 1/2, p. 113-121, 1988.

FONSECA, F. **Animais Peçonhentos**. São Paulo. Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais. Instituto Butantan, 1949.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, J. R. V. (orgs.). **Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 72-86, 2003.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. 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, 2003.

FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 38, n.1, p. 63-77, 2000.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metal in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmacol.**, v. 20, n. 7, p. 1549-1556.1971.

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

GÜNTZEL, A. R. C. **Avaliação das atividades farmacológicas de Extratos de *Casearia sylvestris* Sw.** 49 f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) - Centro Universitário UNIVATES, Rio Grande do Sul, 2008.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venos metalloproteinases: their role in the patogénesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snakes venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, n. 4, p. 211-223, 1989.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review the crotoxin complex- an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 19, 1978.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3 ed. London: Academic, 1988.

HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1203-1210, 1992.

HODGSON, W.C., WICKRAMARATNA, J.C. In vitro neuromuscular activity of snake venoms. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 9, p. 807–814, 2002.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTOS-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615- 627, 1988.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2004. Mapa da vegetação do Brasil e Mapa de Biomas do Brasil Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

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.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Snake Venoms**. Berlin, Springer-Velag, p. 61, 1979.

JANUÁRIO, A. N.; SANTOS, A. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem. Biol. Interact.**, v. 150, n. 3, p. 243-251, 2004.

JENTSCH, K.; SPIEGL, P.; FUCHS, L. Vergleichende Untersuchung der anthelminthischen Wirksamkeit von Saponinen *in vitro*. **Arzeimittelforsch.**, v. 11, p. 413-414, 1961.

JIA, L. G.; SHIMOKAWA, K. I.; BJAMSON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, v. 34, n. 11-12, p. 1269-76, 1966.

JORGE, M. T.; CARDOSO, J. L. C.; CASTRO, S. C. B.; RIBEIRO, L. A.; FRANÇA, F. O. S.; SBRÓGIO, M. E. A.; KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L.; MONCAU, J. E. C.; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. A randomized blinded comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 1, p. 111-114, 1995.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Trop. São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 374-354, 1992.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 627-642, 1996.

KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R.; GILBERT, B.; GUIMARÃES, I. S. S.; MAGALHÃES, M. T. A química de leguminosas brasileiras - derivados do lupeol em *Dipteryx alata*. **An. Acad. Bras. Ciênc. Letr.**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3-4, p. 420, 1966.

LAGO, L. A.; MARQUES JUNIOR, A. P.; MELO, M. M.; LAGO, E. P.; OLIVEIRA, N. J. F.; ALZAMORA-FILHO, F. Serological biochemical profile of bovines poisoned experimentally with free iodized crotalic poison and iodized incorporated in liposomes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 5, p. 653-657, 2004.

LALLOO, D. G. et al. Neurotoxicity, anticoagulant activity and evidence of rhabdomyolysis in patients bitten by death adders (*Acanthophis* sp.) in southern Papua New Guinea. **QJM**, v. 89, n. 1, p. 25-35, 1996.

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 1, n. 10-26, 2001.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. How many species are there in Brazil? **Conserv. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 619–624, 2005.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885–901, 2003.

LOMONTE, B.; LEON, G.; HANSON, L.A. Similar effectiveness of Fab and F(ab')₂ antivenoms in the neutralization of hemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1197-1202, 1996.

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

LORENZI, H.; **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarium, p.115, 1992.

MACKESSY, S. P. (ed.). **Handbook of venoms and toxins of Reptiles**. New York: Taylor & Francis Group; 2009.

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, n. 4, p. 228-233, 1986.

MAGALHÃES, O. Campanha antiofídica em Minas Gerais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 56, n. 2, p. 291-371. 1958.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and cells by the comet assay. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, n. 3, p. 337-342, 2004.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; OLIVEIRA, C. Z.; RUEDA, A. Q.; MENALDO, D. L.; BELEBONI, R. O.; STÁBELI, R. G; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 7, n. 8, p. 743-756, 2007.

MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A.; MENDES, F. N. P.; FONTELES, E. M. C. Constituintes químicos e propriedades farmacológicas de *Dipteryx alata* Vog. Suplemento. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, n. 1/2, p. 349-350, 1988.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol. Ther.**, v. 48, n. 2, 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, P. A.; NASCIMENTO, M. C. do; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of myotoxic and haemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata*(Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, n. 5, p. 595-603, 1994.

MENDONÇA, R.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. N. Flora vascular do Cerrado. **EMBRAPA-CPAC**, 1998.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

NAZATO, V. S. et al. *In Vitro* Antiophidian Properties of *Dipteryx alata* Vogel Bark Extracts. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 5956-5970, 2010.

NAKAGAWA, M.; NAKANISHE, K.; DARKO, L. L.; VICK, J. A. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Lett.**, v. 23, n. 38, p. 3855-3858, 1982.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. Acidente crotálico em animais domésticos. **Rev. CFMV**, v. 10, n. 31, p. 47-56, 2004.

NUNES, B. P. F. **Efeito do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e da crotoxina sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina em camundongos**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010. Fatos e números sobre acidentes ofídicos. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/>. Acesso em: 22 ago. 2011.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Rabies and envenomings: a neglected public health issue, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf>. Acesso em: 25 out. 2012.

OSHIMA-FRANCO, Y. **Composición química del extracto etanólico de *Dipteryx alata* Vogel**. 37 f. Pós-Doutorado, Departamento de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca. Salamanca, Espanha, 2009.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; DAL-BELO, C. A.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; HÖFLING, A. M. C.; SIMIONI, L. R. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 95, n. 4, p. 175-182, 2004.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; VALÉRIO, A. A.; HYSLOP, S.; ANDRILAO-ESCARSO, S.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Rabbit antivenom efficacy against myotoxic and neurotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 8, n. 2, p. 226-243, 2002.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; SILVA, G. H.; CARDOSO, D. F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1477-1485, 2001.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 12, p. 1832-1839, 2000.

OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C.; FIDELIS, A.T.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V.D.; BLANCO, C. C.; BOLDRINI, I. I.; BOTH, R. ; FORNECK, E. D. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. **Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.**, v. 9, p. 101-116, 2007.

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

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 875-87, 1981.

PENTEADO, D. C. **Accidentes ophidicos: Efeitos do tratamento específico sobre a mortalidade ophidica**. Coletânea dos Trabalhos do Instituto Butantan, 1901-1917 (Instituto Butantan, org.). Instituto Butantan. São Paulo, p. 325-331, 1918.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, v. 50, n. 1, p. 93-96, 2004.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, v. 47, n. 1, p. 4 - 29, 2001.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, v. 2, p. 707, 1984.

PIOVACARI, S. M. F. **Einstein: Educ. Contin. Saúde**. v. 2, n. 7, p. 106, 2009.

PUEBLA, P.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M.; DOS SANTOS, M. G.; DA SILVA, R. V.; RUBEM-MAURO, L.; SAN FELICIANO, A. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 8193-8204, 2010.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III. Comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinb. J. Bot.**, Edinburgh, v. 60, n. 1, p. 57-109, 2003.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. A. B.; SILVA, M. R. Estudo preliminar da distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia Cerrado sentido restrito nos estados compreendidos pelo Bioma Cerrado. **Bol. Herb. Ez. Paulo Heringer**, Brasília, v. 5, p. 5-43, 2000.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* série de 3139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 5, p. 475-480, 1997.

RIBEIRO, L. A.; AGOSTINI UTESCHER, C. L.; VIEIRA, S. L. P.; FENSTERSEIFER, S.; MUKUNO, H.; JORGE, M. T. Avaliação em camundongo da eficácia do antiveneno administrado no local da inoculação intramuscular do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v. 35, n. 1, p. 23-27, 1993.

RIZZINI, C. T.; WORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo, EPUSP, p. 207, 1976.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K. TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo:Premier, 1997.

ROCHA, M. M. T. **Estudo comparativo dos venenos de *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis***. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; JIANG, M. S.; FLETCHER, J. E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A_2 myotoxin. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1479-1489, 1995.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 475-489, 1983.

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

ROSTELATO-FERREIRA, S. **A influência da heparina em baixa concentração sobre a miotoxicidade do veneno de *Bothrops jararacussu* e Bothropstoxina-I.** 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp, Campinas, 2007.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; DIAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm.**, v. 11, n. 2, p. 121-128, 2002.

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 79, n. 4, p. 245-254, 1998.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol. Suppl.**, v. 63, n. 3, p. 186-199, 1995.

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, n. 2, p. 203-251, 1991.

SALOMÃO, M. G.; ALBOLEA, A. B. P.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpetol. Rev.**, v. 34, n. 3, p. 307-312, 2003.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. Baru: Biologia e Uso. 2004. Disponível em: <www.cpac.embrapa.br/download/336/t>. Acesso em: 25 set. 2011.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of biological activities in venom from three subspecies of PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of biological activities in venom from three subspecies of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp. Bioch. Physiol.**, v. 122, n. 1, p. 61-73, 1999.

SCHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDRA, P. D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v. 32, n.1, p. 67-103. 1992.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAUJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. EMBRAPA: Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2002. Disponível em: <www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinasconservacao.pdf> Acesso em 10/03/2010.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. F. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 8, p. 3148-3151, 1997.

SGARBI, L. P. S.; ILIAS, M.; MACHADO, T.; BARRAVIERA, B. Human envenomations due to snakebites in Marília, state of São Paulo, Brazil. A retrospective epidemiological study. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 70-78 1995.

SILVA, A. M. M. et al. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. **Toxicon**, v. 29, n. 12, p. 1471-1480, 1991.

SILVA, J. O. S. **Atividade farmacológica de frações de diferentes polaridades de *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos ofídicos (cascavel e jararacuçu)**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, São Paulo, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Ed: UFSC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS / Ed. da UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª. ed. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 18 de set. 2009.

SLOTTA, K.H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno a cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v. 12, p. 505-512, 1938.

SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 22, p. 2625-2641, 2005.

SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO Y.; VIEIRA, C. A.; LEITE, G. B.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; RODRIGUES, L. S. Mn_{2+} ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, n. 6, p. 668–677, 2002.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

STRANZ, M.; KASTANGO, E. S.; A review of pH and osmolarity. **Int. J. Pharm. Compd.**, v. 6, n. 3, p. 216-220, 2002.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de fitoterapia herbarium**. 4^a. ed., Curitiba, PR: Herbarium Laboratório Botânico, 2001.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Avaliação nutricional e da proteína e do óleo de semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 15, n. 1, p. 66-69, 1995.

TORRENT, R. M. R. et al. Neurotoxicological effects of trombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 144-152, 2007.

TSENG, H.C.; LIU, Y.C. Immobilized betulinic acid column and its interactions with phospholipase A_2 and snake venom proteins. **J. Sep. Sci.**, v. 27, n. 14, p. 1215-1220, 2004.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 37-62, 1996.

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

VARANDA, E. A., GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARR AVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, p. 205-224, 1994.

VAZ, E. Vital Brazil. **An. Paul. Med. Cirurg.**, v. 60, p. 347-366, 1950.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, R. A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Meio Ambient. Saúde**, v. 2, n. 1, p. 57-64, 2001.

WHO. Genebra, Worl Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/em>. Acesso em 16 ago 2007.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematic, No. 3. **Toxicon**, v. 37, n. 8, p. 1123-1129, 1999.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematic, **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 299-307, 1998.

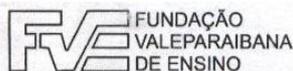
WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. **Toxicon**, v. 35, n. 3, p. 319- 340, 1997.

ZAHER, H.; GRAZZIOTIN, F. G.; CADLE, J. E.; MURPHY, R. W.; MOURA-LEITE, J. C.; BONATTO, S. L. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. **Pap. Avulsos Zool.**, v. 49, n. 11, p. 115-153, 2009.

ZALEWSKI, C. A.; PASSERO, L. F.; MELO, A. S.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. Evaluation of anti-inflammatory activity of derivatives from aerial parts of *Baccharis uncinella*. **Pharm Biol.**, v. 49, n. 6, p. 602-607. 2011.

ZAMUNÉR, S. R.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 259-271, 2004.

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.ºA013/CEUA/2011, sobre “**Estudo biomonitorado de compostos isolados da planta *Dipteryx alata* Vogel contra venenos ofídicos**” 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, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, sendo considerado **APROVADO**.

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, 15 de Março de 2011.

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

ANEXO B – Artigo publicado em periódico

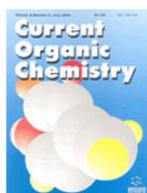
Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.org

Current Organic Chemistry, 2012, 16, 2717-2723

2717

The Effect of Lupane Triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the *in vitro* Neuromuscular Blockade and Myotoxicity of two Snake Venoms

Miriéle Cristina Ferraz¹, Luciane Aparecida Celestino Parrilha¹, Maria Silvia Duarte Moraes¹, Jorge Amaral Filho¹, José Carlos Cogo², Marcio Galdino dos Santos³, Luiz Madaleno Franco⁴, Francisco Carlos Groppo⁵, Pilar Puebla⁶, Arturo San Feliciano⁶ and Yoko Oshima-Franco^{1,*}



¹University of Sorocaba, UNISO, Sorocaba, SP, Brazil; ²University of Vale do Paraiba, UNIVAP, S. J. dos Campos, SP, Brazil; ³Federal University of Tocantins, UFT, Porto Nacional, TO, Brazil; ⁴Methodist University of Piracicaba, UNIMEP, Piracicaba, SP, Brazil; ⁵Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil; ⁶Salamanca University, USAL, Salamanca, Spain

Abstract: Traditional medicine of Brazilian central savannah preconizes *Dipteryx alata* extracts against snakebites venoms. Previous studies have shown the extract of this plant's bark antagonizing the neuromuscular blockade caused by snake venom in isolated mice diaphragm and phrenic nerve models. In the present study, the triterpenoids lupeol, lupenone, 28-OH-lupenone and betulin, which are constituents of the plant, were observed by using *in vitro* pharmacological tests. These tests showed the efficacy of all tested triterpenoids (1 mg/5mL) against the irreversible neuromuscular blockade caused by snake venom from *Bothrops jararacussu* (Bjssu, 40 µg/mL, n=19), as following: betulin (68 ± 7%, n=11) ~ lupeol (70 ± 8%, n=5) > lupenone (45 ± 9%, n=7) ~ 28-OH-lupenone (54 ± 5%, n=4). Betulin (39.5 ± 9%, n=9) and lupenone (49.5 ± 8%, n=4) significantly protected against *Crotalus durissus terrificus* (CDT, 10 µg/mL, n=10) envenomation of neuromuscular junction. The mixture of betulin or lupeol + Bjssu venom and betulin or lupenone + CDT venom showed significant phytochemical protection in morphological analysis. Considering both pharmacological and morphological results, betulin showed the best protective effect against neuromuscular blockade and myotoxicity caused by both snake venoms. In addition, it has a potent short-term excitatory action in the neuromuscular junction. We concluded that the studied triterpenoids, especially betulin, showed antiophidian properties.

Keywords: *Bothrops jararacussu*; *Crotalus durissus terrificus*; *Dipteryx alata* Vogel; Lupane triterpenoids; Neuromuscular junction.