



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

NATACHA TERESA QUEIROZ ALVES

**EFEITO DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Bredemeyera floribunda* Willd SOBRE A
AÇÃO LOCAL DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* EM CAMUNDONGOS.**

FORTALEZA
2013

NATACHA TERESA QUEIROZ ALVES

**EFEITO DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Bredemeyera floribunda* Willd SOBRE A
AÇÃO LOCAL DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

**FORTALEZA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A474e Alves, Natacha Teresa Queiroz.
Efeito do extrato das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd sobre a ação local do veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos / Natacha Teresa Queiroz Alves. – 2013.
95 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.
1. Mordeduras de serpentes. 2. Bothrops. 3. Plantas medicinais. I. Título.

CDD 615.908

NATACHA TERESA QUEIROZ ALVES

**EFEITO DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Bredemeyera floribunda* Willd SOBRE A
AÇÃO LOCAL DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo
Instituto de Química - CCET-UFRN

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Professora Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro por ter me aceitado como aluna e me acompanhado desde a Iniciação Científica e pelos ensinamentos sempre valiosos. Obrigada!

Aos Professores Dr^a Renata de Sousa Alves, Dr^o Alexandre Havt Bindá e Dr^a Alice Maria Costa Martins. Obrigada pelas dicas e o apoio.

Às professoras Dr^a Renata Araújo, Dr^a Gisela Camarão e Dr^a Alcínia Lima por terem aceitado participar desse trabalho. Obrigada!

Ao Professor Dr^o Rafael Matos Ximenes pela amizade, ajuda e ideia do trabalho. Agradeço muito!

A meu grande amigo Francisco Advane pelas ajudas nos experimentos, pelas ideias sempre proveitosas, por me mostrar a solução nos momentos em que eu não conseguir enxergar, pelo companheirismo, enfim, obrigada, grande parte desse trabalho devo a você!

À Narjara Figueiredo pela amizade desde os tempos de faculdade e por ter me apoiado e incentivado nos momentos mais difíceis. Obrigada, minha amiga!

À Pedro Henrique Sá, Venúcia Magalhães, João Victor Almeida, Caio Abner e Daniel Maia pela amizade e o apoio sempre.

À minha família, base de tudo, sem a qual eu não teria obtido todos os êxitos em minha vida profissional. Muito obrigada a meu pai, Luiz Carlos Queiroz, e minha mãe, Valdísia Alves Queiroz, que embora longe fisicamente, estão sempre presentes. E para meus irmãos, Andrezza Alves Queiroz e Victor Alves Queiroz pelo apoio. Agradeço imensamente!

Aos meus tios Maria Vilma, Welliton Scofield e Vírginia Alves, os quais sempre me mostraram a importância do trabalho e da honestidade.

À Professora Dr^a Janaína Evangelista e ao Professor Dalgimar Beserra de Menezes pela disponibilidade e ajuda na parte histológica.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LAFAVET) Aline Marinho, Roberta Jeanne, Laura Lícia, Rafael Jorge, João Alison Silveira, Rosa Marques, Socorro Nogueira, Antônio Gomes da Silva Neto, e a maravilhosa equipe de estudantes de Iniciação Científica: Mariana Bona, Paula Letícia Braga e Silva, Yuri Pereira Coelho, Katharine Gurgel e Marco Clementino. Obrigada pela ajuda nos experimentos!

Aos amigos do Laboratório de Cultivo Celular (LCC) Kamila Soares, Izabel Cristina, Tiago Sampaio, Alba Fabíola, Clarissa Perdigão, Ticiano Praciano, e principalmente, a Ramon Menezes e Dânya Lima pelo apoio, disponibilidade e amizade.

Aos meus amigos de vida Hívila Moreira, Patrícia Lavor, Jessica Dayana, Mario Chavez, Laura Vidal, Auriana Vasconcelos, Renata Sampaio, Vanessa Aguiar, Taiana Sobral, Thaís Helena, Airton Filho, Rebeca Horn, Nayara Diniz, Amanda Aragão e Ana Georgina.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”

Goethe

RESUMO

Acidentes ofídicos representam considerável problema de saúde pública. No Brasil, a maior parte desses acidentes é causada por serpentes do gênero *Bothrops*, que podem levar ao desenvolvimento de dano tecidual local, incluindo edema e hemorragia. A soroterapia tradicional atua na neutralização de efeitos sistêmicos, mas tem eficácia limitada contra efeitos locais. Compostos isolados de plantas usadas popularmente para tratar envenenamentos ofídicos mostram-se uma boa alternativa a fim de se complementar o tratamento. Avaliou-se a atividade antiofídica do extrato aquoso de *Bredemeyera floribunda* (Ebf) através de testes de inibição de atividades fosfolipásica, proteolítica, edematogênica, hemorrágica, necrosante e miotóxica promovidas pelo veneno total de *Bothrops jararacussu* (vBju) em camundongos. Também foi realizado o teste de toxicidade aguda do Ebf e de viabilidade celular em células RAW 264.7. O Ebf mostrou-se átoxico em camundongos, apresentando DL50 maior do que a dose teste (2000 mg/kg). O Ebf aumentou a viabilidade celular em células RAW 264.7. As atividades fosfolipásica e proteolítica induzidas pelo vBju foram inibidas *in vitro* pelo Ebf nas razões de 1:1, 1:2 e 1:3 (vBju/Ebf) (massa/massa). O Ebf também inibiu significativamente edema induzido por vBju, havendo redução do pico edematogênico máximo do veneno e da carragenina, nos grupo pré-tratado i.p e pré-incubado. O Ebf diminuiu consideravelmente as ações hemorrágica, necrosante e miotóxica do vBju. Constituintes do Ebf, podem estar se ligando a componentes do vBju como as fosfolipases A2 e seus homólogos e também as metaloproteases, bloqueando parcialmente a ação dessas enzimas e diminuindo as atividades fosfolipásica e edematogênica, como também, as ações hemorrágica e proteolítica do veneno. Verifica-se, então, atividade antiofídica do extrato, fazendo-se necessário o estudo com componentes isolados do Ebf e do vBju a fim de se conseguir melhor comprovação dos efeitos e possíveis mecanismos.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*, *Bredemeyera floribunda*, efeitos locais.

ABSTRACT

Snakebites are an important public health burden. In Brazil, most of these accidents are caused by snakes of the *Bothrops* genus that can lead to development of local tissue damage, including edema and hemorrhaging. Traditional antivenom therapy acts in the neutralization of systemic effects, but it has limited effectiveness of neutralizing the local effects. The antivenom activity was evaluated of aqueous extract of *Bredemeyera floribunda* (Bfe) through inhibition of phospholipase, proteolytic, edematogenic, hemorrhagic, necrotizing and myotoxic actions promoted by the total *Bothrops jararacussu* venom (Bjuv) in mice. The acute toxicity and the viability cell of the Bfe in RAW 264.7 cells were determined too. The Bfe showed to be nontoxic in mice and it showing LD50 greater than the test dose (2000 mg / kg). The Bfe increased cell viability in RAW 264.7 cells. The phospholipase and proteolytic activities induced vBju were inhibited in vitro by EBF in 1:1, 1:2 and 1:3 ratios. 1:2 (Bjuv /Bfe; w/w). The Bfe also inhibited significantly edema induced by Bjuv, with a reduction of the peak oedematogenic in the venom and carrageenan groups, mainly in the group pretreated i.p. The Bfe decreased considerably hemorrhagic, necrotizing and myotoxic actions by Bjuv. Compounds isolated from plants popularly used to treat snake poisoning show good alternative to complement the antivenom treatment. Constituents of the Bfe may act by binding to Bjuv components as phospholipase A₂ and their homologues and metalloproteases too, partly blocking the action of these proteins, reducing edema and phospholipasic activities, but also hemorrhaging and proteolytic activities. So there is real antiophidic activity of the extract, making necessary to study it with isolated components of the Bfe and Bjuv to achieve better evidences of the effects and possible mechanisms.

Keywords: *Bothrops jararacussu*, *Bredemeyera floribunda*, local effects.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia	16
1.2 Aspectos clínicos do envenenamento botrópico	17
1.3 <i>Bothrops jararacuçu</i>	19
1.4 Tratamento do envenenamento botrópico/peculiaridades de <i>B. jararacussu</i>	22
1.5 Alternativas a soro terapia – emprego de plantas medicinais.	23
1.6 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	29
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Animais de Experimentação	39
4.2 Veneno, substâncias, drogas e reagentes	39
4.3 Protocolos Experimentais	40
4.3.1 Teste de dose limite 2000 mg/kg	40
4.3.2 Ensaio <i>in vitro</i>	40
4.3.2.1 Caracterização fitoquímica do extrato	40
4.3.2.2 Atividade fosfolipásica	40
4.3.2.3 Atividade Proteolítica	41
4.3.2.4 Cultura de células RAW 264.7	41
a) Cultivo, manutenção e tratamento das células RAW 264.7	41
b) Determinação do efeito citotóxico do veneno de <i>B. jararacussu</i> e do extrato de <i>B. floribunda</i> sobre macrófagos murinos	44
c) Estudo do efeito do pré e pós-tratamento com extrato de <i>B. floribunda</i> sobre a citotoxicidade do veneno de <i>B. jararacussu</i> em macrófagos murinos	45
4.3.3 Ensaio <i>in vivo</i>	45
4.3.3.1 Grupos experimentais	45
4.3.3.2 Edema de pata induzido pelo veneno total de <i>B. jararacussu</i>	46
4.3.3.3 Edema de pata induzido por carragenina	46
a) Grupos experimentais	46

b) Procedimento experimental	47
4.3.3.4 Atividade Hemorrágica	47
4.3.3.5 Atividade Necrosante	47
4.3.3.6 Atividade Miotóxica	48
4.4 Análise Histopatológica	48
4.5 Análise Estatística	49
4.6 Aspectos Éticos	49
5 Resultados	51
5.1 Caracterização fitoquímica do extrato	51
5.2 Teste de toxicidade aguda	51
5.3 Atividade anti-fosfolipásica sobre veneno total	51
5.4 Atividade anti-proteolítica sobre veneno total	52
5.5 Cultura de células RAW 264.7	53
5.5.1 Efeito de venenoda serpentes <i>B. jararacussu</i> e do extrato de <i>B. floribunda</i> sobre a viabilidade de macrófagos murinos	53
5.5.2 Estudo do efeito do pré e pós-tratamento com o extrato de <i>B. floribunda</i> sobre a citotoxicidade do veneno de <i>B. jararcussu</i> em macrófagos murinos	55
5.6 Avaliação da atividade anti-edematogênica sobre veneno total	57
5.6.1 Atividade edematogênica do vBju e bloqueio pelo EBf.	57
5.6.2 Edema de pata induzido por carragenina (Cg)	60
5.7 Avaliação da atividade anti-hemorrágica sobre veneno total	64
5.8 Avaliação da atividade anti-necrosante sobre veneno total	69
5.9 Avaliação da Atividade Miotóxica do vBju e bloqueio pelo EBf.	73
6 Discussão	76
7 Conclusão	84
Referencias	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia de <i>Bothrops jararacussu</i> .	20
Figura 2	Distribuição geográfica de <i>Bothrops jararacussu</i> .	21
Figura 3	Arbusto com frutos verdes de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	30
Figura 4	Arbusto com flores de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	30
Figura 5	Estrutura do Ácido bredemólico	32
Figura 6	Exsicata de <i>B. floribunda</i> Willd.	33
Figura 7	Preparo do extrato de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	39
Figura 8	Cultivo e tratamento das células RAW 264.7 com veneno total da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> em placas de 96 poços.	43
Figura 9	Ensaio de redução do MTT.	44
Figura 10	Absorbância pelo tempo mostrando a atividade anti-fosfolipásica do extrato de <i>B. floribunda</i> .	52
Figura 11	Absorbância pelo tempo mostrando a atividade anti-proteolítica do extrato de <i>B. floribunda</i> .	53
Figura 12	Efeito do Ebf sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação com o EBf.	54
Figura 13	Efeito do vBju sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação com o veneno.	55
Figura 14	Efeito do pré-tratamento com o EBf sobre a citotoxicidade do vBju em células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação.	56
Figura 15	Efeito do pós-tratamento com EBf sobre a citotoxicidade do vBju em células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação.	56
Figura 16	Gráfico Edema de pata induzido pelo vBju e bloqueio pelo EBf.	57
Figura 17	Gráfico Edema de pata induzido pelo vBju e bloqueio pelo EBf.	58

Figura 18	Gráfico da indução de edema por carragenina e bloqueio pelo extrato de <i>B. floribunda</i> . Os dados estatísticos estão mostrados na tabela 5.	60
Figura 19	Gráfico da indução de edema por carragenina e bloqueio pelo extrato de <i>B. floribunda</i> .	61
Figura 20	Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.	63
Figura 21	Atividade hemorrágica do vBju e inibição pelo Ebf.	64
Figura 22	Fotografias dos halos hemorrágicos da pele do dorso de camundongos.	65
Figura 23	Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.	67
Figura 24	Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.	68
Figura 25	Inibição da atividade necrótica do veneno de <i>B. jararacussu</i> pelo extrato de <i>B. floribunda</i> .	69
Figura 26	Fotografias dos halos necróticos da pele do dorso de camundongos.	70
Figura 27	Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.	71
Figura 28	Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.	72
Figura 29	Gráfico da atividade de creatina quinase (CK) em mg/dL e mostra a atividade antimiotóxica do Ebf.	73
Figura 30	Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais compostos testados por Mors <i>et al.</i> (2000) e a porcentagem de inibição da letalidade encontrada do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> .	25
Tabela 2	Plantas e componentes identificados por Pereira <i>et al.</i> (1994).	29
Tabela 3	Grupos de metabólitos secundários presentes no extrato	51
Tabela 4	Atividade anti-edematogênica do Extrato de <i>B. floribunda</i> sobre o veneno.	59
Tabela 5	Atividade anti-edematogênica do Extrato de <i>B. floribunda</i> sobre a carragenina	61

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

Acidentes com serpentes peçonhentas podem ser considerados preocupantes para a saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais tais como, África, Ásia, Oceania e América Latina, onde ocorrem com maior frequência, causando considerável morbi-mortalidade (PINHO *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2009).

Dados recentes mencionam que existem aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais cerca de 20% são consideradas venenosas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que aconteçam 2.500.000 casos de envenenamentos por serpentes peçonhentas ao ano, o que resulta em, aproximadamente, 125.000 mortes e inúmeros casos resultam em sequelas graves (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

No Brasil, ocorre o maior número de casos de acidentes ofídicos da América do Sul, com, aproximadamente, 20.000 casos notificados por ano, e uma taxa de letalidade de 0,45% (LEITE *et al.*, 2013). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde (MS), ocorreram nos anos de 2000 a 2012, mais de 334.000 casos de acidentes envolvendo serpentes peçonhentas, com uma média de 15,0 casos a cada 100.000 habitantes, resultando em 1.379 óbitos (BRASIL, 2013). Em torno de 90% desses acidentes são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, tais como: jararaca, jararacussu, urutu, caiçaca e comboia (SANTORO *et al.*, 2008).

Serpentes do grupo *Bothrops*, atualmente, encontram-se divididas em cinco gêneros: *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Botrocophias* e *Rhinocerothis*. Além desses, os gêneros de serpentes de interesse para a saúde pública no Brasil são *Crotalus* (cascavel); *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca) e *Micrurus* (coral-verdadeira), embora acidentes com essas espécies sejam raros (BRASIL, 2013).

No território brasileiro, o gênero *Bothrops* (família Viperidae, subfamília Crotalinae) possui 20 espécies já classificadas. São consideradas solenóglifas, pois os dentes inoculadores de veneno situam-se na parte anterior do maxilar. Dentro desse gênero, as serpentes da espécie *B. jararacussu* podem alcançar maior comprimento (até 1,8 m) e produzem maior quantidade de veneno, predominando nas regiões Sul e Sudeste do país (ZENI *et al.*, 2007; BRASIL, 2013).

A espécie *Bothrops jararacussu* é responsável por poucos casos de envenenamento, entretanto, essas ocorrências são de considerável relevância para a saúde pública no Brasil, uma vez que durante a picada é injetada grande quantidade de veneno, o que pode ser letal e levar ao desenvolvimento de alterações locais e sistêmicas graves (HAVT *et al.*, 2001).

Serpentes da mesma espécie, mas de áreas geográficas distintas, podem apresentar venenos com diferente composição e toxicidade. Desse modo, venenos botrópicos apresentam vários efeitos fisiológicos e bioquímicos, cada espécie com suas peculiaridades. Muitas das enzimas que compõem os venenos têm atividade proteolítica, podendo atuar em uma variedade de componentes de coagulação e fibrinolíticos, como também sobre as células, causando um desequilíbrio homeostático (SALAZAR *et al.*, 2007).

1.2 Aspectos clínicos do envenenamento botrópico

As vítimas de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, geralmente manifestam tanto efeitos no local da picada, tais como edema, equimoses, bolhas, necrose, hemorragia local e inflamação, quanto sinais de envenenamento sistêmico como sangramento espontâneo (sangramento gengival, hematúria e epistaxe), incoagulabilidade sanguínea, hipotensão arterial, alterações hemodinâmicas, dano agudo do miocárdio, edema pulmonar e insuficiência renal aguda. A necrose local é uma das conseqüências mais graves relacionadas a envenenamentos botrópicos, uma vez que pode resultar em amputação de membros (WARREL, 2005; SANTORO *et al.*, 2008).

Venenos de serpentes apresentam inúmeros e complexos componentes que desempenham uma série de ações, sendo a maior parte desses componentes proteínas biologicamente ativas (SERRANO *et al.*, 2005). Apresentam proteínas e peptídeos tóxicos e não tóxicos como também, toxinas não proteicas, carboidratos, lipídeos, amins e outras moléculas menores. Venenos de *Bothrops spp.* têm em sua composição compostos responsáveis por sua atividade biológica como as enzimas fosfolipases A₂, metaloproteases, L- aminoácido oxidases, serinoproteases, e compostos sem atividade enzimática, ou seja, fatores de crescimento de nervos, lectina tipo C, peptídeos natriuréticos, proteínas ricas em cisteína e miotoxinas (BURIN *et al.*, 2013; DOMINGOS *et al.*, 2013).

As proteases presentes em venenos botrópicos são divididas em dois grupos: serinoproteases e metaloproteases. Ambas essas enzimas estão relacionadas ao aparecimento de edema inflamatório local, apresentam ação coagulante, atuando através de ações como

trombina-símile, ativando protrombina e o fator X, o que resulta no consumo dos fatores de coagulação com conseqüente alteração da coagulação sanguínea; e atuam com atividade hemorrágica no endotélio vascular tanto local quanto sistêmico (SANT'ANA *et al.*, 2008).

As serinoproteases contêm um resíduo de serina reativo em seu sítio ativo, estabilizado pela presença de histidina e ácido aspártico. Agem em vários componentes da cascata de coagulação e nos sistemas fibrinolítico e calicreína-cininas. Estas enzimas, tais como as metaloproteases são enzimas dependentes de zinco para serem ativadas (CAMPOS *et al.*, 2013).

Venenos de serpentes da família Viperidae contêm fosfolipases A_2 (PLA₂) do grupo II, que tem características estruturais semelhante às PLA₂s presentes em exsudatos inflamatórios de mamíferos (ZULIANI *et al.*, 2005). Essas proteínas podem ser subdivididas em dois tipos: PLA₂s Asp49, que têm um resíduo de aspartato na posição 49 do seu sítio ativo e são cataliticamente ativas; e homólogos de PLA₂s ou miotoxinas denominadas Lys49 que, por sua vez, apresentam um resíduo de lisina na posição 49 e não têm atividade catalítica (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

Juntamente com a ação digestiva, uma variedade de atividades farmacológicas tem sido relacionada às fosfolipases A_2 e seus homólogos, como atividades neurotóxica, miotóxica, edematogênica, hipotensora, de agregação plaquetária, cardiotoxica e anticoagulante (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

Venenos das famílias Viperidae e Crotalinae desencadeiam uma resposta inflamatória com a formação de edema, infiltração de células inflamatórias e ativação de mastócitos. Essas células mastocitárias estão localizadas em áreas de mucosa e perivascular dos tecidos, desempenhando papel importante dentro do sistema imunológico dos indivíduos. Os mastócitos podem ser ativados por componentes do veneno de serpentes e libertar a carboxipeptidase A e possivelmente outras proteases que podem degradar componentes do veneno. Estudos mostraram que várias PLA₂s foram capazes de ativar os mastócitos de ratos e de induzir vazamento microvascular e acúmulo de células inflamatórias nos locais de inflamação (WEI *et al.*, 2013).

As PLA₂s são enzimas responsáveis pela ativação de mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios como as prostaglandinas, os leucotrienos, fator de agregação plaquetária e lisofosfolípídeos. Essas enzimas catalisam a hidrólise da ligação *sn*-2 de ésteres de fosfoglicerídeos, produzindo lisofosfolípídeos e ácidos graxos insaturados em uma reação dependente de cálcio. O ácido araquidônico, um dos ácidos graxos resultantes da hidrólise, pode conduzir a biossíntese de eicosanoides e hidrólise de fosfolípídeos de células

inflamatórias ativadas. O aumento de eicosanoides é encontrado em respostas inflamatórias (VINUCHAKKARAVARTHY *et al.*, 2011).

Estudos que buscam investigar o efeito inflamatório de venenos botrópicos empregam o uso da carragenina a fim de comparar a ação do veneno a essa substância de mecanismo inflamatório conhecido, sendo a mesma um agente flogístico de natureza química composta por um complexo de polissacarídeos sem atividade enzimática, usada para induzir inflamação aguda por liberação de prostaglandinas, produzindo edema (DUTRA *et al.*, 2006; YAMASHITA *et al.*, 2011).

Outro grupo de enzimas presente em venenos botrópicos são as L-aminoácido oxidases (LAAOs), as quais agem catalisando a desaminação oxidativa de aminoácidos específicos para produzir alfa-cetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia. Uma LAAO apresenta-se como uma glicoproteína ácida homodimérica com uma flavina como cofator. Pesquisas apontam para o possível envolvimento dessa enzima na apoptose de várias linhagens de células (células endoteliais vasculares), que poderiam contribuir para sangramento prolongado após uma picada de serpente. Além disso, podem inibir a agregação plaquetária, tendo um efeito anticoagulante (CAMPOS *et al.*, 2013).

1.3 *Bothrops jararacussu*

A espécie *Bothrops jararacussu* (figura 1) é conhecida popularmente como urutu dourado e surucucu tapete e pode atingir até 22 centímetros de diâmetro e mais de 2,20 metros de comprimento. É encontrada em florestas tropicais, pântanos e margens de rios do Brasil, em várias ilhas na região Sul do Rio Grande do Sul, Nordeste da Argentina e Sul da Bolívia e do Paraguai (figura 2). A produção de veneno dessa espécie é a maior do gênero, podendo atingir 1 g de peso seco (MILANI *et al.*, 1997).

Figura 1 – Fotografia de *Bothrops jararacussu*.



Fonte: <http://www.panoramio.com/photo/9179345>.

As enzimas do tipo Fosfolipases A₂ são pequenas proteínas de aproximadamente 15 kDa, estáveis e dependentes de cálcio, sendo classificadas em grupos I e II, de acordo com sua estrutura primária e o padrão de pontes dissulfeto. Duas PLA₂s básicas foram isoladas e caracterizadas do veneno de *B. jararacussu*, denominadas bothropstoxina-I (BthTX-I, Lys-49), cataliticamente inativa e II (BthTX-II, Asp-49), com baixa atividade catalítica (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002, TAKEDA *et al.*, 2004).

Figura 2 - Distribuição geográfica de *Bothrops jararacussu*.



Fonte: http://www.cobrasbrasileiras.com.br/bothrops_jararacussu.html

O veneno de *B. jararacussu* apresenta efeito coagulopático devido à ação pró-coagulante no fibrinogênio e fator X e tem atividade miotóxica maior do que as outras espécies do gênero, causando necrose nas fibras musculares estriadas e lançando creatinaquinase na circulação (MILANI *et al.*, 1997).

A mionecrose pode ser causada pela ação direta de miotoxinas ou PLA₂ miotóxicas na membrana plasmática de células musculares, induzindo desorganização dos fosfolipídeos de membrana, influxo de íons cálcio e de moléculas intracelulares como creatinaquinase, resultando em contração dos sarcômeros e intoxicação mitocondrial, o que pode causar a morte celular. Esse mecanismo ainda não está bem elucidado, no entanto, estudos mostraram que a toxina BthTX-II afeta fibras musculares esqueléticas, principalmente por alteração da membrana plasmática das células (VERONESE *et al.*, 2005).

Uma proteína similar a trombocitina, serinoprotease presente no veneno de *Bothrops atrox*, foi encontrada no veneno de *B. jararacussu*, agindo na ativação do fator VIII, induzindo a agregação plaquetária e demonstrando pequena atividade de trombina-like. Jararacina, uma desintegrina de 73 aminoácidos, isolada de veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, demonstrou atividade antiagregante *in vitro*, pois inibiu agregação de plaquetas humanas e a ligação de fibrinogênio e do fator de Von Willebrand à complexa glicoproteína de membrana plaquetária IIb/IIIa (MILANI *et al.*, 1997).

As metaloproteases de venenos de serpentes (SVMP) são as principais responsáveis por efeitos hemorrágicos. Essas enzimas zinco-dependentes agem clivando seletivamente pontes de peptídeos chave dos componentes da membrana basal, afetando as interações com as células endoteliais. São secretadas como pró-enzimas e contém módulos reguladores responsáveis por interações com a matriz extracelular e integrinas. Essas toxinas são capazes de hidrolisar proteínas da membrana basal incluindo fibronectina, laminina, e colágeno do tipo IV e também degradam fibrinogênio e fibrina. Uma metaloprotease denominada BjuSSuMP-I foi isolada do veneno de *B. jararacussu* e revelou atividade hemorrágica e significativa atividade edematogênica (MAZZI *et al.*, 2004).

1.4 Tratamento do envenenamento botrópico/peculiaridades de *B. jararacussu*.

O tratamento mais eficaz conhecido até hoje para envenenamento sistêmico é a administração intravenosa de antivenenos de serpentes que são preparados por hiperimunização de animais, principalmente, cavalos e ovelhas, visando à neutralização de toxinas (SOARES *et al.*, 2005; ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009). A ocorrência de reações adversas relatada na literatura varia amplamente de 3 a 84% dos casos (CARON *et al.*, 2009; CRUZ *et al.*, 2009).

A soroterapia, mesmo administrada em tempo hábil, é eficaz na neutralização de efeitos sistêmicos, mas tem limitações quanto à neutralização de danos teciduais locais (MELO *et al.*, 2007). Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de encontrar tratamentos alternativos para casos de pacientes que sofreram acidentes ofídicos, tais como, o uso de plantas medicinais, de terapia com irradiação a laser e, ainda, de terapias baseadas no emprego de anticorpos recombinantes humanos, visando o tratamento de danos locais e promovendo efeitos antiinflamatórios, alívio da dor e aumento da regeneração do tecido danificado (BARBOSA *et al.*, 2008).

No tratamento de envenenamento por *B. jararacussu*, o antiveneno botrópico geralmente é usado em grandes doses, no entanto, não se verifica muita efetividade. Vital Brazil relatou que antivenenos crotálicos são mais efetivos do que antivenenos botrópicos para o tratamento do envenenamento por *B. jararacussu*. Todavia, o pesquisador considerou mais eficiente o uso do conjunto de antivenenos botrópicos e crotálicos para envenenamentos causados por serpentes da referida espécie, sendo que a atividade letal do veneno de *B. jararacussu* ainda não seria neutralizada de modo eficaz (MILANI *et al.*, 1997; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001).

No Brasil, são produzidos os seguintes soros antibotrópicos: antibotrópico pentavalente, produzido a partir dos venenos de *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwedii* (12,5% cada); antibotrópico-crotálico, acrescentando-se soro anticrotálico (*Crotalus durissus terrificus*) ao soro antibotrópico pentavalente; antibotrópico-laquético (*Lachesis muta*) e antibotrópico-laquético-crotálico (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Estudo realizado por Dos Santos *et al.* (1992), demonstrou que o antiveneno botrópico-crotálico é mais eficaz para envenenamentos por *B. jararacussu*, pois apresenta maiores títulos de anticorpos contra esse veneno em comparação aos antivenenos botrópicos e crotálicos separadamente, tendo com isso uma maior neutralização dos efeitos letal, pró-coagulante e miotóxico. Dessa forma, os autores sugerem que o antiveneno botrópico-crotálico neutraliza ambos os componentes responsáveis pela indução de lesão muscular: o hemorrágico, no qual os dois antivenenos são eficazes, e o miotóxico, em que pode ocorrer reconhecimento imunológico por meio de anticorpos anti-PLA₂ presentes no soro e provenientes do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

1.5 Alternativas a soroterapia - emprego de plantas medicinais.

Até metade do século XX, antes do crescimento da síntese química, as plantas medicinais representavam a base da terapia medicamentosa. Ainda hoje, medicamentos obtidos a base de plantas são amplamente utilizados na terapêutica. Podemos citar como um exemplo clássico a *Papaver somniferum L.* (Papaveraceae), popularmente conhecida como papoula, usada para extração do ópio, tendo como principal componente a morfina, princípio ativo há muito tempo empregado para combater a dor (FOGLIO *et al.*, 2006).

Estudos de Schenkel *et al.* (2001) citam o desenvolvimento da pílula contraceptiva feminina por Russel E. Marker, responsável pela síntese de hormônios

esteróides a partir de saponinas provenientes de uma planta do altiplano mexicano, conhecida como cabeça de negro (*Dioscorea macrostachya Benth.*) que contém diosgenina, substância atualmente usada para síntese de hormônios e anticoncepcionais.

O emprego de plantas medicinais para o tratamento em casos de acidentes ofídicos se dá há vários séculos. Curandeiros em todo o mundo utilizam extratos aquosos ou etanólicos de plantas medicinais, empregadas com a finalidade de aliviar o edema e a hemorragia (OTERO *et al.*, 2000). A aplicação tópica da planta na área da picada, mastigar as folhas ou cascas, ou ainda beber extratos ou decocções são alguns procedimentos realizados com o intuito de neutralizar a atividade do veneno (MEBS, 2000).

A população rural está mais exposta a acidentes ofídicos e, muitas vezes, não tem acesso rápido ao tratamento convencional realizado com soro antiofídico (OTERO *et al.*, 2000). O uso do antiveneno pode ser efetivo para neutralização dos danos sistêmicos ocasionados pelo veneno, mas, geralmente, não é eficaz para evitar o agravamento de danos locais (CARDOSO *et al.*, 2003).

O uso de plantas medicinais nestes casos pode ser bastante útil como tratamento de primeiros socorros em locais nos quais os pacientes não têm acesso imediato à soroterapia convencional (PITHAYANUKUL *et al.*, 2005).

Diversas plantas são utilizadas na medicina popular em casos de acidentes ofídicos. No entanto, apenas algumas poucas espécies têm sido investigadas cientificamente. A neutralização da ação dos venenos é mencionada, mas raros estudos atribuem este efeito a um componente químico identificado ou relatam o mecanismo de ação, podendo estar relacionado a metabólitos secundários (MORS *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2005).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de envenenamento é realizado em todo o mundo, na Colômbia, Otero *et al.* (2000) em experimentos com plantas usadas popularmente na região para tratamento de acidentes ofídicos, demonstraram que doze das setenta e quatro plantas popularmente usadas foram eficazes contra o veneno de *Bothrops atrox*, sete delas mostrando total capacidade de neutralização do veneno, as quais foram: as cascas do caule de *Brownea rosademonte* (Caesalpiniaceae) e *Tabebuia rosea* (Bignoniaceae), rizomas de *Alpinia renealmia* (Zingiberaceae) e *Heliconia curtispatha* (Heliconiaceae); a planta inteira de *Pleopeltis percussa* (Polypodiaceae) e *Trichomanes elegans* (Hymenophyllaceae), e os frutos maduros de *Citrus limon* (Rutaceae).

Na região Norte do Brasil, usa-se popularmente o “Específico Pessoa” contra envenenamentos de serpentes, produto natural do qual a planta Cabeça-de-negro é o principal

ingrediente, e no qual foram encontrados dois pterocarpanos denominados Cabenegrina A-I e Cabenegrina A-II (DA SILVA *et al.*, 2004, XIMENES, 2012).

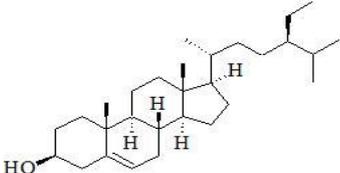
Posteriormente, os pterocarpanos foram encontrados no extrato etanólico das raízes de *Harpalyce brasiliiana*, conhecida popularmente como raiz-de-cobra, sendo encontrada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Essa planta pode ser apontada como um dos constituintes do “Específico Pessoa”, por apresentar as substâncias isoladas, Cabenegrina A-I e Cabenegrina A-II, como constituintes. Edunol, um pterocarpano isolado dessa planta, inibiu atividades miotóxica, proteolítica e fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararacussu* (DA SILVA, 2004, XIMENES, 2009).

Pterocarpanos são substâncias encontradas em produtos naturais e são compostos por anel benzofuranilo-benzopirano cis-condensado, e muitos deles apresentam diversos efeitos biológicos. Em 1982, estudos com substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliiana*, pterocarpanos prenilados denominados Cabenegrina A-I e Cabenegrina A-2, demonstraram ter ação contra a atividade de veneno de *Bothrops atrox* em cachorro (NAKAGAWA, 1982; GULACSI, 2001).

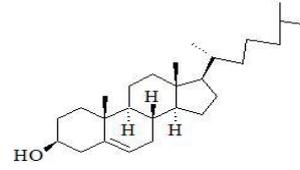
O extrato de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) também mostrou efeito contra edema, hemorragia e necrose local, causados pelo veneno de *Bothrops alternatus* quando aplicado topicamente em coelhos (MELO *et al.*, 2007). Mors *et al.* (2000) realizou estudo para testar o efeito de metabólitos secundários sintéticos ou provenientes de plantas contra a ação letal do veneno de *B. jararaca* em ratos.

Os metabólitos secundários estão listados no quadro 1. As substâncias foram administradas oralmente, antes do envenenamento, simulando o uso profilático popular.

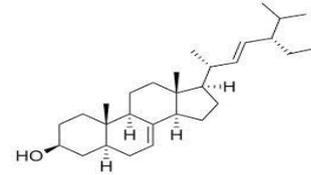
Tabela 1 - Principais compostos testados por Mors *et al.* (2000) e a porcentagem de inibição da letalidade encontrada do veneno de *Bothrops jararaca*.

Classe	Subclasse	Constituinte	Estrutura	% de inibição
Esteróides	Fitoesteróides	β -sitosterol		70

Colesterol



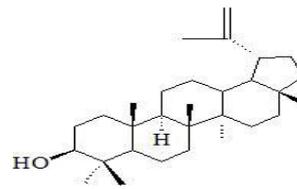
60

 α -spinasterol

-

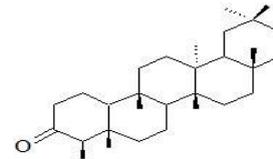
TriterpenóidesTriterpenos
Pentacíclicos

Lupeol



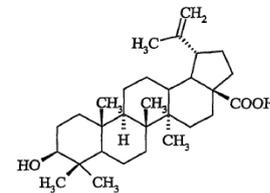
70

Friedelina



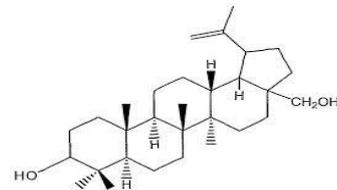
40

Ácido Betulínico



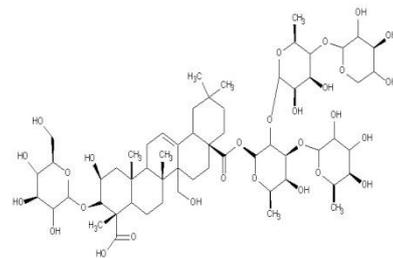
40

Betulinol

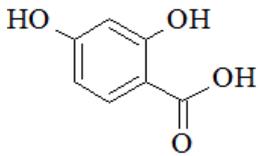
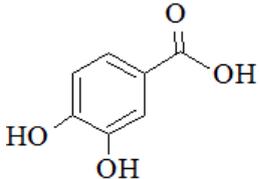
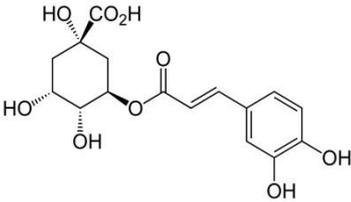
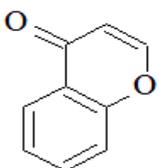
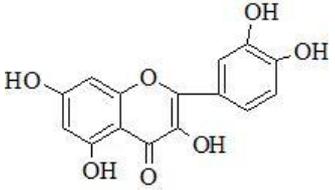
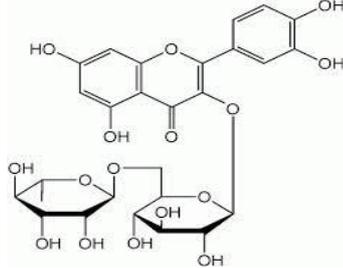


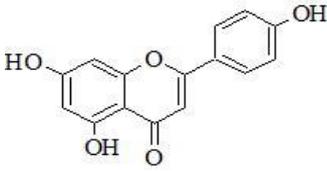
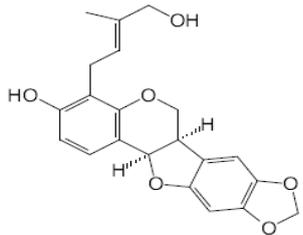
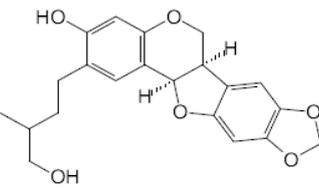
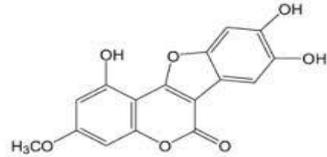
40

Bredemeyrosideo D



80

Compostos Fenólicos	Derivados do Ácido Hidroxibenzoico	Ácido 2,4-dihidroxibenzoico		83
		Ácido 3,4-dihidroxibenzoico		80
	Derivados do Ácido Cinâmico	Ácido Clorogênico		60
		Cynarina	-	20
	Cumarinas	Cumarina		40
		Bergaptena	-	20
	Flavonóides	Quercetina		20-40
		Rutina		20-80

	Apigenina		40
	Derricidina	-	70
Pterocarpanos	Cabenegrina A-I ¹		100
	Cabenegrina A-II ¹		100
Cumestanos	Wedelolactona		40

¹ Fonte: Adaptado de XIMENES (2009).

Várias plantas e seus componentes foram identificados por Pereira *et al.* (1994) por apresentarem efeito sobre o veneno de *Bothrops jararaca* e estão listadas no quadro 2, a seguir.

Tabela 2- Plantas e componentes identificados por Pereira *et al.* (1994).

Plantas	Componentes
- <i>Periandra mediterranea</i> (Vell.) Taub (Fabaceae)	Triterpenos e esteróides
- <i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogt) Macbr (Caesalpiniaceae)	
- <i>Vernonia condensata</i> Baker (Compositae)	Derivados do ácido caféico
- <i>Cynara scolymus</i> L. (Asteraceae)	
- <i>Mikania glomerata</i> Spreng (Asteraceae)	Cumarinas
- <i>Dorstenia brasiliensis</i> Lam. (Moraceae)	
- <i>Phyllanthus klotzschianus</i> M. Arg (Euphorbiaceae)	
- <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck (Rutaceae),	Flavonóides
- <i>Apuleia leiocarpa</i>	
- <i>Derris sericea</i> (H.B.K.) Ducke (Fabaceae)	
- <i>Silybum marianum</i> Gaertn. (Compositae)	lignoflavonoides
- <i>Eclipta prostrata</i> ,	coumestanos
- <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd (Polygalaceae)	saponinas

1.6 *Bredemeyera floribunda* Willd.

Bredemeyera floribunda Willd. (figura 3) é uma trepadeira lenhosa e pertence à família Polygalaceae. Possui folhas simples e glabras de 7-10 centímetros de comprimento. Suas flores são reunidas em vistosas inflorescências. As flores são alvacentas com as asas amarelas ou vermelhas e perfumadas. As raízes têm casca espessa quase esponjosa, amarga e espumígena

quando agitadas com água (MATOS, 2007).

Figura 3 – Arbusto com frutos verdes de *Bredemeyera floribunda* Willd.



Fonte: Herbário Prisco Bezerra – Universidade Federal do Ceará.

Figura 4 – Arbusto com flores de *Bredemeyera floribunda* Willd.



Fonte: Herbário Prisco Bezerra, Campus do Pici, Universidade Federal do Ceará.

Conhecida popularmente por pacari, manacá, botica-inteira, marfim-de-rama, pau-rendoso, pau-caixão, pau-gemada, laça-vaqueiro, raiz-de-cobra e raiz-de-joão-da-costa. Duas espécies deste gênero são encontradas no Ceará, sendo as duas denominadas pelo mesmo nome popular, *Bredemeyera floribunda* Willd., encontrada na serra de Ibiapaba, e *Bredemeyera brevifolia* Klotzsch., encontrada na chapada do Araripe (MATOS, 2007).

Infusões feitas a partir da raiz seca de *Bredemeyera floribunda* Willd. são usadas popularmente no tratamento de infecções de pele, disenteria amebiana, reumatismo e hipertensão. Para esta última aplicação sugere-se a presença de um potente agente diurético presente na infusão feita com a raiz pulverizada. Outro uso relevante da medicina popular atribuída a *B. floribunda* é o tratamento de picadas de serpentes (SILVEIRA, *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 1996).

Bevenino e Aires (1994) estudaram o efeito do extrato bruto da raiz de *Bredemeyera floribunda* sobre a função renal em ratos, mostrando que o fluxo urinário, o ritmo de filtração glomerular, a fração de água e sódio excretada e a depuração de soluto sofreram aumento considerável e sugeriram que a ação do extrato se dá no transporte tubular, indicando o correto uso popular da infusão do extrato das raízes como diurético.

O extrato bruto da raiz de *B. floribunda* possui uma mistura de saponinas (BEVENINO *et al.*, 1994). As saponinas são um grupo de produtos naturais compostos por glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. São moléculas anfifílicas, possuindo uma parte de sua estrutura com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) denominada aglicona ou sapogenina e outra parte hidrofílica (com um ou mais açúcares) que tem ação como tensoativo, detergente e emulsificante. São substâncias de elevada massa molecular (600 a 2000 Da), apresentam estruturas com número variado de açúcares com cadeia linear ou ramificada e diversas agliconas. O isolamento de saponinas torna-se complicado pela dificuldade em se determinar os carbonos das ligações interglicosídicas (SCHENKEL *et al.*, 2001).

Em solução aquosa, as saponinas formam espuma abundante e persistente e podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona em saponinas esteroidais ou triterpênicas, ou ainda, podem ser classificadas por seu caráter ácido, básico ou neutro. As saponinas encontradas na família Polygalaceae são as triterpênicas, possuindo 30 átomos de carbono e núcleo triterpênico. Estes compostos são geralmente bastante solúveis em água e pouco solúveis em soluções apolares. Em sua extração utilizam-se alcoóis, etanol, metanol ou misturas hidroalcoólicas, empregando-se as seguintes técnicas: maceração, decoção, percolação ou extração exaustiva sob refluxo (SCHENKEL *et al.*, 2001).

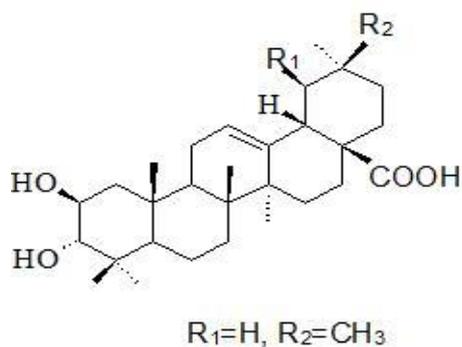
Estudos com compostos que contêm saponinas relatam ação sobre membranas celulares, alterando a permeabilidade ou causando sua destruição, bem como atividade hemolítica,

molusquicida, espermicida, anti-helmíntica, hipocolesterolemiantes, antiinflamatória, antiviral e antitumoral. Tradicionalmente, plantas contendo saponinas são usadas como expectorante e diurético (ZHANG *et al.*, 2008; SCHENKEL *et al.*, 2001).

O extrato de *B. floribunda* contém várias saponinas diferentes, identificadas como saponinas triterpênicas e compostas por ácido bredemólico e ácido tenuilfólico, sendo a estrutura do ácido bredemólico determinada por hidrólise ácida da saponina (BEVENINO *et al.*, 1994). Uma saponina triterpênica nomeada bredemeyerosideo D foi isolada de *B. floribunda* e sua estrutura elucidada por Pereira *et al.* (1996), mostrando em testes realizados em laboratório, potente atividade antiofídica.

A figura 5 representa a estrutura do ácido bredemólico extraído da saponina bruta de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Figura 5 – Estrutura do Ácido bredemólico



Fonte: Cheng *et al.*, 2008.

A figura 6 representa uma exsicata de *Bredemeyera floribunda* Willd. Proveniente da flora do Araripe, Crato, Ceará, Nordeste do Brasil.

Figura 6 – Exsicata de *B. floribunda* Willd.



Fonte: *Herbário Prisco Bezerra (EAC), Universidade Federal do Ceará.*

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

2 JUSTIFICATIVA E RELEVANCIA

Os acidentes com animais peçonhentos é um problema comum e crítico, sabe-se que a soroterapia tradicional raramente possui eficácia em neutralizar os danos teciduais locais, além na demora no atendimento que pode agravar consideravelmente o quadro clínico. A serpente do gênero *Bothrops* é a principal responsável pelos acidentes ofídicos no Brasil, sendo relevante investigar os mecanismos nos quais o veneno desta espécie desencadeia danos e alterações locais.

O extrato aquoso da raiz de *Bredemeyera floribunda* é usado popularmente de forma empírica na região Nordeste para tratar envenenamentos por serpentes, apresentando atividade antiofídica diante à morbidade de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em estudos *in vitro*, contudo essa comprovação não está completamente elucidada e, faz-se necessária a realização de mais estudos.

Em face ao exposto, este trabalho experimental visa investigar o bloqueio dos principais efeitos locais causados pelo envenenamento por *Bothrops jararacussu*, através da utilização do extrato de *B. floribunda* em camundongos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do extrato aquoso de *B. floribunda* frente às alterações locais promovidas pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a toxicidade aguda do extrato de *Bredemeyera floribunda* Willd;
- ✓ Estudar os efeitos do extrato de *B. floribunda* frente à ação fosfolipásica e proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu*;
- ✓ Avaliar os efeitos do extrato de *B. floribunda* frente à ação do veneno de *Bothrops jararacussu* em cultura de células RAW 264.7;
- ✓ Verificar a ação do extrato de *Bredemeyera floribunda* sobre a atividade edematogênica do veneno de *Bothrops jararacussu* e da carragenina;
- ✓ Investigar os efeitos do extrato de *B. floribunda* na atividade hemorrágica e necrosante do veneno de *Bothrops jararacussu*;
- ✓ Analisar o efeito neutralizante do extrato de *B. floribunda* frente à ação miotóxica do veneno de *B. jararacussu*.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos Swiss machos (20-25 g, n=6 para cada grupo) obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*.

4.2 Veneno, substâncias, drogas e reagentes

O veneno de *Bothrops jararacussu* (vBju) foi adquirido no Instituto Butantan. A raiz de *Bredemeyera floribunda* foi cedida pelo professor Francisco José de Abreu Matos, em 2007, do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará, da qual se fez o extrato aquoso. Resumidamente, 100 g de raízes secas e trituradas foram extraídas com água durante sete dias em repouso por três vezes consecutivas. O extrato obtido foi liofilizado.

Todos os substratos e reagentes utilizados neste trabalho foram obtidos de fornecedores credenciados (Sigma[®], EUA).

Figura 7 - Preparo do extrato de *Bredemeyera floribunda* Willd.



Fonte: Autora

4.3 Protocolos experimentais

4.3.1 Teste de dose limite 2000 mg/kg.

Foram usados camundongos machos Swiss (20 - 25 g). Primeiramente um animal foi submetido à dose teste de 2000 mg/kg. Como este animal sobreviveu, aplicou-se a mesma dose a quatro animais adicionais, um por vez. Os resultados foram avaliados da seguinte forma: A DL50 é menor do que a dose teste (2000 mg/kg) quando três ou mais animais morrem e maior do que a dose teste (2000 mg/kg) quando três ou mais animais sobrevivem. Os animais foram sacrificados e realizou-se necrópsia e análise histopatológica dos órgãos (NHI, 2001).

4.3.2 Ensaios *in vitro*

4.3.2.1 Caracterização fitoquímica do extrato de *Bredemeyera floribunda*.

A presença dos grupos de metabólitos secundários no extrato foi avaliada através de cromatografia em camada delgada utilizando reveladores químicos específicos (ensaios cromáticos), como descritos a seguir para: alcalóides – reagente de Dragendorff e reagente de Mayer; flavonóides e derivados cinâmicos – reagente de Neu/PEG 400 e cloreto de alumínio; proantocianinas e proantocianidinas – vanilina clorídrica; triterpenos, carotenoides e esteroides – reagente de Liebermann-Burchard; mono e sesquiterpenos – ácido fosfomolibdico; antranas, antraquinonas e cumarinas – reagente de Bornträger; saponinas – reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER e BLADT, 1996).

4.3.2.2. Atividade fosfolipásica A₂.

A mensuração do efeito do extrato aquoso de *B. floribunda* sobre a atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) do veneno total de *Bothrops jararacussu* (vBju) foi realizada segundo protocolo adaptado para placas de 96 poços, descrito por Cotrim *et al.* (2011). Para isso, o ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi)-benzóico (4N3OBA, Biomol, EUA) foi usado como substrato cromogênico. A mistura reacional do ensaio foi preparada utilizando 200 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) adicionada de 20 µL de substrato

(4N3OBA, X mM), 20 µL de VBju (2 mg/mL) e 20 µL de EBf (2 mg/mL, dissolvida em solução de PBS-DMSO 10%), perfazendo um volume final de 260 µL. Dois brancos foram realizados, o branco geral (no qual todos os componentes da mistura reacional foram adicionados, exceto o VBju e o EBf) e o branco do extrato (no qual somente o veneno ficou fora da mistura reacional). Foram usadas as concentrações de 1:1, 1:2 e 1:3, vBju: EBf (massa/massa). A absorbância foi medida em 425 nm, lida em intervalos de 10 minutos, utilizando leitor de placas Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

4.3.2.3. Atividade proteolítica

O efeito do extrato aquoso de *B. floribunda* frente à atividade proteolítica induzida pelo veneno de *B. jararacussu* foi determinada utilizando-se o substrato cromogênico sintético N α -BENZOIL-DL-ARGININA *p*-NITROANILIDA (DL-BA ρ NA), segundo o método de Erlanger e colaboradores (1961) modificado para leitor de microplacas de 96 poços (PONCE-SOTO *et al.*, 2007). A mistura reacional foi preparada utilizando 20 µL de substrato (DL-BA ρ NA), 200 µL de tampão (Tris-HCl, 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.8), 20 µL do EBf (2 mg/mL, dissolvida em solução de PBS-DMSO 10%) e 20 µL do vBju, com um volume final de 260 µL. Dois brancos foram realizados, o branco geral (no qual todos os componentes da mistura reacional foram adicionados, exceto o VBju e o EBf) e o branco do extrato (no qual somente o veneno ficou fora da mistura reacional). Foram utilizadas as concentrações de 1:1, 1:2 e 1:3, vBju: EBf (massa/massa). Após 30 minutos, a reação foi bloqueada com ácido acético 30% (50 µL) e lida a um comprimento de onda de 410 nm em leitor de placas VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os resultados foram expressos em nmol/mL/min.

4.3.2.4. Cultura de Células RAW 264.7.

a) Cultivo, manutenção e tratamento das células RAW 264.7.

As células RAW 264.7, linhagem celular de macrófagos de camundongos, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em cultivo no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) composto de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5

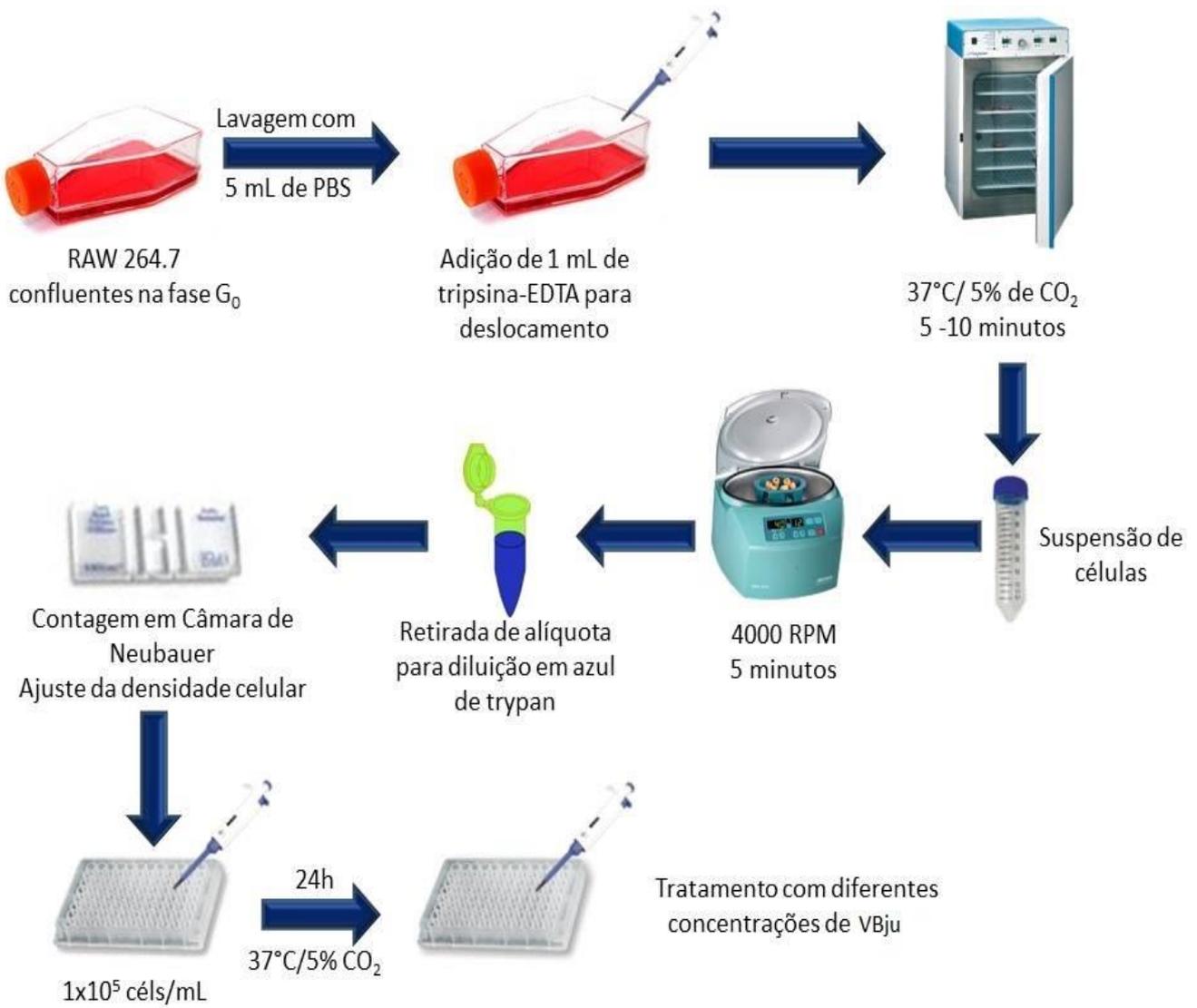
g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis, e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem confluência.

Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7.4. A garrafa foi incubada com 1 mL de solução de tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) por 5-10 minutos a 37°C para deslocamento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1 mL de DMEM completo, e alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com meio DMEM completo.

Para produção de estoques celulares, as garrafas foram periodicamente deslocadas, quantificadas e ressuspensas em meio DMEM completo acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Essas suspensões foram armazenadas em *vials* de criopreservação a -20°C *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a -80°C, mantidas por até 4 meses.

Antes de cada experimento, as células RAW 264.7 foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas e tripsinizadas como descrito acima e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM completo. Alíquotas foram removidas para quantificação em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1×10⁵ células/mL em placas de 96 poços. Após incubação por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, diferentes concentrações do extrato de *Bredemeyera floribunda* e veneno de *Bothrops jararacussu* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 µg/mL) foram adicionadas. Para análise dos efeitos biológicos *in vitro* do extrato de *B. floribunda* e do veneno de *B. jararacussu*, as placas foram incubadas por 24 horas e, em seguida, foram realizados os protocolos descritos a seguir (Figura 8).

Figura 8 - Cultivo e tratamento das células RAW 264.7 com veneno total da serpente *Bothrops jararacussu* em placas de 96 poços.



Fonte: (MENEZES, 2013).

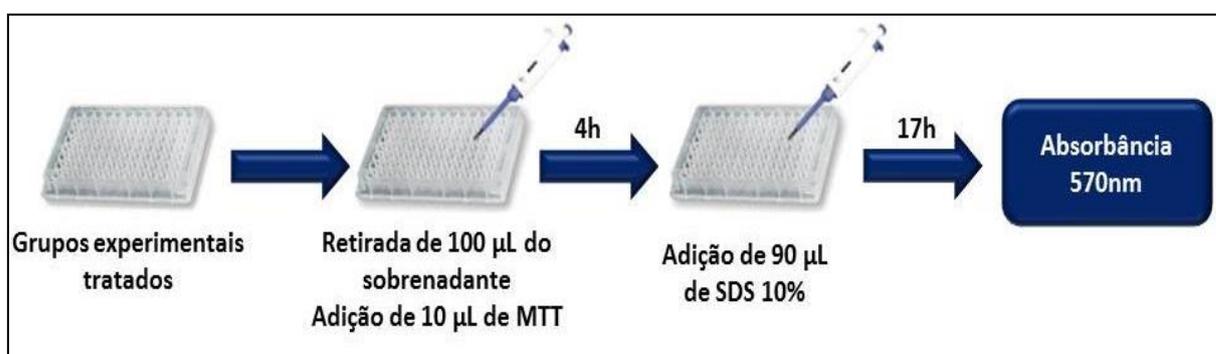
b) Determinação do efeito citotóxico do veneno de *Bothrops jararacussu* e do extrato de *B. floribunda* sobre macrófagos murinos.

b.1 Teste de viabilidade celular (MTT)

O teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é amplamente usado na determinação da viabilidade de células em cultivo. É um sal de tetrazólio de cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, deve ser adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados. Os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica das células (LIU *et al.*, 1997; MOSMANN, 1983).

Para determinar o efeito citotóxico do veneno de *Bothrops jararacussu* e extrato de *Bredemeyera floribunda* sobre macrófagos, placas de 96 poços tratadas com diferentes concentrações foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 µL de sobrenadante foram removidos. 10 µL de uma solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida, 90 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 horas de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm (Figura 9). Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular ± EPM em relação ao controle negativo.

Figura 9 - Ensaio de redução do MTT.



Fonte: (Adaptado de MENEZES, 2013).

c. Estudo do efeito do pré e pós-tratamento com EBF sobre a citotoxicidade do vBju em macrófagos murinos.

Para estudo dos efeitos do pré e pós-tratamento com o EBF sobre a citotoxicidade *in vitro* do vBju em macrófagos murinos, escolheu-se a maior concentração do extrato que não demonstrou efeito citotóxico ou proliferativo.

Antes de cada experimento, as células RAW 264.7 foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas e tripsinizadas como descrito anteriormente e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM completo. Alíquotas foram removidas para quantificação em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1×10⁵ células/mL em placas de 96 poços. Após incubação por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, as células foram tratadas com o extrato de *B. floribunda* 2 horas antes, para o pré-tratamento, e 2 horas depois, para o pós-tratamento, do tratamento com o veneno de *B. jararacussu* nas concentrações que demonstraram efeito citotóxico. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de redução do MTT descrito acima.

4.3.3 Ensaios *in vivo*

4.3.3.1 Grupos experimentais

I - Grupo veneno: animais tratados com 50 µg/animal de veneno de *Bothrops jararacussu* (vBju) dissolvidos em 50µL de solução de NaCl 0,9%.

II - Grupo pré-tratado i.p.: animais tratados com o extrato de *B. floribunda* (EBF; 150mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do veneno (50 µg/animal).

III – Grupo pré-tratado v.o.: animais tratados com o extrato de *B. floribunda* (EBF; 150mg/kg, v.o.) 30 minutos antes da administração do veneno (50 µg/animal).

IV- Grupo pós-tratado i.p.: animais tratados com EBF (150mg/kg, i.p.) 30 minutos após a administração do vBju (50 µg/animal).

V - Grupo pós-tratado v.o.: animais tratados com EBF (150mg/kg, v.o.) 30 minutos após a administração do vBju (50 µg/animal).

VI - Grupo pré-incubado: animais tratados com EBF (150mg/kg) e vBju (50 µg/animal), (1:3, p/p) pré-incubados por 15 minutos a temperatura de 37° C.

VII - Grupo controle com soro antibotrópico (SAB): animais tratados com SAB i.p. (quantidade suficiente para neutralizar 500 µg de veneno) 30 minutos antes da administração do vBju (50 µg/animal).

4.3.3.2 Edema de pata induzido pelo veneno total de *B. jararacussu*

Camundongos Swiss machos (18–22 g, n = 6) foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Todos os grupos receberam injeção sub-plantar de 50µL de solução de NaCl 0,9 na pata traseira direita para controle do volume e injeção de vBju e EBF de acordo com os grupos experimentais na pata traseira esquerda. O edema foi mensurado em cada grupo nos tempos de 10, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos após administração do veneno, usando um hidropletsmômetro (Insight®) e estimado pela diferença, em µL, entre o volume das patas direita (controle) e esquerda (teste). O tecido da pata foi coletado, ao final, para análise histológica (GUIMARÃES *et al.*, 2004).

4.3.3.3 Edema de pata induzido por carragenina

a) Grupos Experimentais

I - Grupo Carragenina: animais tratados com carragenina a 1% dissolvida em solução de NaCl 0,9%.

II - Grupo pré-tratado i.p.: animais tratados com o extrato de *B. floribunda* (EBF; 150mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de carragenina a 1%.

III - Grupo pré-tratado v.o.: animais tratados com o extrato de *B. floribunda* (EBF; 150mg/kg, v.o.) 30 minutos antes da administração de carragenina a 1%.

IV - Grupo pós-tratado i.p.: animais tratados com EBF (150mg/kg, i.p.) 30 minutos após a administração de carragenina a 1%.

V - Grupo pós-tratado v.o.: animais tratados com EBF (150mg/kg, v.o.) 30 minutos após a administração de carragenina a 1%.

VI – Grupo Indometacina (padrão positivo): animais tratados com Indometacina (10mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de carragenina a 1%.

b) Procedimento Experimental

Camundongos Swiss machos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Todos os grupos receberam injeção sub-plantar de 50 μ L de solução 0,9% de NaCl na pata traseira direita para controle do volume e injeção de 50 μ L de carragenina, EBf e Indometacina, de acordo com os grupos experimentais, na pata traseira esquerda. O edema foi mensurado em cada grupo nos tempos de 10, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos após administração do veneno, usando um hidropletsmômetro (Ugo Basile®) e estimado pela diferença, em μ L, entre o volume das patas direita (controle) e esquerda (teste). O tecido da pata foi coletado, ao final, para análise histológica (MANDAL *et al.*, 2003).

4.3.3.4 Atividade Hemorrágica

Camundongos machos Swiss, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg i.p.) para posteriormente ter o dorso tricotomizado onde foi injetado por via intradérmica 50 μ L de uma solução contendo 50 μ g de vBju. Os tratamentos foram realizados conforme os grupos experimentais discriminados anteriormente. Decorridas 2 horas para cada grupo, os animais foram sacrificados e a pele do dorso foi removida. A superfície interna da pele foi examinada e fotografada. O tamanho da área hemorrágica foi medido com o programa Image®, um software desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland. A área dos halos é contornada por meio de ferramentas do programa e o resultado é transformado de pixels para mm². O tecido do dorso foi coletado para análise histológica (ESMERALDINO *et al.*, 2005).

4.3.3.5 Atividade Necrosante

Camundongos machos Swiss, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg i.p.) para posteriormente ter o dorso tricotomizado onde foi injetado por via intradérmica 50 μ L de uma solução contendo 50 μ g de vBju. Os tratamentos foram realizados conforme os grupos experimentais discriminados anteriormente. Decorridas 72 horas para cada grupo, os animais foram sacrificados e a pele do dorso foi removida. A superfície interna da pele foi examinada e fotografada. O tamanho da área necrosante foi medido com o programa Image® e expressa em mm². O tecido foi coletado para análise histológica (ESMERALDINO *et al.*, 2005).

4.3.3.6 Atividade Miotóxica

A atividade miotóxica foi avaliada através da determinação dos níveis de atividade da enzima creatina fosfoquinase (CK) plasmática após duas horas da administração dos tratamentos.

Os animais foram divididos nos grupos discriminados anteriormente. Os animais receberam injeções intramusculares no músculo gastrocnêmio direito de 50 µL de solução contendo 50 µg de vBju. A coleta de sangue se deu por plexo retro-orbital com o uso de capilares heparinizados, após 2 horas da administração dos tratamentos. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg i.p.). Os controles negativos receberam apenas 50 µL de 1% DMSO-PBS. Após cada coleta de sangue os animais foram sacrificados. Amostras dos músculos foram retiradas e preparadas para posterior análise histológica.

Logo após a coleta, o plasma foi separado por centrifugação a uma temperatura de 4°C, a 3500 r.p.m. por 15 minutos. Para a determinação quantitativa da atividade de CK, usou-se um KIT de dosagem sérica de Creatina quinase (CK-NAC Liquiform– Labtest Diagnóstica®), utilizando-se 0,02mL de amostra e 1mL de reagente. A leitura foi realizada por método cinético em espectrofotômetro Labquest® a um comprimento de onda de 340 nm imediatamente após a adição das amostras ao reagente, quanto maior a absorbância, maior a quantidade de CK na amostra (JORGE, 2011).

4.4 Análise Histopatológica

Os tecidos foram coletados logo após sacrifício dos animais e armazenados em formol 10% tamponado durante 24 horas. Passando esse período, os tecidos foram armazenados em álcool a uma concentração de 70% até o processo de fixação. O material foi, então, cortado transversalmente, de modo a atingir todo o fragmento do tecido. Então, processou-se rotineiramente o material para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser, posteriormente, desidratado em concentrações crescentes de 70% a 100% de etanol. Após o processamento, foi realizada a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina foi cortado em 4 µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas pela

técnica de hematoxilina e eosina. O diagnóstico foi realizado pelo Patologista Dr. Dalgimar Beserra de Menezes e as imagens foram registradas por fotomicrografias.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). A significância das diferenças entre as médias foi avaliada por uma análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni quando os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle. Aplicaram-se anteriormente testes de normalidade. Os resultados foram considerados significantes quando $P < 0,05$.

4.6 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA) e aprovado sob o número de protocolo 52/2013.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Caracterização fitoquímica do extrato.

As substâncias presentes no extrato bruto de *Bredemeyera floribunda* estão listadas na tabela a seguir (tabela 3).

Tabela 3 – Grupos de metabólitos secundários presentes no extrato.

Flavonóides	+
Saponinas	+
Açúcares	+
Alcalóides	–
Quinonas	–
Cumarinas	–
Triterpenos	–
Esteróides	–
Mono e sesqui-terpenos	–

*Presença (+), ausência (-)

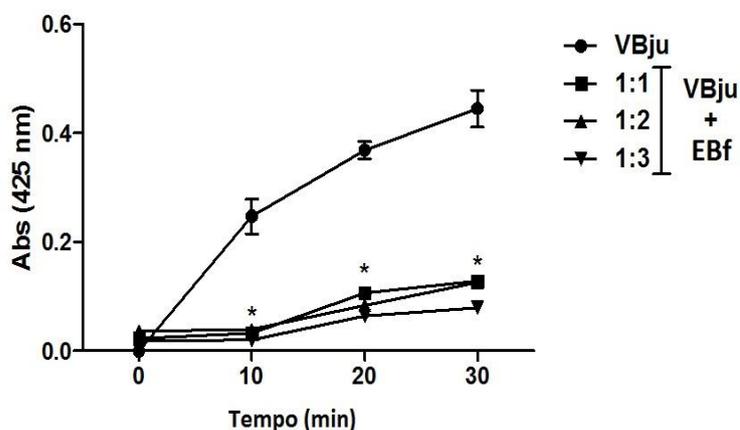
5.2 Teste de toxicidade aguda

No teste de dose limite do extrato aquoso de *B. Floribunda* não houve óbitos, os animais apresentaram leve sonolência. Na autópsia dos animais e no exame histopatológico dos órgãos não foram encontradas alterações. A DL50 do EBF é maior do que a dose teste (2000 mg/kg), indicando que o extrato apresenta baixa toxicidade aguda.

5.3 Atividade anti-fosfolipásica sobre o veneno total.

A Figura 10 mostra a absorvância pelo tempo, em minutos, e mostra a atividade fosfolipásica do veneno de *B. jararacussu* sobre o ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi)-benzóico (4N3OBA) como substrato. O gráfico apresenta três concentrações do extrato 1:1, 1:2 e 1:3 (vBju:EBf) em relação ao veneno (massa/massa) e mostrou inibição significativa da atividade fosfolipásica em todas as concentrações.

Figura 10 – Absorbância pelo tempo mostrando a atividade anti-fosfolipásica do extrato de *B. floribunda*.

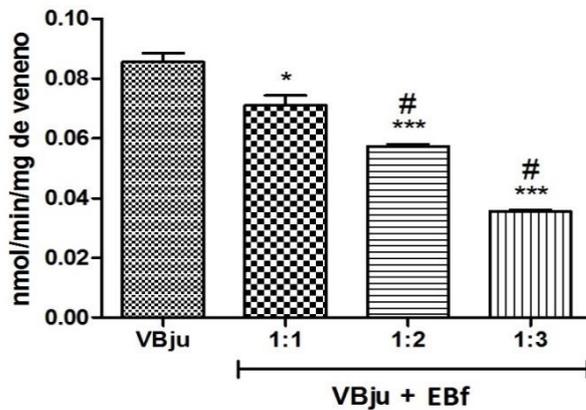


Os valores da figura representam a atividade fosfolipásica com veneno total na absorbância em 425nm pelo tempo(em min), mostrando a neutralização da atividade fosfolipásica do vBju pelo EBf nas razões de 1:1, 1:2 e 1:3 (vBju:EBf) sobre 4N3OBA como substrato. Resultados expressos como média \pm E.P.M. com nível de significância de * $P < 0,05$.

5.4 Atividade anti-proteolítica sobre o veneno total

A figura 11 mostra a atividade proteolítica do veneno de *B. jararacussu* sobre o substrato DL-BApNA. Os dados apresentam três concentrações do extrato 1:1, 1:2 e 1:3 (vBju:EBf) (massa:massa), demonstrando inibição significativa da atividade proteolítica em todas as concentrações ($P < 0,05$). A atividade proteolítica foi calculada em velocidade da degradação do substrato dada em nmols por minutos por miligrama de veneno.

Figura 11: Absorbância pelo tempo mostrando a atividade anti-proteolítica do extrato de *B. floribunda*.



Os valores da figura representam a atividade proteolítica sobre o substrato do EBF sobre o vBju nas razões de 1:1, 1:2 e 1:3, calculado em nmols/min/mg. Utilizou-se $N\alpha$ -BENZOIL-DL-ARGININA *p*-NITROANILIDA (DL-BAPNA) como substrato. O EBF mostrou inibição da atividade enzimática nas três concentrações. Resultados expressos como média \pm E.P.M. com nível de significância de * $P < 0,05$.

5.5 Cultura de Células RAW 264.7.

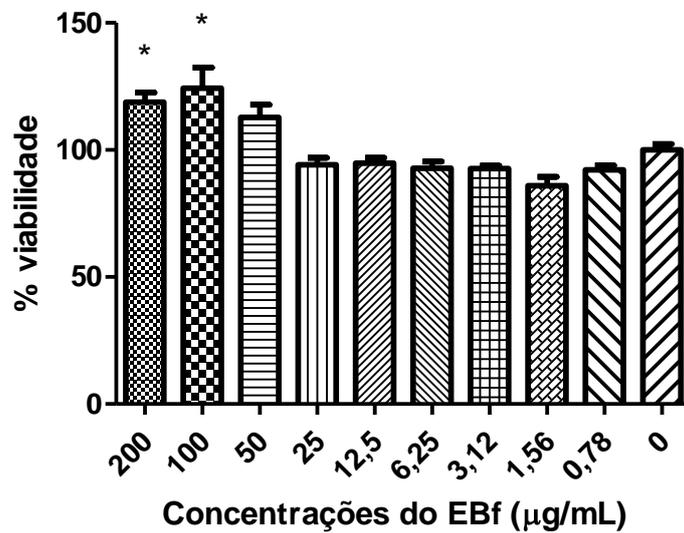
5.5.1 Efeito do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e do extrato de *Bredemeyera floribunda* sobre a viabilidade de macrófagos murinos.

A viabilidade celular sobre macrófagos murinos do extrato e do veneno foi avaliada pelo teste de redução pelo MTT. As células foram incubadas durante 24 horas com diferentes concentrações do vBju e do Ebf (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 μ g/mL).

Observou-se um aumento de viabilidade, indicando uma possível proliferação, nos grupos tratados com as concentrações mais altas do extrato utilizadas (200; 100 μ g/mL) e um aumento de viabilidade na concentração de 50 μ g/mL ($P < 0,05$) (Figura 12).

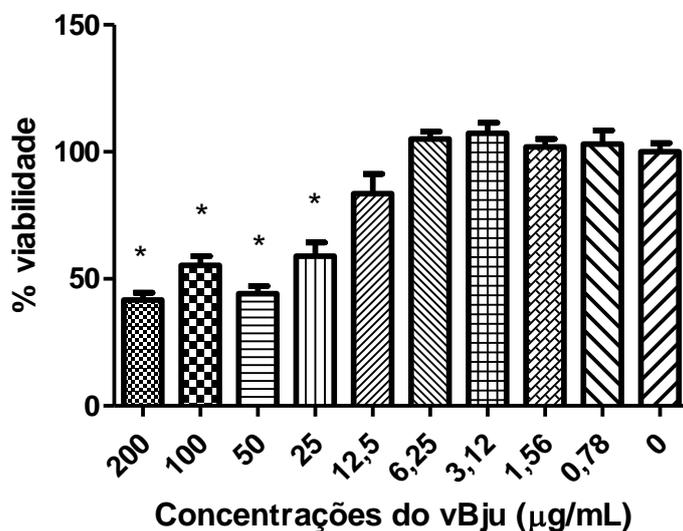
Observou-se diminuição de viabilidade celular nos grupos tratados com as concentrações mais altas do veneno utilizadas (200; 100; 50 e 25 μ g/mL), com IC50 de 67,64 μ g/mL ($P < 0,05$) (Figura 13).

Figura 12 - Efeito do Ebf sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação com o EBf.



Os valores da figura representam a viabilidade celular média \pm EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, $*P < 0,05$ vs. grupo controle.

Figura 13 - Efeito do vBju sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação com o veneno.



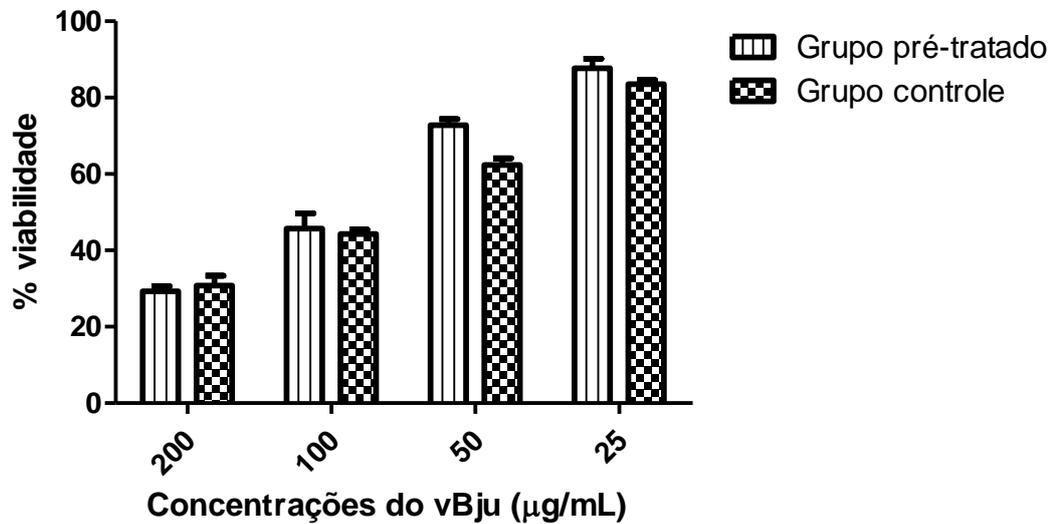
Os valores da figura expressam como a média \pm EPM da viabilidade celular. Experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, $*P < 0,05$ vs. grupo controle.

5.5.2. Estudo do efeito do pré e pós tratamento com o EBF sobre a citotoxicidade do vBju em macrófagos murinos.

O extrato foi incubado com as células RAW 264.7 duas horas antes, no pré-tratamento, e duas horas depois, no pós- tratamento, com o vBju por 24 horas de incubação nas concentrações que o veneno demonstrou citotoxicidade (200; 100; 50; 25 $\mu\text{g/mL}$).

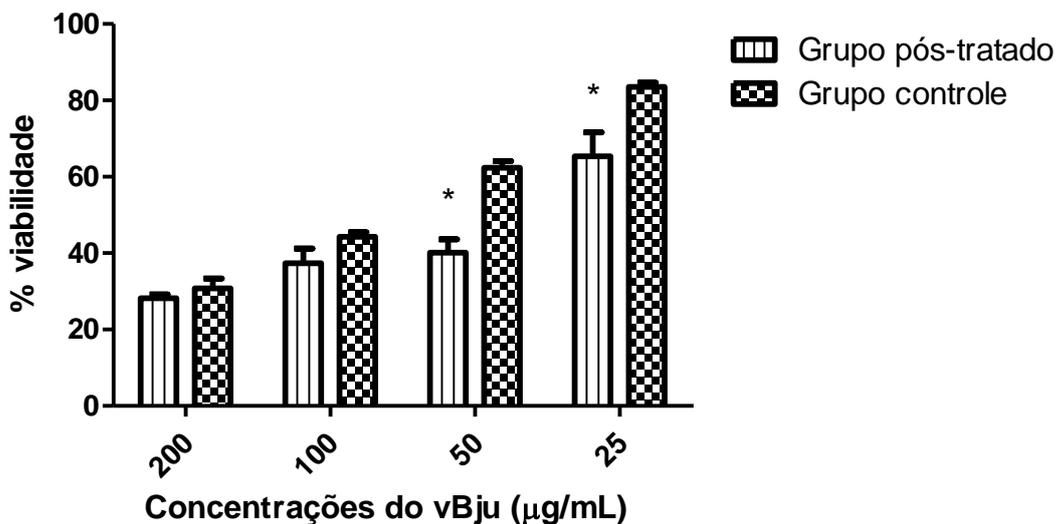
Não se observou efeito protetor nos grupos pré-tratados com o extrato (Figura 14). O efeito de aumento de citotoxicidade foi observado nos grupos pós-tratados com o extrato nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) (Figura 15).

Figura 14. Efeito do pré-tratamento com o EBF sobre a citotoxicidade do vBju em células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação.



Os valores da figura representam a viabilidade celular como média \pm EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni.

Figura 15. Efeito do pós-tratamento com EBF sobre a citotoxicidade do vBju em células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação.



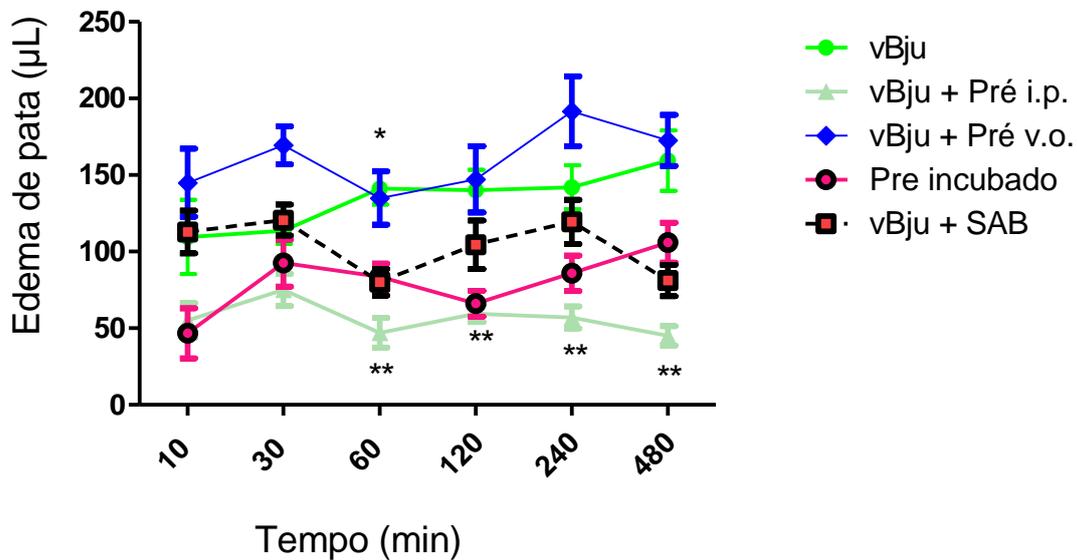
Os valores da figura representam a viabilidade celular como média \pm EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni, $*P < 0,05$ vs grupo controle.

5.6 Avaliação da atividade anti-edematogênica sobre veneno total.

5.6.1 Atividade edematogênica do vBju e bloqueio pelo EBf.

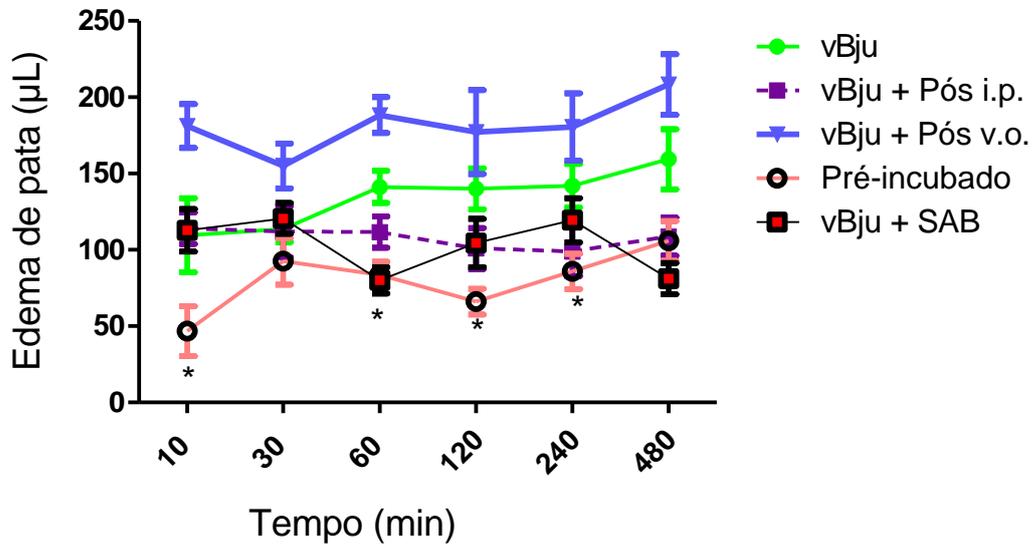
As figuras 16 e 17 mostram a atividade edematogênica do vBju e o bloqueio pelo EBf. A medida do edema foi realizada em um pletismômetro (Insight®, Brasil) e dada em μL pela diferença entre as patas esquerda (teste) e direita (controle) dos animais. Na tabela 4 encontram-se os dados estatísticos referentes a todos os grupos do EBf com o vBju.

Figura 16 – Gráfico Edema de pata induzido pelo vBju e bloqueio pelo EBf.



Os valores da figura representam o edema de pata em μL pelo tempo em minutos nos grupos veneno (vBju), pré-tratado i.p. e v.o. (vBju + Pré i.p. e vBju + Pré v.o.) (30 min antes do veneno), pré-incubado (extrato + veneno, 15 min, 37° C), e soro antibotrópico SAB (vBju + SAB). O edema foi medido nos tempos 10, 30, 60, 120, 240 e 480 min. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni com $*P < 0,05$ Veneno vs Veneno + Pré i.p., pré incubado, veneno+SAB e $**P < 0,05$ vBju + Pré i.p. vs vBju em 10, 30, 60, 120, 240 e 480 min.

Figura 17 – Gráfico Edema de pata induzido pelo vBju e bloqueio pelo EBf.



Os valores da figura representam o edema de pata em μL pelo tempo em minutos nos grupos veneno, pré-tratado i.p. e v.o. (30 min antes do veneno), pré-incubado (extrato + veneno, 15 min, 37°C), vBju + Indometacina e soro antibotrópico (SAB). O edema foi medido nos tempos 10, 30, 60, 120, 240 e 480 min. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni com $*P < 0,05$ pré-incubado vs Veneno (10, 60, 120, 240) e $**P < 0,05$ vBju+SAB vs veneno(60, 240).

Na tabela 4, pode-se verificar a mensuração do edema de pata, em microlitros, no decorrer do tempo, em minutos. Observa-se uma diminuição significativa do edema nos grupos pré-tratado i.p. e pré-incubado.

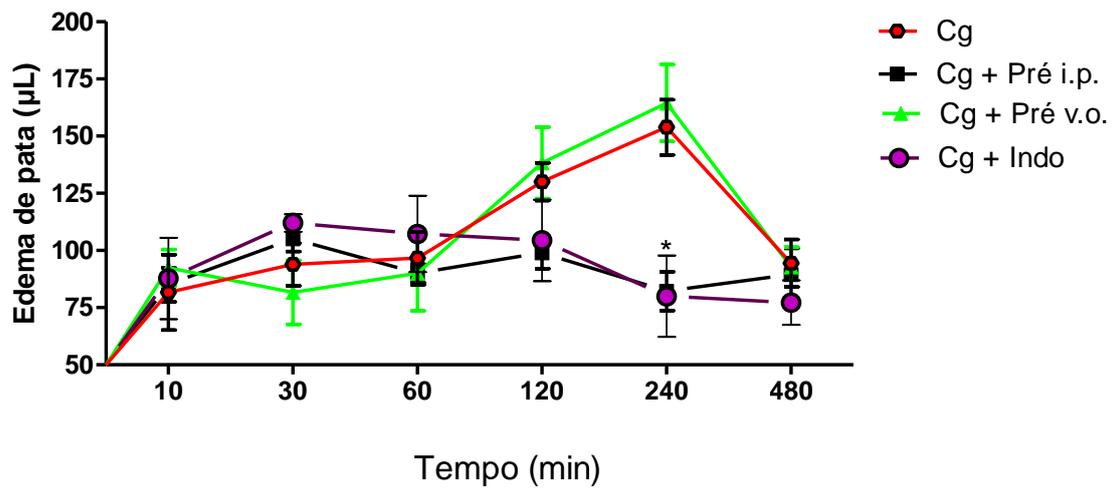
Tabela 4 - Atividade anti-edematogênica do Extrato de *B. floribunda* sobre o veneno.

Grupos	Δ edema de pata (μL)						
	Tempo (min)	10	30	60	120	240	480
Veneno		109,57 ± 7,75	113,7 ± 7,75	141,2 ± 7,75	140 ± 7,75	142,1 ± 7,75	154,9 ± 7,75
SAB		112,8 ± 7,48	120,6 ± 7,48	80,03 ± 7,48	104,5 ± 7,48	119,4 ± 7,48	81,13 ± 7,48
Pré-tratado i.p.		55 ± 7,48	75 ± 7,48	47,08 ± 7,48	59,58 ± 7,48	57,08 ± 7,48	45 ± 7,48
Pré-tratado v.o.		144,98 ± 7,04	169,43 ± 7,04	134,98 ± 7,04	147,18 ± 7,04	191,65 ± 7,04	172,66 ± 7,04
Pós-tratado i.p.		114,2 ± 2,59	11,9 ± 2,59	111,7 ± 2,59	100,8 ± 2,59	98,89 ± 2,59	108,6 ± 2,59
Pós-tratado v.o.		181,10 ± 7,04	155,0 ± 7,04	188,3 ± 7,04	177,2 ± 7,04	180,5 ± 7,04	208,4 ± 7,04
Pré-incubado		46,67 ± 8,51	92,5 ± 8,51	83,61 ± 8,51	66,11 ± 8,51	85,83 ± 8,51	105,8 ± 8,51

A tabela apresenta os valores do edema de pata (μL) em animais dos grupos veneno, grupo soroantibotrópico (controle positivo), pré-tratamento i.p., pré-tratamento v.o., pós-tratamento i.p., pós-tratamento v.o., pré-incubado. Valores expressos como média ± erro padrão.

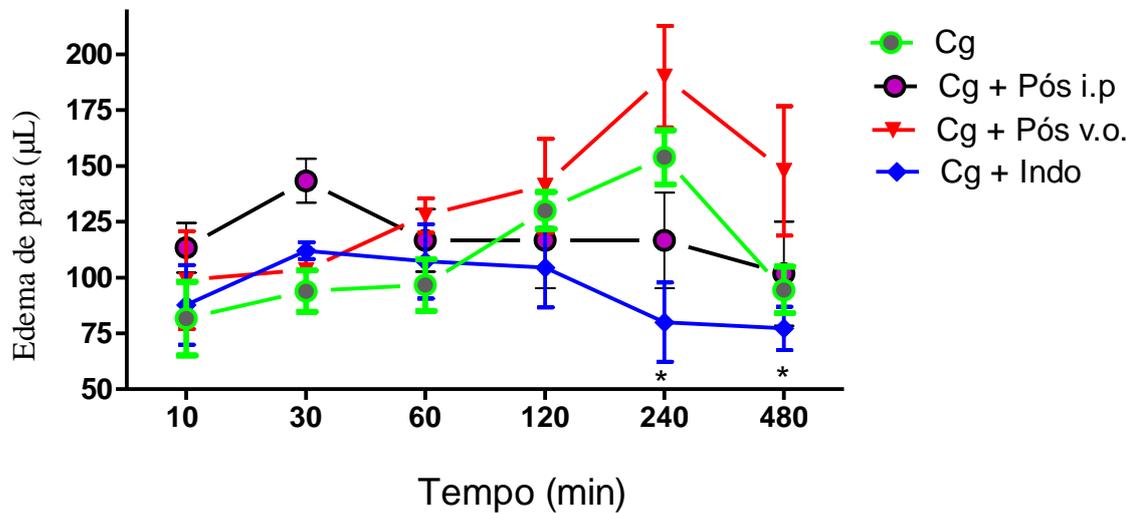
5.6.2 Edema de pata induzido por carragenina (Cg).

Figura 18 - Gráfico da indução de edema por carragenina e bloqueio pelo extrato de *B. floribunda*. Os dados estatísticos estão mostrados na tabela 5.



Os valores da figura representam o edema de pata em μL induzido por carragenina nos grupos Cg, Cg + pré-tratado i.p. e v.o. (30 min antes do veneno) e Cg+ Indo. O edema foi medido nos tempos 10, 30, 60, 120, 240 e 480 min.. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni com $*P < 0,05$ Cg vs Cg + pré v.o e Cg + indo (240).

Figura 19 - Gráfico da indução de edema por carragenina e bloqueio pelo extrato de *B. floribunda*.



Os valores da figura representam o edema de pata em μL induzido por carragenina nos grupos Cg, Cg + pré-tratado i.p. e v.o. (30 min antes do veneno) e Cg+ Indo. O edema foi medido nos tempos 10, 30, 60, 120, 240 e 480 min. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni com $*P < 0,05$ Cg vs Cg + indo (240 e 480).

Na tabela 5, pode-se verificar os valores da mensuração do edema de pata, em microlitros, no decorrer do tempo, em minutos. Observa-se uma diminuição significativa do edema ocasionado por carragenina nos grupos pré-tratado i.p. e Indometacina, usado como controle.

Tabela 5 - Atividade anti-edematogênica do Extrato de *B. floribunda* sobre a carragenina (Cg).

Grupos	Δ edema de pata (μL)						
	Tempo (min)		10	30	60	120	240
Cg	81,65 ± 11,25	93,89 ± 11,25	96,65 ± 11,25	130,0 ± 11,25	153,9 ± 11,25	94,43 ± 11,25	
Cg + Pré i.p.	85,0 ± 3,52	105,0 ± 3,52	90,0 ± 3,52	98,88 ± 3,52	82,20 ± 3,52	89,43 ± 3,52	
Cg + Pré v.o.	92,48 ± 13,63	81,67 ± 13,63	90,0 ± 13,63	138,3 ± 13,63	164,5 ± 13,63	92,77 ± 13,63	

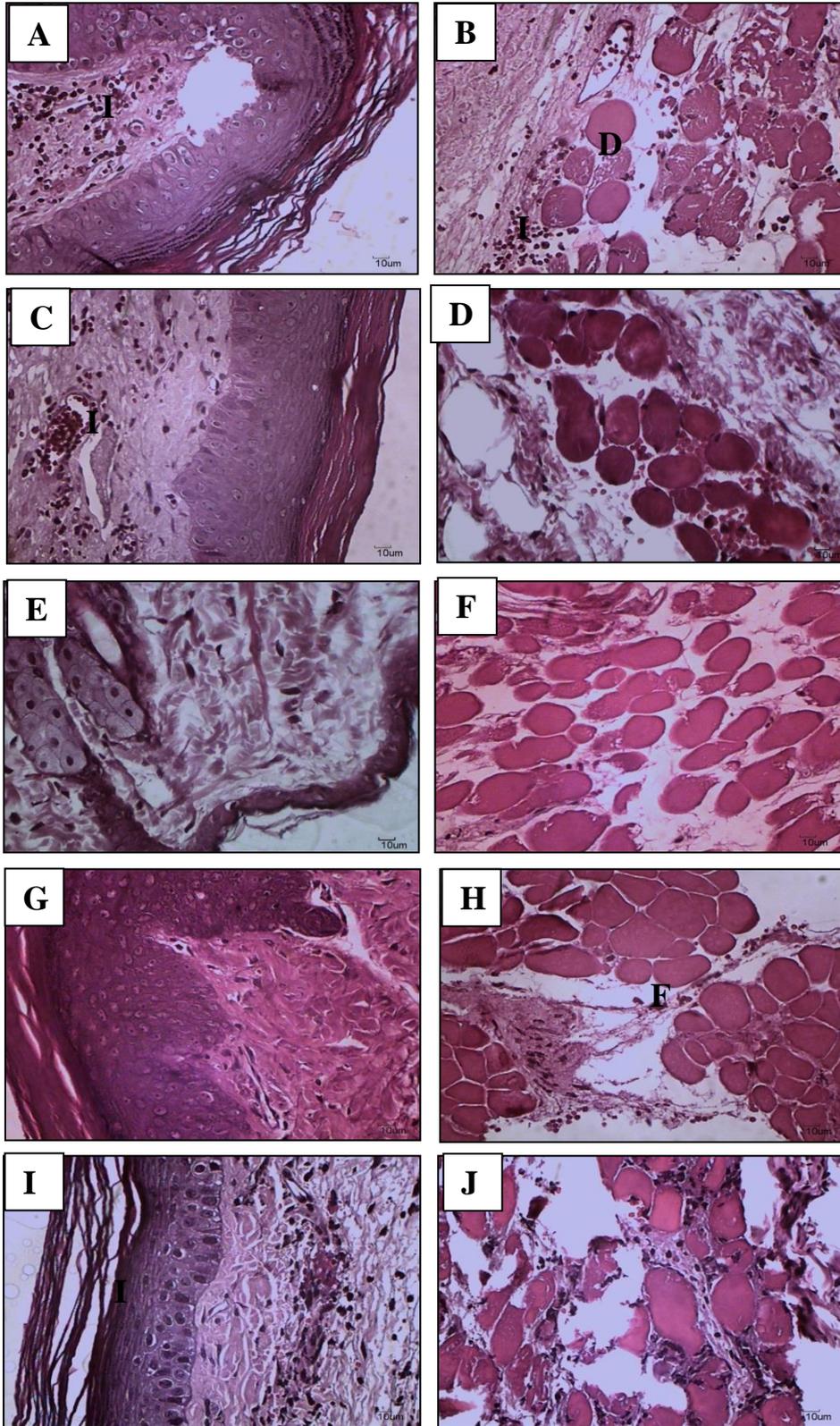
Cg + Pós i.p.	133,3 ± 5,58	143,3 ± 5,58	116,7 ± 5,58	116,6 ± 5,58	116,6 ± 5,58	101,7 ± 5,58
Cg + Pós v.o.	98,9 ± 13,64	103,3 ± 13,64	127,8 ± 13,64	141,1 ± 13,64	190,0 ± 13,64	147,8 ± 13,64
Cg + Indo	87,77 ± 6,11	112,0 ± 6,11	107,2 ± 6,11	104,4 ± 6,11	79,98 ± 6,11	77,22 ± 6,11

Valores da tabela representa o edema de pata (μL) em animais dos grupos veneno, grupo soroantibotrópico (controle positivo), pré-tratamento i.p., pré-tratamento v.o., pós-tratamento i.p., pós-tratamento v.o., pré-incubado. Valores expressos como média \pm erro.

As figuras 18 e 19 mostram a atividade edematogênica da carragenina e bloqueio pela Indometacina. A carragenina causou edema de pata nos animais logo após a injeção desta, apresentando pico aos 240 minutos ($153,88 \pm 11,25 \mu\text{L}$, $P < 0,05$) com posterior declínio. Houve redução significativa do pico edematogênico no pré-tratamento com o EBF ($82,2 \pm 3,52 \mu\text{L}$). O grupo que recebeu indometacina apresentou o pico edematogênico aos 30 minutos ($128,33 \pm 7,97 \mu\text{L}$) com posterior declínio, bloqueando a resposta inflamatória da carragenina no pico edematogênico ($79,98 \pm 7,97 \mu\text{L}$).

Na análise histopatológica (figura 20), achados demonstraram que no grupo veneno ocorreu edema e infiltração inflamatória aguda, fibras musculares sofrendo degeneração e necrose. Os grupos pré-tratado i.p. e pré-incubado apresentaram exsudato inflamatório agudo mínimo e músculo com discreta alteração. O grupo pós-tratado i.p. não apresentou uma reversibilidade do efeito do veneno com a presença de edema, leve infiltrado inflamatório alterações musculares. No grupo SAB, há a presença de edema, infiltrados significativos moderados de células mistas de mono e polimorfonucleares, epiderme com necrose e balonização das fibras musculares e inflamação profunda até tecido muscular.

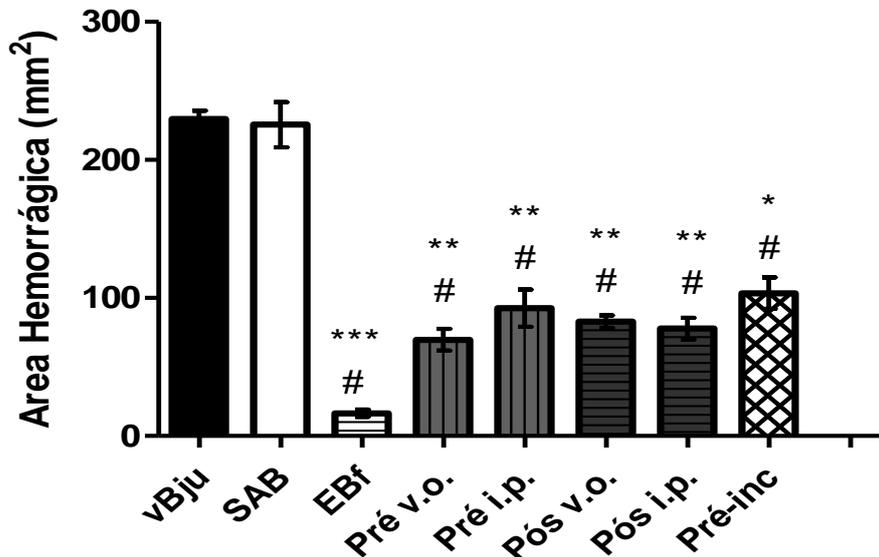
Figura 20 – Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.



Derme e epiderme (A, C, E, F) e tecido muscular (B, D, F, H). A e B: vBju (50 μg / 50 μL); C e D: Pré-tratamento i.p. com EBf (150 mg/kg); E e F: Pré-incubado (vBju +EBf, na concentração de 1: 1); G e H: Pós-tratamento com EBf (150mg/kg); I e J (Soro antibiótico). Aumento 400X. I: infiltrado inflamatório, D: fibras em degeneração, F: fibras musculares normais. Coloração HE.

5.7 Avaliação da atividade anti-hemorrágica sobre veneno total

Figura 21 - Atividade hemorrágica do vBju e inibição pelo EBf.

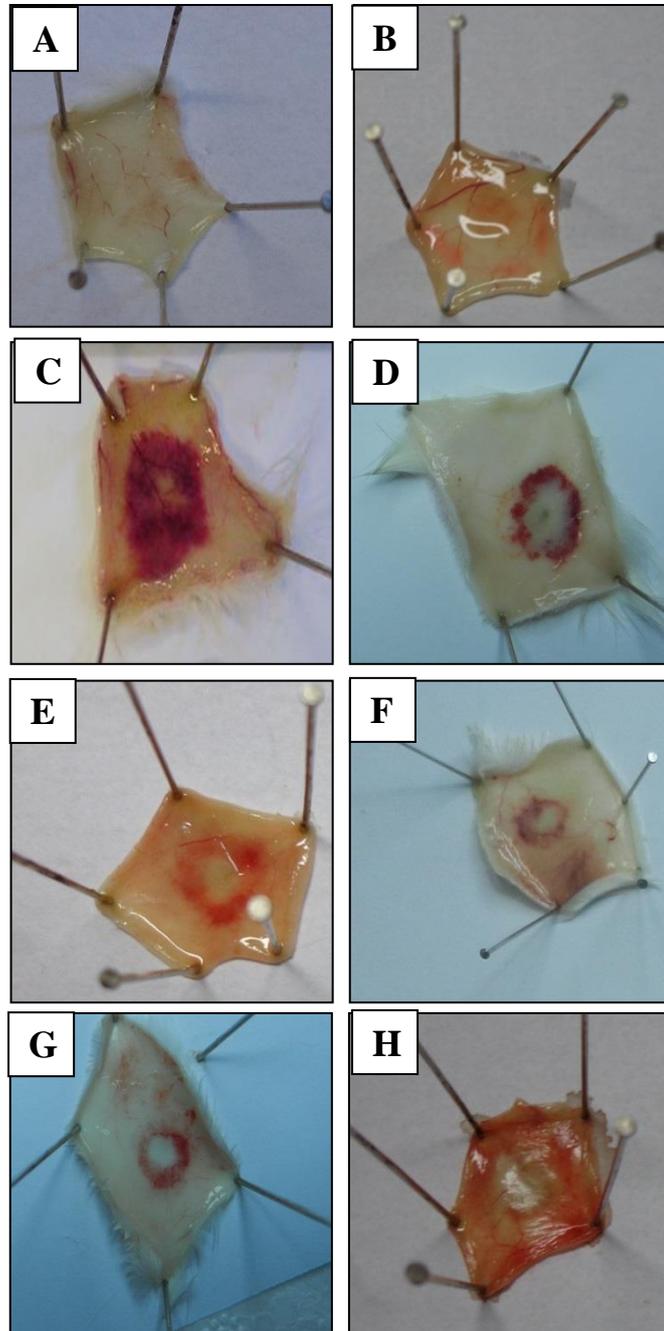


Os valores da figura representam a atividade hemorrágica do veneno de *B. jararacussu* pelo extrato de *B. floribunda*. Os grupos representados são: Veneno de *Bothrops jararacussu* (vBju), Soro anti botrópico (SAB), Extrato de *B. floribunda*(EBf), Pré-tratamento v.o.(Pré v.o), Pré-tratamento i.p.(Pré); Pós-tratamento v.o.(Pós v.o), Pós-tratamento i.p. (Pós i.p)e Pré-incubado(Pré-Incubado). A área hemorrágica foi calculada em mm². Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni com * $P < 0,05$ vs vBju, ** $P < 0,01$ vs vBju *** $P < 0,001$ vs vBju; # $P < 0,05$ vs SAB.

A atividade hemorrágica do veneno de *B. jararacussu* ($229,69 \pm 5,83$ mm²) mostrou-se significativamente maior do que os tratamentos com o EBf: EBf ($16,43 \pm 2,58$ mm²), Pré-tratamento v. o. ($69,70 \pm 7,84$ mm²), Pré-tratamento i.p. ($92,66 \pm 13,44$ mm²), Pós-tratamento v.o. ($82,89 \pm 4,44$ mm²), Pós-tratamento i.p. ($77,81 \pm 7,88$ mm²)e Pré-incubado ($103,46 \pm 11,31$ mm²). O grupo que recebeu tratamento com Soro antibotrópico (SAB) não obteve bloqueio da atividade hemorrágica do veneno ($225,50 \pm 16,31$ mm²). Não houve significância entre os grupo tratados, mas entre os grupos vBju e SAB e os grupos tratados com o EBf como observado no gráfico acima (Figura 21).

Na figura 22 pode-se observar a foto dos halos na pele de camundongos. Os tratamentos com o EBf diminuíram de forma considerável a ação do vBju.

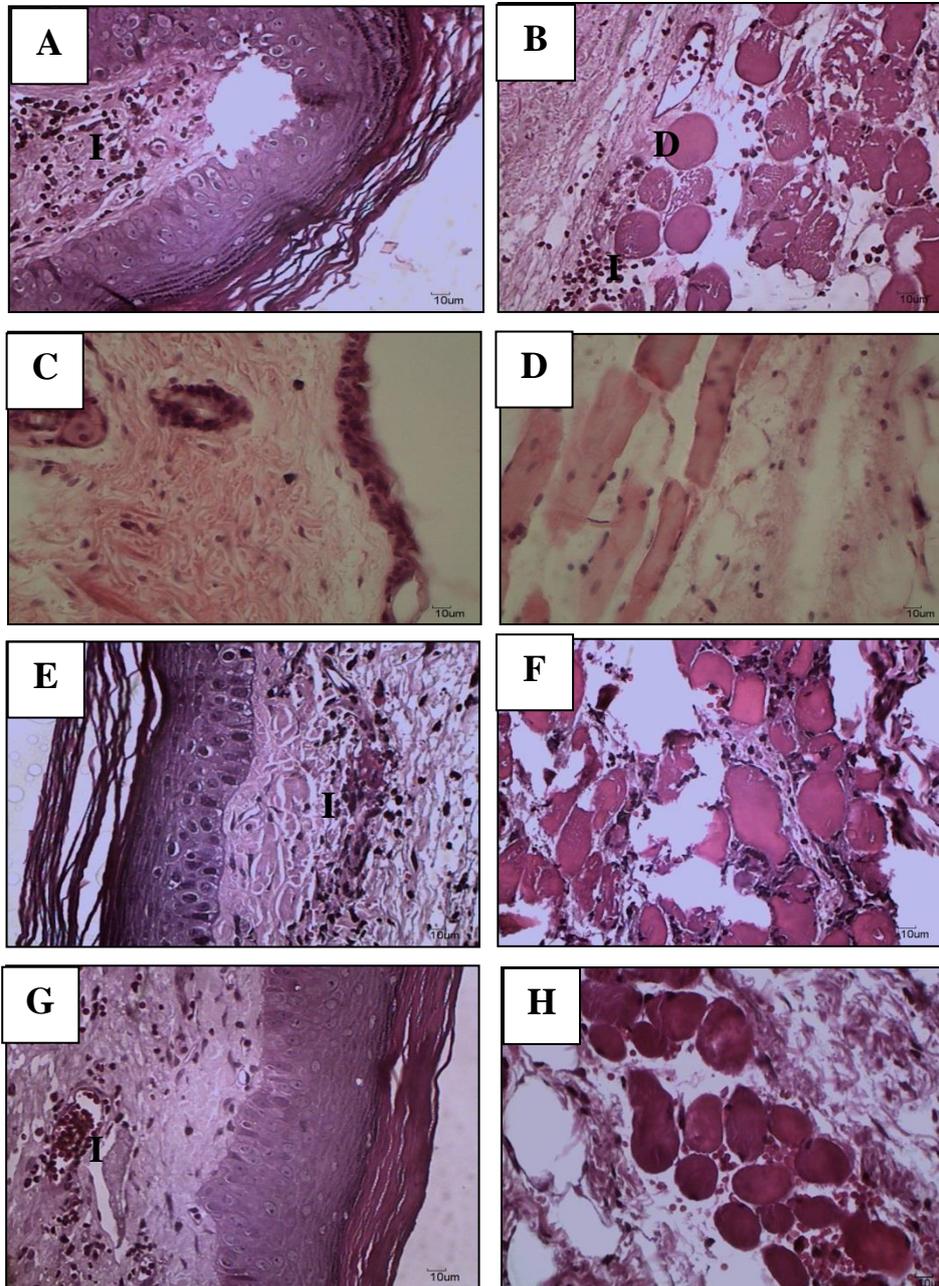
Figura 22 - Fotografias dos halos hemorrágicos do tecido epitelial da região dorsal de camundongos tratados com vBju e EBf.



Fotografias do tecido epitelial do dorso de camundongos mostrando o halo hemorrágico produzido pelo vBju. A: salina; B: vBju; C: EBf; D: Pré-tratamento i.p.; E: Pré-tratamento v. o.; F: Pré-incubado; G: Pós-tratamento i.p.; H: Pós-tratamento v.o.

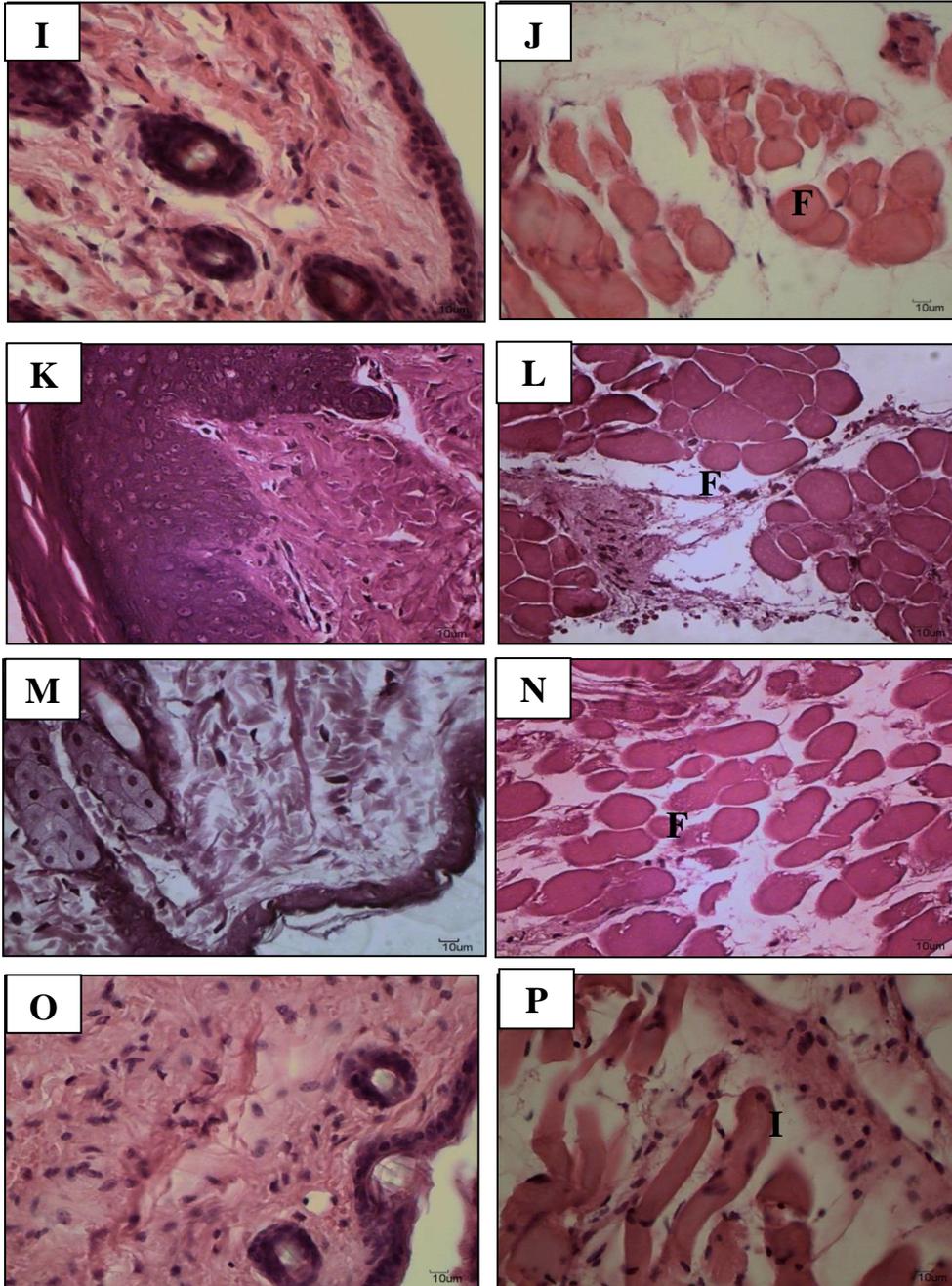
No laudo histopatológico (figura 23), os controles tratados com salina e tratados somente com o EBf não apresentaram alterações. No grupo veneno encontrou-se edema entre derme e epiderme, balonização e destruição de fibras musculares e presença de infiltrado inflamatório nos tecidos subcutâneo e muscular. Nos grupos tratados com o EBf, pré-tratamento i.p. e v.o., pós-tratamento i.p. e v.o., grupo pré-incubado, encontraram-se leves alterações em alguns animais do grupo pós-tratado i.p. e v.o. (derme ligeiramente edematosa, leve infiltrado inflamatório), mas a maioria dos animais apresentou as camadas da pele (derme, epiderme, subcutâneo, e tecido muscular) normais ao exame histopatológico. Os animais do grupo que receberam soro antibotrópico apresentaram o tecido subcutâneo e muscular com edema, infiltrado inflamatório, necrose e balonização de fibras musculares.

Figura 23 - Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.



Derme e epiderme (A, C, E, G) e subcutâneo e tecido muscular (B, D, F, H) após 2 horas de administração i.d de 50 μL de vBju. A e B: vBju (50 μg / 50 μL); C e D: controle com EBf; E e F: Soro antibotrópico; G e H: Pré-tratamento i.p. com EBf (150 mg/kg). Aumento 400X. **I**: infiltrado inflamatório, **D**: fibras em degeneração, **F**: fibras musculares normais. Coloração HE.

Figura 24 - Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.

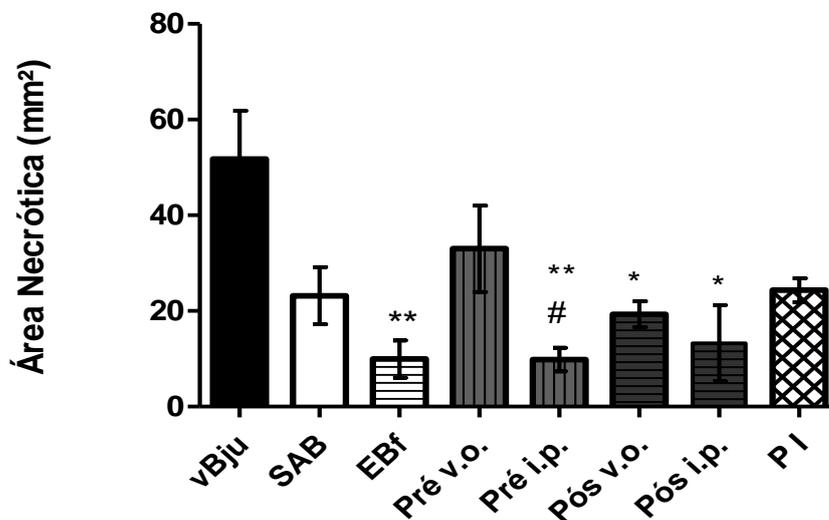


Derme e epiderme (I, K, M, O) e subcutâneo e tecido muscular (J, L, N, P) após 2 horas de administração i.d de 50 μL de vBju. I e J: Pré-tratamento v.o. com EBf (150 mg/kg); K e L: Pré-incubado (vBju + EBf, 15 min, 37°C); M e N: Pós-tratamento i.p. com EBf (150 mg/kg); O e P: Pós-tratamento v.o. com EBf. Aumento 400X. **I**: infiltrado inflamatório, **D**: fibras em degeneração, **F**: fibras musculares normais. Coloração HE.

5.8 Avaliação da atividade anti-necrosante sobre veneno total.

A figura a seguir (figura 25) mostra o gráfico da atividade necrótica do veneno e inibição pelos tratamentos com o extrato de *B. floribunda*.

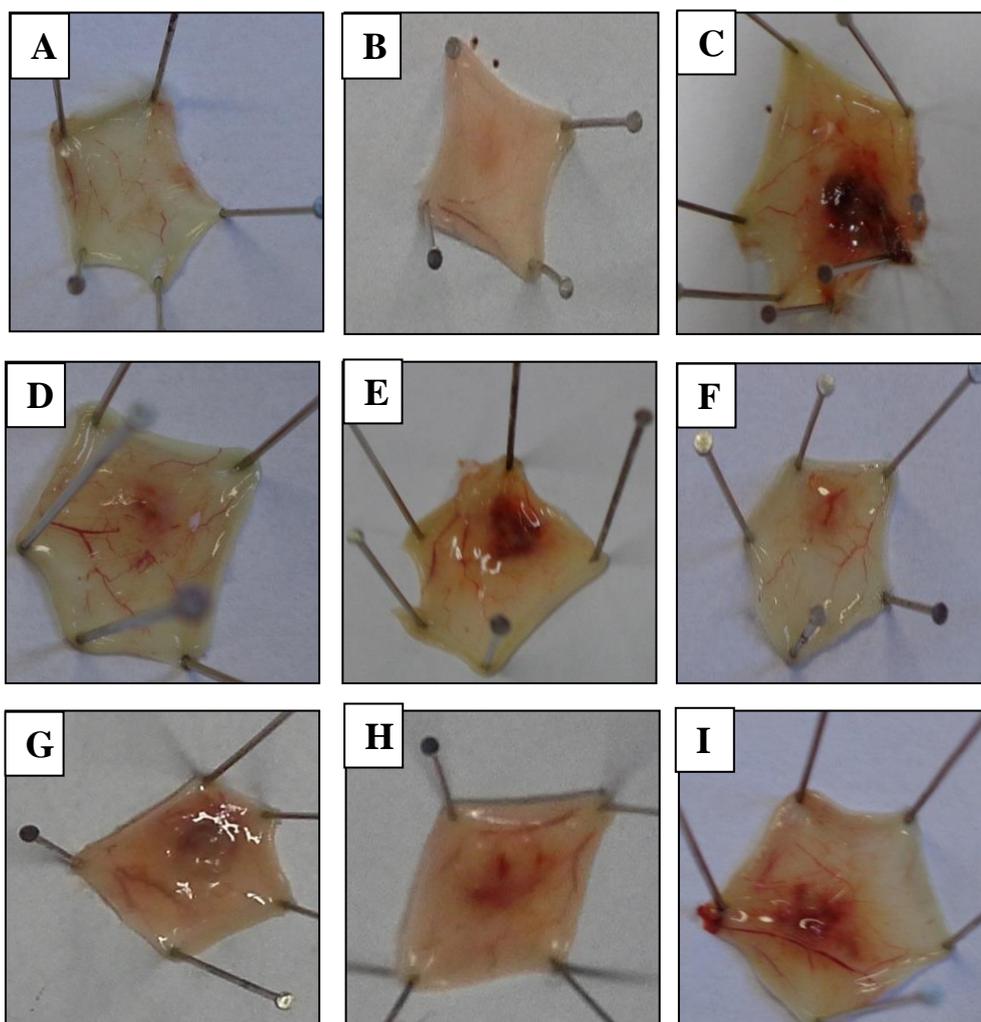
Figura 25 - Inibição da atividade necrótica do veneno de *B. jararacussu* pelo extrato de *B. floribunda*.



Os valores da figura representam os valores da área necrótica do veneno de *B. jararacussu* pelo extrato de *B. floribunda*. Os grupos representados são: Veneno de *Bothrops jararacussu* (vBju), Soro anti botrópico (SAB), Extrato de *B. floribunda* (EBf), Pré-tratamento v.o. (Pré v.o.), Pré-tratamento i.p. (Pré); Pós-tratamento v.o. (Pós v.o.), Pós-tratamento i.p. (Pós i.p.) e Pré-incubado (Pré-Incubado). A área necrótica foi calculada em mm². Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni com * $P < 0,05$ vs vBju, ** $P < 0,01$ vs vBju, # $P < 0,05$ vs SAB.

A atividade necrosante do veneno de *B. jararacussu* ($51,79 \pm 10,06$ mm²) apresentou-se significativamente maior do que os tratamentos com o EBf: EBf ($9,94 \pm 3,92$ mm²), Pré-tratamento v. o. ($33,00 \pm 9,01$ mm²), Pré-tratamento i.p. ($9,84 \pm 2,44$ mm²), Pós-tratamento v.o. ($19,33 \pm 2,70$ mm²), Pós-tratamento i.p. ($13,24 \pm 7,97$ mm²) e Pré-incubado ($24,33 \pm 2,50$). O grupo que recebeu tratamento com Soro antibotrópico (SAB) obteve bloqueio da atividade necrosante do vBju ($23,17 \pm 5,96$ mm²). A figura 26 mostra as fotos da pele do dorso dos animais e os halos necróticos.

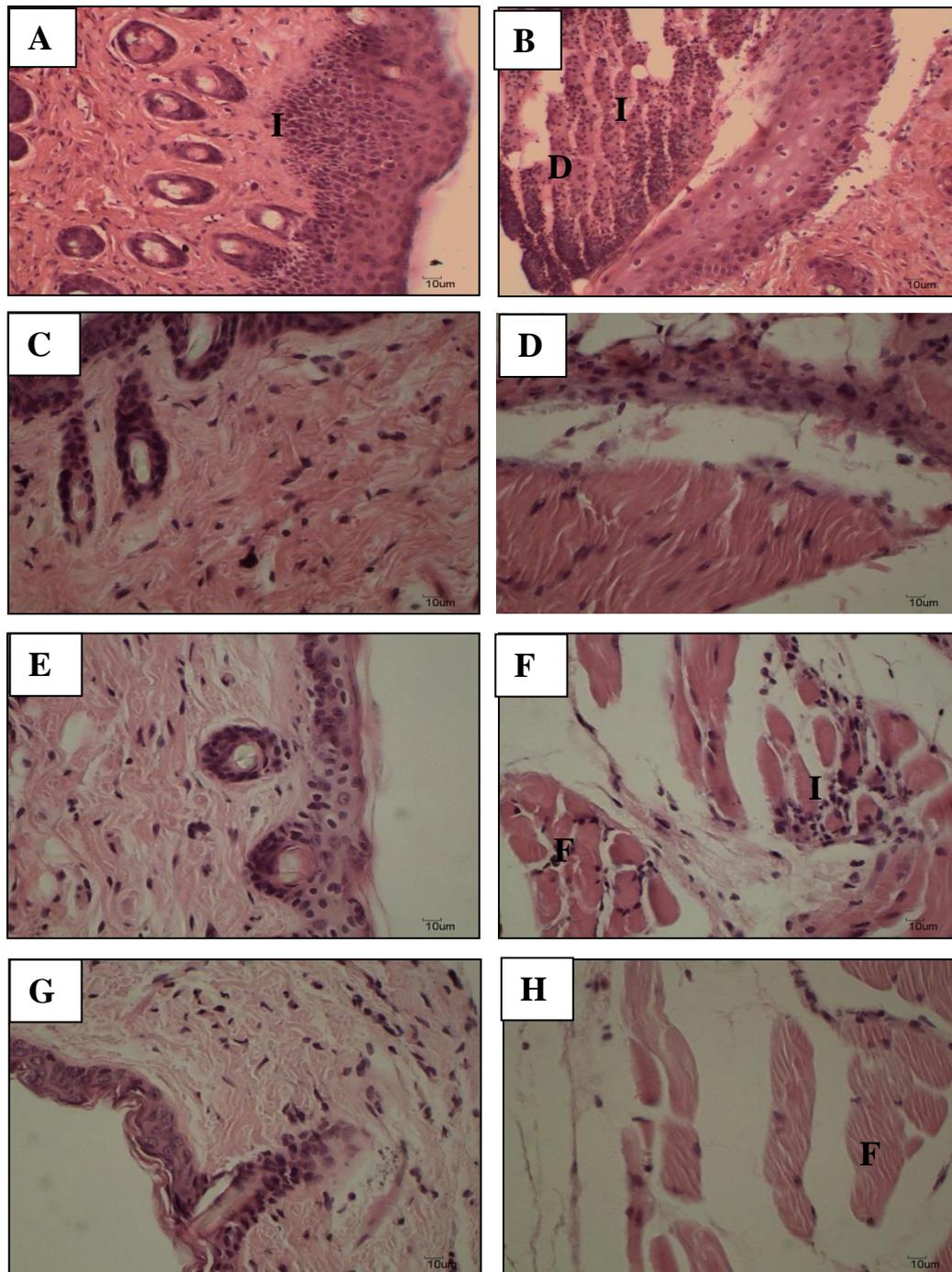
Figura 26 - Fotografias dos halos necróticos da pele do dorso de camundongos.



Fotografias do tecido epitelial de camundongos mostrando o halo necrótico produzido pelo vBju e o bloqueio pelos tratamentos com o EBf e SAB. A: salina; B: EBf; C: vBju; D: Pré-tratamento i.p.; E: Pré-tratamento v. o.; F: Pré-incubado; G: Pós-tratamento i.p.; H: Pós-tratamento v.o.; I: SAB.

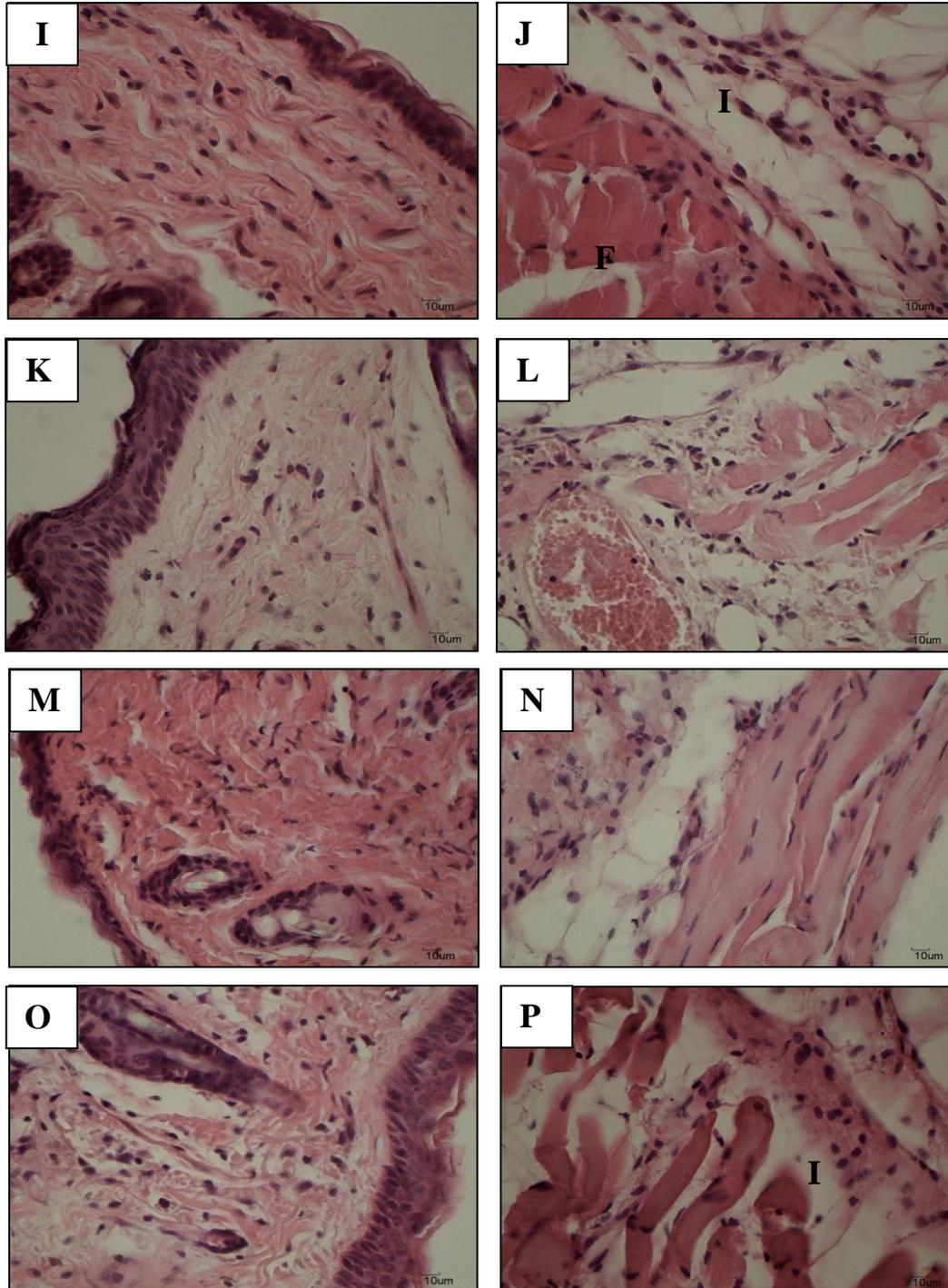
No laudo histopatológico (figuras 27 e 28), os controles tratados com salina e tratados somente com o EBf não apresentaram alterações. No grupo veneno encontrou-se epiderme e derme com mínima exsudação de polimorfonucleares, subcutâneo com exsudação mais rica e músculo com células musculares mortas (necrose) e células de inflamação mista (granulócitos, neutrófilos e linfomononucleares). No grupo pré-incubado encontrou-se acúmulo de infiltrado nos tecidos subcutâneo e muscular, região de destruição da epiderme necrótica e Intensa infiltração de células granulocitárias e neutrófilos. No grupo SAB encontrou-se moderado infiltrado de células inflamatórias e necrose das fibras musculares. Nos demais grupos tratados com EBf encontrou-se leve infiltrado de células inflamatórias.

Figura 27 - Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.



Derme e epiderme (A, C, E, G) e subcutâneo e tecido muscular (B, D, F, H) após 72 horas de administração i.d de 50 μL de vBju. A e B: vBju (50 μg / 50 μL); C e D: controle com Ebf; E e F: Soro antitetrápico; G e H: Pré-tratamento i.p. com Ebf (150 mg/kg). Aumento 400X. **I**: infiltrado inflamatório, **D**: fibras em degeneração, **F**: fibras musculares normais. Coloração HE.

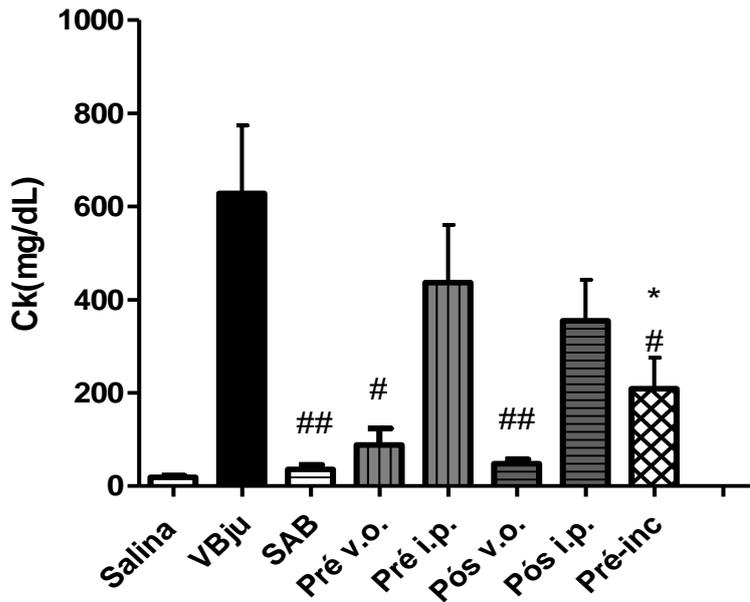
Figura 28 - Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de pele de camundongo Swiss.



Derme e epiderme (I, K, M, O) e subcutâneo e tecido muscular (J, L, N, P) após 72 horas de administração i.d de 50 μL de vBju. I e J: Pré-tratamento v.o. com EBf (150 mg/kg); K e L: Pré-incubado (vBju + EBf, 15 min, 37°C); M e N: Pós-tratamento i.p. com EBf (150 mg/kg); O e P: Pós-tratamento v.o. com EBf. Aumento 400X. **I**: infiltrado inflamatório, **F**: fibras musculares normais. Coloração HE.

5.9 Avaliação da Atividade Miotóxica do vBju e bloqueio pelo EBf.

Figura 29 - Gráfico da atividade de creatina quinase (CK) em mg/dL e mostra a atividade antimiotóxica do EBf.

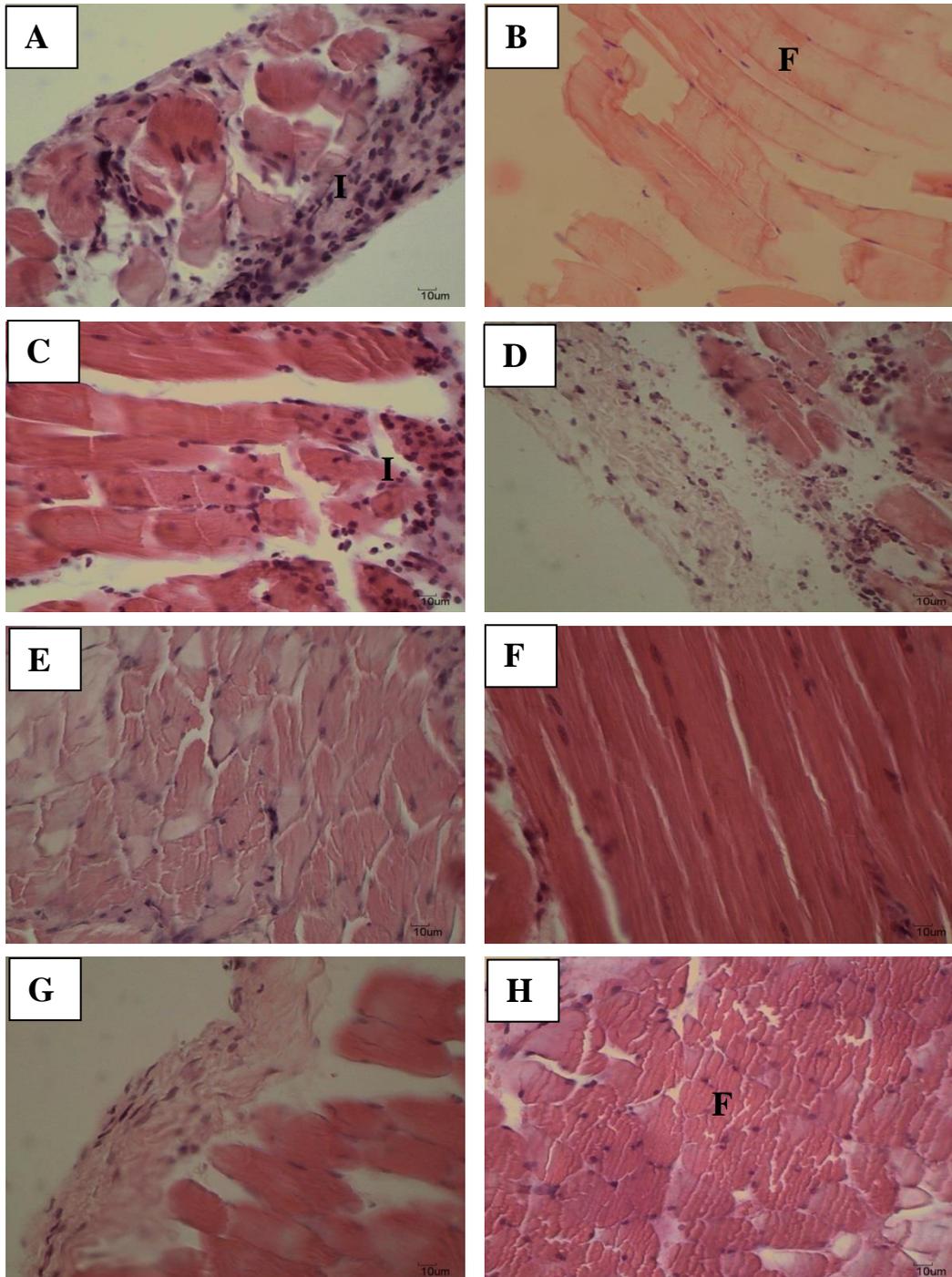


Os valores da figura representam a inibição da atividade miotóxica do vBju pelo EBf. Atividade da creatina quinase (CK) plasmática é mostrada em mg/dL nos grupos representados por Veneno de *Bothrops jararacussu* (vBju), Soro anti botrópico (SAB), Extrato de *B. floribunda*(EBf), Pré-tratamento v.o.(Pré v.o), Pré-tratamento i.p.(Pré); Pós-tratamento v.o.(Pós v.o), Pós-tratamento i.p. (Pós i.p)e Pré-incubado(Pré-Incubado). Resultados expressos como média \pm S.E.M. com nível de significância de $\#P < 0,05$ vs Bju e $*P < 0,05$ vs salina.

A atividade miotóxica do veneno ($628,31 \pm 145,6$ mg/dL) foi bloqueada significativamente nos grupos SAB ($36 \pm 9,63$ mg/dL), pré-tratamento v. o. ($88 \pm 35,87$ mg/dL), pós-tratamento v.o. ($48,0 \pm 8,76$ mg/dL) e no grupo pré-incubado ($208,73 \pm 66,71$ mg/dL). Os grupos pré e pós-tratado i.p. apresentaram uma diminuição da atividade, mas não é considerada significativa.

No laudo histopatológico (figura 30), os controles tratados com salina não apresentaram alterações. No grupo veneno encontrou-se processo inflamatório intenso quase purulento com exsudato granulocitário e morte de músculo somático. Nos grupos tratados, soro antibotrópico, pré e pós-tratado com EBf i.p. e v.o. verificou-se a presença de leve infiltrado inflamatório agudo.

Figura 30 - Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 μm de espessura de músculo de camundongo Swiss.



Tecido muscular após 2 horas de administração i.m. de 50 μL de vBju. A: vBju; B: PBS; C: Soro Antibotrópico; D: grupo pré-tratado i.p. com EBf, 150 mg/Kg (30 min antes do vBju); E: grupo pré-tratado v.o. com EBf, 150 mg/Kg (30 min antes do vBju); F: Pré-incubado (EBf:vBju, 15 min, 37°C); G: pós-tratado i.p. com EBf, 150 mg/Kg (30 min depois do vBju); pós-tratado v.o. com EBf, 150 mg/Kg (30 min depois do vBju). Aumento 400X. I: infiltrado inflamatório, F: fibras musculares normais. Coloração HE.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os acidentes com serpentes peçonhentas envolvem eventos complexos e dependentes da combinação de componentes do veneno, tais como fosfolipases A₂ (PLA₂), miotoxinas, metaloproteases, entre outras enzimas proteolíticas que interagem com múltiplos componentes do corpo e afetam a hemostasia. Venenos de serpentes do gênero *Bothrops* causam dano tecidual local como edema, hemorragia, mionecrose e dermonecrose, o que pode culminar em incapacidade permanente das vítimas (HAVT *et al.*, 2001; JANUÁRIO *et al.*, 2004; PIDDE-QUEIROZ *et al.*, 2013).

Vários estudos mostram alternativas para os danos locais provocados por envenenamentos. Estudos de Rucavado *et al.* (2008) relataram inibição de efeitos locais do veneno de *Bothrops asper* e demonstraram que a tetraciclina e a doxiciclina inibiram as atividades proteolítica e hemorrágica desse veneno, embora tenham sido usadas altas concentrações dos antimicrobianos.

Estudo realizado por Pereira *et al.* (1996) mostrou que uma saponina isolada da raiz de *B. Floribunda* Willd., o Bredemeyerosídeo D, tem significativa atividade antiofídica em camundongos, tornando relevante o desenvolvimento de mais estudos relacionados a propriedade antiofídica desse extrato.

Extratos de plantas usados popularmente no tratamento de envenenamentos ofídicos têm se mostrado uma boa alternativa a soroterapia tradicional, uma vez que antivenenos não neutralizam de modo eficaz os danos locais promovidos pelo veneno (BORGES *et al.*, 2000, PEREIRA *et al.*, 2009).

Muitas plantas usadas popularmente como medicamentos podem ser tóxicas dependendo da dose utilizada. Por essa razão, determinar o nível de toxicidade aguda de uma planta ou extrato é importante para tornar seu uso seguro (MARIZ *et al.*, 2006).

O teste de DL50 foi realizado pela primeira vez por Trevan em 1927, a fim de avaliar substâncias testes para uso humano, tais como digitálicos e insulina. Na década de 70, o teste para avaliar a dose letal de uma substância submetia até 100 animais a dose teste, sendo a dose letal capaz de matar 50% desses animais. Em 1981, a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) estabeleceu que em estudos de toxicidade oral aguda seriam usados apenas 5 animais por sexo para cada dose, utilizando-se 3 doses para cada produto. Posteriormente foi aprovada a OECD 420, na qual a dose limite de toxicidade aguda seria de 2000mg/kg e, além do percentual de mortes, também são avaliados os sinais de toxicidade (BOTHAM, 2004).

Craveiro *et al.* (2008) demonstrou experimentalmente razoável atoxicidade do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais submetidos a dose teste de 5000 mg/kg, seguindo o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nenhum animal veio a óbito e nenhum sinal de toxicidade foi detectado nas observações comportamentais ou nas autópsias dos animais.

Outro estudo realizado por Barros *et al.* (2005) mostrou no teste de dose limite que a dose oral única de 1, 2 e 5 g / kg do extrato hidroalcoólico liofilizado da raiz de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. foi incapaz de induzir efeitos tóxicos ou mortalidade em ratos ou camundongos, indicando a baixa toxicidade e ausência de atividade mutagênica desse extrato.

No teste de dose limite do extrato aquoso das raízes de *B. Floribunda* não houve óbitos, os animais apresentaram leve sonolência. Na autópsia dos animais e no exame histopatológico dos órgãos não foram encontradas alterações. A DL50 do EBF é maior do que a dose teste (2000 mg/kg), indicando que o extrato apresenta baixa toxicidade aguda.

Recentemente, pesquisadores sugerem a realização de experimentos com células como alternativa para evitar o uso de animais (NALBANTSOY *et al.*, 2013). Os resultados *in vitro* obtidos com cultura de células RAW 264.7 mostraram que o veneno tem citotoxicidade em cultura de células de macrófagos murinos, diminuindo a viabilidade celular em doses mais altas. O extrato de *B. floribunda* mostrou aumento da viabilidade e proliferação das células, mostrando sua baixa toxicidade, corroborando com o resultado obtido no teste de toxicidade aguda do extrato. No entanto, no pós-tratamento das células com o EBF houve aumento de citotoxicidade, o que não acontece com o pré-tratamento.

Venenos de serpentes da família Viperidae contém uma fração protéica formada por enzimas: serino proteases; metaloproteases zinco-dependentes; L-aminoácido oxidase e isoenzimas fosfolipases A₂ do grupo II; e por proteínas sem atividade enzimática: lectinas tipo C, miotoxinas, desintegrinas, inibidores Kunitz-like, fatores de crescimento e proteínas secretoras ricas em cisteína (SPINO-SOLIS *et al.*, 2009). Dentre essas enzimas hidrolíticas encontradas em venenos botrópicos, as PLA₂s e metaloproteases dependentes de zinco representam as principais responsáveis pela fisiopatologia do envenenamento (CAVALCANTE *et al.*, 2007; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

Muitas PLA₂s básicas tem sido isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e caracterizadas estrutural e funcionalmente. No entanto, isoformas básicas parecem ter adquirido a maior toxicidade, especialmente no caso de enzimas neurotóxicas e

miotóxicas. Duas fosfolipases A₂ básicas nomeadas bothropstoxina-I (BthTX-I, Lys49), cataliticamente inativa e II (BthTX-II, Asp49), com baixa atividade catalítica foram isoladas do veneno de *B. jararacussu* e caracterizadas, e são responsáveis pela indução de edema, hipotensão, inibição da agregação plaquetária, hemorragia e mionecrose (TAKEDA *et al.*, 2004; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

Borges *et al.* (2000) em estudos realizados com extrato aquoso de *Casearia sylvestris*, planta conhecida popularmente como Guaçatonga, encontrou capacidade do extrato em inibir atividade de fosfolipase A₂ relacionada a atividade de venenos de serpentes, além de inibir atividade miotóxica de venenos botrópicos, anticoagulante e reduzir parcialmente a atividade indutora de edema dos venenos de *B. moojeni* e *B. jararacussu*, bem como de miotoxinas MjTX-II e BthTX-I.

A atividade fosfolipásica induzida pelo veneno total de *Bothrops jararacussu* (vBju) sobre 4N3OBA como substrato cromogênico foi significativamente neutralizada *in vitro* pelo extrato de *Bredemeyera floribunda* (EBf) nas razões de 1:1, 1:2 e 1:3 (vBju:EBf), a absorvância foi medida em intervalos de 10 min durante 40 minutos.

Um das principais alterações locais do envenenamento por *B. jararacussu* é a formação de edema e inflamação local que envolve células brancas do sangue e citocinas, no entanto, o mecanismo ainda não está bem elucidado. Drogas, como a dexametasona, são testadas experimentalmente a fim de se verificar se há diminuição da resposta inflamatória induzida por venenos (PATRÃO-NETO, 2012).

As reações inflamatórias locais provocadas por serpentes das famílias Viperidae e Crotalinae são devidas, principalmente, a ação das fosfolipases A₂, metaloproteases e serino proteases, as quais podem agir em conjunto e desencadear o processo inflamatório (NUNES *et al.*, 2011).

As figuras 16 e 17 mostram a atividade edematogênica do veneno de *B. jararacussu* e bloqueio pelo extrato de *B. floribunda* quando administrado por via intraperitoneal no pré e pós-tratamento, tendo um melhor resultado no pré-tratamento. O extrato pré-incubado com o veneno também apresentou uma inibição da atividade do veneno. Quando administrado por via oral, o extrato não apresentou bloqueio da ação do veneno, como também, não apresentou aumento significativo da ação deste. Pode-se sugerir que algum metabólito ativo responsável pela ação do extrato é metabolizado no trato gastrointestinal e não é absorvido, contrário do que acontece por via i.p., a qual apresenta um bloqueio do efeito do veneno. O grupo que recebeu soro antiofídico também apresentou uma queda da atividade edematogênica, mas quando comparado aos grupos que receberam

EBf por via i.p., estes últimos apresentaram resultados mais significativos. Na análise histológica observou-se que a inflamação, edema e presença de células inflamatórias é diminuída com o uso do EBf, principalmente no pré-tratamento i.p., confirmando os resultados obtidos.

As PLA₂ isoladas de venenos botrópicos são frequentemente miotóxicas e podem causar edema, sendo este mediado em graus diferentes por aminas (histamina e serotonina) liberados por mastócitos degranuladores (BARBOSA *et al.*, 2003). Esses resultados podem ser atribuídos à ligação de algum componente do extrato, como, por exemplo, as saponinas triterpênicas, seus principais constituintes, a componentes do veneno como as fosfolipases A₂ e seus homólogos, bloqueando parcialmente a ação destas e evitando a resposta inflamatória (BEVENINO *et al.*, 1994; SCHENKEL *et al.*, 2001). Estudos relacionam a inibição de fosfolipases A₂ de venenos de serpentes por compostos naturais à ligação desta enzima a flavonoides presentes nessas plantas. O extrato de *Bredemeyera floribunda* contém flavonoides, o que pode explicar a ação verificada. Os flavonoides usualmente exercem seu efeito inibitório via interações hidrofóbicas com os anéis A e B e aromáticos presentes em sua estrutura ou resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na proteína (CARVALHO *et al.*, 2013).

Extratos vegetais contêm uma grande diversidade de compostos químicos que têm vários efeitos farmacológicos. Estudos descrevem que a eficácia de extratos é maior do que de componentes isolados, devido, provavelmente ao sinergismo dos constituintes do extrato. Extratos ricos em proantocianidinas, saponinas triterpenóides, polissacarídeos e cumarinas são inibidores potentes de metaloproteinases de veneno botrópico. Flavonóides, por outro lado, têm sido relacionados às ações antiinflamatória, antiulcerosa, anti-hipertensiva e muitas outras atividades. Atribui-se essa atividade a inibição de fosfolipases A₂, um importante componente dos venenos de serpentes (NISHIJIMA, 2009).

As saponinas triterpênicas do EBf podem estar neutralizando tanto a Bth TX-I (Lys-49) que é responsável por formação de edema, degranulação mastocitária, bloqueio irreversível da contração muscular, ruptura de lipossomos, e citotoxicidade sobre músculo e células endoteliais; quanto a Bth TX-II (Asp-49) relacionada à indução de edema e migração leucocitária (PEREIRA *et al.*, 2009).

Estudo realizado por Pereira *et al.* (2009), mostrou que o extrato etanólico de *Blutaparon portulacoides* diminuiu consideravelmente edema de pata induzido pelo veneno de *B. jararacussu*, apresentando efeito anti-inflamatório pela possível inibição de miotoxinas isoladas do veneno, ação em que BThTX-I e II podem ter participação.

Oliveira *et al.* (2009) investigou o efeito antiinflamatório do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl., conhecida popularmente como “crajiru”, sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, em camundongos, mostrando que o extrato teve atividade inibitória sobre os efeitos inflamatórios do venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*.

A fim de verificar a atividade anti-inflamatória do extrato de *B. floribunda*, realizou-se experimentos com uma substância já conhecidamente edematogênica, a carragenina. Esse modelo é bastante utilizado para investigar a patofisiologia da inflamação aguda e para avaliar os efeitos anti-inflamatórios dos compostos como medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (NUNES *et al.*, 2007).

A injeção intraplantar de carragenina produz inflamação aguda caracterizada por aumento de água nos tecidos, exsudação de proteínas plasmáticas com extravasamento de neutrófilos e o metabolismo do ácido araquidônico pelas vias da ciclooxigenase e lipoxigenase. O pico edematogênico máximo da carragenina situa-se ao redor de 3 horas e envolve também a síntese e liberação de mediadores que incluem prostaglandinas, histamina, bradicininas, leucotrienos e serotonina (ZHANG *et al.*, 2008).

O extrato de *B. floribunda* bloqueou a ação da carragenina de modo tão efetivo quanto a indometacina (figuras 18 e 19, tabela 5), usada como controle positivo. A resposta inflamatória é conhecidamente dividida em três fases: vasodilatação e aumento do fluxo vascular, aumento da permeabilidade vascular, e a migração de leucócitos para os tecidos nos quais ocorreu a lesão. A histamina e 5-HT são geralmente responsáveis por induzir a resposta imediata da inflamação em ratos enquanto as cininas e prostaglandinas são responsáveis por mediar as respostas posteriores (ANTÔNIO e BRITO, 1998). O extrato de *B. floribunda* pode estar agindo bloqueando mediadores inflamatórios, evitando assim, a formação de edema e da resposta inflamatória, neutralizando a resposta provavelmente mediada por histamina, cininas e serotonina que estão envolvidas no dano inflamatório mediada por carragenina.

O EBF mostrou neutralização das atividades proteolítica do vBju. A figura 11 mostra a inibição da atividade proteolítica do vBju pelo EBF *in vitro* utilizando DL-BApNA como substrato, nas razão de 1:1, 1:2 e 1:3 (vBju:EBF).

A atividade anti-hemorrágica do extrato de *B. floribunda* contra o vBju pode ser visualizada na figura 21. Observa-se diminuição significativa da extensão da área hemorrágica induzida pelo vBju através do tratamento com o extrato de *B. floribunda* nos grupos pré-incubado, pré-tratado i.p. e pós-tratado i.p. O laudo histopatológico mostrou alterações no grupos vBju com fibras musculares e presença de infiltrado inflamatório nos

tecidos subcutâneo e muscular e leves alterações nos grupos tratados com o EBF, derme ligeiramente edematosa, leve infiltrado inflamatório.

Na atividade necrosante, o EBF também bloqueou a ação do veneno nos grupos pós-tratamento v.o., pós-tratamento i.p., sendo de modo mais significativo, no pré-tratamento i.p. como mostrado na figura 25. O controle positivo realizado com SAB não mostrou diminuição significativa das áreas hemorrágica e necrosante. A análise histológica demonstrou diminuição da necrose e do infiltrado de células inflamatórias nos grupos tratados com o extrato, exceto no grupo pré-incubado.

A patogênese da hemorragia induzida por venenos envolve dano direto nos microvasos, realizado por toxinas hemorrágicas. Toxinas responsáveis pelo efeito hemorrágico de venenos de serpentes são as metaloproteases zinco-dependentes, estando o efeito hemorrágico ligado à atividade proteolítica dessas enzimas. O mecanismo de ação dessas enzimas tem sido investigado, sabendo-se que a hidrólise de componentes da membrana basal é a chave do processo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

A atividade proteolítica nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* está relacionada à patogênese local e a reações sistêmicas. Serinoproteases, enzima presente no veneno de serpentes, afetam o sistema hemostático e têm ação sobre uma variedade de componentes da cascata de coagulação, no sistema fibrinolítico e cinina-caliceína, causando um desequilíbrio do sistema hemostático. Outro grupo de enzimas importante são as metaloproteases, que exercem, principalmente, ação hemorrágica através da degradação de proteínas da membrana basal endotelial, tais como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e os proteoglicanos. Proteínas de coagulação do sangue, tais como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand são também alvos da sua atividade proteolítica. Além disso, as metaloproteases também podem inibir a agregação plaquetária e desencadear a liberação de citocinas. Estes dois efeitos associados à digestão proteolítica da membrana basal, são citados como o principal mecanismo de hemorragia induzida por metaloproteases (QUEIROZ, 2008).

Pterocarpanos prenilados, denominados cabenegrinas A-I e A-II, isolados de *Harpalyce brasiliensis*, uma planta usada popularmente na região Nordeste do Brasil conhecida como raiz-de-cobra e usada contra picadas de serpentes mostrou atividade antimiotóxica, antiproteolítica e inibiu propriedades de PLA₂ (DA SILVA *et al.*, 2004; XIMENES, 2009).

Estudo realizado por Jorge (2011) demonstrou que alcalóides isolados de *Solanum campaniforme* promoveram inibição significativa das atividades proteolíticas *in vitro*, reduziram efeitos miotóxicos, hemorrágicos e necrosante resultantes da ação do veneno total de *B. pauloensis* em camundongos.

No presente estudo, as saponinas triterpênicas ou outro constituinte do EBf, podem ter agido quelando as ligações de zinco das metaloproteases, ou se ligando a componentes da membrana basal, inviabilizando a ação dessas enzimas e inibindo, assim, as ações hemorrágica, proteolítica e necrosante do veneno.

Os resultados obtidos com a dosagem de CK (creatinaquinase) sérica (figura 29), enzima presente nos músculos esqueléticos, quando esses se encontram comprometidos esta enzima extravasa e é encontrada no plasma, sendo um bom marcador de lesão muscular, demonstraram que o vBju desencadeia forte ação miotóxica, ação esta citada para o veneno desta espécie, relacionada a ação da PLA₂ Lys 49 (GUTIÉRREZ *et al*, 2008). No entanto o tratamento v.o. com o extrato da planta estudada, conseguiu reduzir esse efeito, isso provavelmente atribuído a ação de compostos presentes na planta, como flavonoides ou saponinas, que bloqueiam a ação de miotoxinas presentes no veneno de *B. jararacussu* como as fosfolipases BthTx-I e II (BIONDO, 2003).

Veronese *et al.* mostrou a inibição da atividade miotóxica de *Bothrops jararacussu* e suas miotoxinas BthTX-I e II pelo extrato aquoso de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., sendo que a atividade miotóxica de venenos botrópicos se dá devido principalmente a esses dois homólogos de fosfolipase A₂, BthTX-I e II, que compõem de 40-50% do veneno total. BthTX-I não apresenta atividade catalítica sobre substratos artificiais, enquanto a BthTX-II é uma toxina com atividade fosfolipásica que exerce relativa ação sobre células musculares, sendo responsável por um quadro de degeneração intensa.

O estudo Veronese *et al.* mostra a possível neutralização da ação local do veneno de *B. jararacussu*, pois o extrato deve conter substâncias que neutralizam as ações do veneno. Hemorraginas e fosfolipases são enzimas que precisam de um íon metálico bivalente para promover uma ação inibitória, então, no extrato deve haver compostos que se ligam a esses íons, inviabilizando a ação dessas enzimas. Outra explicação seria que compostos do extrato podem ocupar sítios nas toxinas, evitando a ligação dos substratos às enzimas, sendo estas interações covalentes ou não covalentes (BIONDO, 2003).

Entretanto, o estudo com outras doses do extrato de *B. floribunda* e suas substâncias isoladas, como também, com frações isoladas do veneno de *B. jararacussu* responsáveis pelas alterações locais, serão necessários para esclarecer como se dá o mecanismo inibitório.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O extrato aquoso de *Bredemeyera floribunda* não apresentou toxicidade aguda em camundongos e nem em células RAW 264.7. Mostrou ainda, inibição das atividades fosfolipásica e proteolítica, e inibição das atividades edematogênica provocadas pelo veneno e por carragenina. As atividades hemorrágica, necrosante e miotóxica promovidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos também foram bloqueadas pelo extrato, sendo o pré-tratamento i.p. mais efetivo, corroborando com o uso profilático popular.

Evidencia-se através deste estudo a atividade antiofídica do extrato da EBF relacionado principalmente aos efeitos locais, contudo faz-se necessário aprofundar os estudos iniciados e especificar ainda mais os mecanismos pelo quais esta planta atua.

REFERÊNCIAS

- ANTÔNIO, M. A.; BRITO, A. R. M. S. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of **Turnera ulmifolia** (Turneraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 3, p: 215-228, 1998.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; JACINTO, C. N.; JUNIOR, G. B. S.; LIMA, J. B.; VERAS, M. S. B.; DAHER, E. F. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTEB, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A₂ in Bothrops snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755–763, 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; CORREA, F. M. A.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p. 723-732, 2002.
- ARAÚJO, H. P.; BOURGUIGNON, S.C.; BOLLER, M. A. A.; DIAS, A. A. S. O.; LUCAS, E. P. R.; SANTOS, I. C.; DELGADO, I. F. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, p. 502–514, 2008.
- BARBOSA, A. M.; AMARAL, R. O.; TEIXEIRA, C. F. P.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515–523, 2003.
- BARBOSA, A. M.; VILLAVERDE, A. B.; GUIMARÃES-SOUZA, L.; RIBEIRO, W.; ZAMUNER, S. R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p.1236–1244, 2008.
- BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.;

BARROS, S. B. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, 2005.

BEVENINO, L. H.; AIRES, M. M. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* Willd. II. Effect on glomerular filtration rate and renal tubular function of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p.203-207, 1994.

BEVENINO, L. H.; VIEIRA, F. S. A.; CASSOLA, A. C.; SANIOTO, S. M. L. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* Willd. I. Effect on arterial blood pressure and renal excretion in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 197-201, 1994.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRILHO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, 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. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, n. 1, p. 21-31, 2000.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.227–230, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos: serpentes**. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarTexto&codConteudo=5817&codModuloArea=783&chamada=acidentes-por-serpentes>>. Acesso em: 27 nov. 2013.

BURIN, S. M.; AYRES, L. R.; NEVES, R. P.; AMBROSIO, L.; MORAIS, F. R. de; DIAS-BARUFFI, M.; PEREIRA-CROFT, L. S.; CASTRO, F. A. L-Amino Acid Oxidase Isolated from *Bothrops pirajai* induces apoptosis in BCR-ABL-Positive Cells and potentiates Imatinib Mesylate effect. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.113, p.103-112, 2013.

CAMPOS, L. B.; PUCCA, M. B.; RONCOLATO, E. C.; BERTOLINI, T. B.; NETTO, J. C.; BARBOSA, J. E. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian **Bothrops** spp. Venoms. **Toxicon**, v. 76, 15, p. 1-10, 2013.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, S. A.; HADDAD, V. J. **Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Editora Savier, 2003.

CARON, E. J.; MANOCK, S. R.; MAUDLIN, J.; KOLESKI, J.; THEAKSTON, R. D. G.; WARREL, D. A.; SMALLIGAN, R. D. Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: Was it prophylaxis or method of administration? **Toxicon**, v. 54, p.779–783, 2009.

CARVALHO, B. M. A.; SANTOS, J. D. L.; XAVIER, B. M.; ALMEIDA, J. R.; RESENDE, L. M.; MARTINS, W.; MARCUSSI, S.; MARANGONI, S.; STÁBELI, R. G.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; SILVA, D. L. da; MARCHI-SALVADOR, D. P. Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 490–497, 2007.

CHENG, K.; ZHANG, P.; LIU, J.; XIE, J.; SUN, H. Practical Synthesis of Bredemolic Acid, a Natural Inhibitor of Glycogen Phosphorylase. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p.1877–1880, 2008.

COTRIM, C.A.; DE OLIVEIRA, S.C.; DIZ FILHO, E.B.; FONSECA, F.V.; JR. BALDISSERA, L. ; ANTUNES, E.; XIMENES, R.M.; MONTEIRO, H.S.; RABELLO, M.M.; HERNANDES, M.Z.; DE OLIVEIRA, T. D.; TOYAMA, M.H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂.**Chemico-Biological Interactions**, v.189, n. 1-2, p.9-16, 2011.

CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S. A.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, Supl., p. 739-743, 2008.

CRUZ, L. S, VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in developing world. **Ethnicity and Disease**, v. 19, n. 1, Suppl, 1, p. 42- 46, 2009.

DA SILVA, A. J. M.; COELHO, A. L.; SIMAS, A. B. C.; MORAES, R. A. M.; PINHEIRO, D. A.; FERNANDES F. F. A.; ARRUDA, E. Z.; COSTA, P. R. R.; MELO, P. A. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated against snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 2, p. 431-435, 2004.

DOMINGOS, T. F. S.; MOURA, L. de A.; CARVALHO, C.; CAMPOS, V. R.; JORDÃO, A. K.; CUNHA, A. C.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. de; SANCHEZ, E. F.; FULY, A. L. Antivenom Effects of 1,2,3-Triazoles against *Bothrops jararaca* and *Lachesis muta* Snakes, v. 2013, 7p.; 2013.

DOS SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R. C.; FORTES-DIAZ, C. L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F. D. A eficácia do antiveneno botrópico-cortálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 77-83, 1992.

DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z.; FERRAZ, S. O.; SOUSA, O. V.; PIMENTA, D. S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V.16, n.4, p.469-474, 2006.

ERLANGER, B.P.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p.271-278, 1961.

ESMERALDINO, L.E.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v.12, n.8, p. 570-576, 2005.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIANO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

- FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE B. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **An International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 3, p. 273-283, 2010.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, v. 7, 2006.
- GUIMARÃES, A. Q.; CRUZ-HOFLING, M. A.; ARAÚJO, P. M. F.; BOM, C.; ARAÚJO, A. L. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm. res.** v. 53, p. 284–291, 2004.
- GULACSLIA, K.; LITKEIA, G.; ANTUS, S.; SZANTAYB, C.; DARKOC, L. L.; SZELENYID, J.; HASKOD, G. Synthesis and Biological Activity of the Structural Analogues of (–)-Cabenegrin A-I. **Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.**, v.334, p.53-61, 2001.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, n. 45, p.997–1011, 2005.
- GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v.51, n. 1, p.80-92, 2008.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.54, n.7, p.958-975, 2009.
- HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, p. 1841- 1846, 2001.
- JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. R. L.; 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. **Chemico-Biological Interactions**, v.150, p.243–251, 2004.

JORGE, R.J.B. **Inibição dos efeitos locais do veneno de *Bothrops pauloensis* por alcalóides esteroidais de *Solanum campaniforme* Roem. & Schult. (Solanaceae)**. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

LEITE, R. S.; TARGINO, I. T. G.; LOPES, Y. A. C. F.; BARROS, R. M.; VIEIRA, A. A. Epidemiology of snakebite accidents in the municipalities of the state of Paraíba, Brazil. *Ciênc. saúde coletiva.*, v.18, n.5, p.1463-71, 2013.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J. Neurochem**, v. 69, p. 581-593, 1997.

MANDAL, S. C.; LAKSHMI, S. M.; KUMAR, C. K. A.; SUR, T. K.; BOOMINATHA, R. Evaluation of Anti-inflammatory Potential of *Pavetta indica* Linn. Leaf Extract (Family: Rubiaceae) in Rats. **Phytother. Res.**, v.17, p.817 – 820, 2003.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16(3), p.372-378, 2006.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2007. v. 1. 394 p.

MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STÁBELI, R. G.; FRANCO, J. J.; TICLI, F. K.; CINTRA, A. C. O.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, P.215–223, 2004.

MEBS, D. Notes on the traditional use of plants to treat snake bite in northern Papua New Guinea. **Toxicon**, 38, p. 299-302, 2000.

MELO, M. M.; LÚCIA, M.; HABERMEHL, G. G. Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, p. 29-

34, 2007.

MENEZES, R. R. P. P. B. **ESTUDO DOS EFEITOS DO VENENO DA SERPENTE *Bothropoides insularis* SOBRE CÉLULAS RAW 264.7 *in vitro***. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MILANI, R.; JORGE, M. T.; CAMPOS F. P. F.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L. C.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S.; SANO MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; FERNANDES, I. D. O. F.; FERNANDES, J. C.; ALDRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Snake bites by Jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo, Brazil. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 90, p. 323-334, 1997.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAGAWA, M., K.; NAKANISHI, L.L.; Darko & J.A. Vick. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n.38, p.3855-3858, 1982.

NALBANTSOY, A.; EREL, S. B; KOKSAL, Ç.; GOÇMEN, B.; YILDIZ, M. Z.; YAVASOGLU, N. U. K. Viper venom induced inflammation with **Montivipera xanthina** (Gray, 1849) and the anti-snake venom activities of *Artemisia absinthium* L. in rat. **Toxicon**, v. 65, p: 34-40, 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES. Department of Health and Human Services. **The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals**. Washington, 2001. (NIH Publication n. 02-4501).

NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; FERREIRA, M. L.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. Anti-hemorrhagic Activity of Four Brazilian Vegetable Species Against *Bothrops jararaca* Venom. **Molecules**, v. 14., p: 1072-1080, 2009.

NUNES, F. P. B.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v.49, n. 8, p:1090-1098, 2007.

NUNES, D. C. O.; RODRIGUES, R. S.; LUCENA, M. N.; COLOGNA, C. T.; OLIVEIRA, A. C. S.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBRUGO, M. I.; ARANTES, E. C.; TEIXEIRA, D. N. S.; UEIRA-VIEIRA, C.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from **Bothrops leucurus** snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 154, n. 3, p:226-233, 2011.

OLIVEIRA, D. P. C.; BORRÁS, M. R. L.; FERREIRA, L. C. L.; LÓPEZ-LOZANO, J. L. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 643-649, 2009.

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

OTERO, R.; Nuñez, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R.G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, 73, p. 233-241, 2000.

PATRÃO-NETO, F. C.; TOMAZ, M. A.; STRAUCH, M. A.; MACHADO, M. M.; ROCHA-JUNIOR, J. R. da S.; BORGES, P. A.; ELIAS, S. C.; MELO, P. A. Dexamethasone antagonizes the **in vivo** myotoxic and inflammatory effects of **Bothrops** venoms. **Toxicon**, v. 69, p: 55-64, 2012.

PEREIRA, N. A.; PEREIRA, B. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. IV. Proction against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 60, p. 99-100, 1994.

PEREIRA, B. M. R.; DAROS, M. R.; PARENTE, J. P.; MATOS, F. J. A. Bredemeyeroside D, a Novel Triterpenoid Saponin from *Bredemeyera floribunda*: A Potent Snake Venom Antidote Activity on Mice. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 666-669, 1996.

PEREIRA, I. C.; BARBOSA, A. M.; SALVADOR, M. J.; SOARES, A. M.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Anti-inflammatory activity of *Blutaparoon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins BthTX-I and II. **Journal of Venom and Animal Toxins including Tropical Diseases**, v.15, n.3, p.527-545, 2009.

PIDDE-QUEIROZ, G.; MAGNOLI, F. C.; PORTARO, F. C. V.; SERRANO, S. M. T.; LOPES, A. S.; LEME, A. F. P.; BERG, C. W. van den; TAMBOURGI, D. V. P-I Snake Venom Metalloproteinase Is Able to Activate the Complement System by Direct Cleavage of Central Components of the Cascade. **PLoS Negl Trop Dis.**, v7, n.10: e2519, 2013.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.50, n. 1, 2004.

PITHAYANUKUL, P.; RUENRAROENGSAK, P.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R.; SAEN-OON, S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plants polyphenols. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 527-533, 2005.

PONCE-SOTO, L.A.; BONFIM, V.L.; NOVELLO, J.C.; NAVARRO OVIEDO, R.; YARLEQUÉ CHOCAS, A.; MARANGONI, S. Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. **The Protein Journal**, v. 26, n.6, p.387-394, 2007.

RUCAVADO, A.; HENRIQUEZ, M.; GARCIA, J.; GUTIERREZ, J. M. Assessment of metalloproteinase inhibitors clodronate and doxycycline in the neutralization of hemorrhage and coagulopathy induced by **Bothrops asper** snake venom. **Toxicon**, v.52, n. 7, p. 754–759, 2008.

SALAZAR, A. M.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; GIRO, M. E.; AGUILAR, I.; GUERRERO, B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 95-104, 2007.

- SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, L. L.; GIGLIO, J. R.; RECHIA, C. G. V.; FULY, A. L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; FRANCO, J. J.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. B. B. JussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.151, p. 443–454, 2008.
- SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. G.; WARREL, D. A.; BIASI, G. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap.27, p.597-619.
- SERRANO, S. M. T.; SHANNON, J. D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C. M.; FOX, J. W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, p. 501–510, 2005.
- SILVA, A. J. M.; COELHO, A. L.; SIMAS, A. B. C.; MORAES, R. A. M.; PINHEIRO, D. A.; FERNANDES, 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. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p.431–4, 2004.
- SILVEIRA, E. R.; FALCÃO, M. J. C.; MENEZES JR., A.; KINGSTON, D. G. I.; GLASS, T. E. Penta-oxygenated xanthenes from *Bredemeyera floribunda*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1433-1436, 1995.
- 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. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 2625-2641, 2005.
- TAKEDA, A. A. S.; SANTOS, J. I.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A₂ complexed with p-bromophenacyl bromide and α -tocopherol

inhibitors at 1.9- and 1.45-Å resolution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1699, p. 281–284, 2004.

VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; TROMBONE, A. P. F.; SANTANA, A. E.; BECHARA, G. H.; KETTRLHUT, I.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

VINUCHAKKARAVARTHY, T.; KUMARAVEL, K. P.; RAVICHANDRAN, S.; VELMURUGAN, D. **Bioinformation**, v. 7, n. 4, p. 199-206, 2011.

XIMENES, R. M. **Avaliação da atividade da cabenegrina A-II frente às alterações bioquímicas e hematológicas e aos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos**. 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

XIMENES, R. M.; ALVES, R. S.; PEREIRA, T. P.; ARAÚJO, R. M.; SILVEIRA, E. R. S.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; SOARES, V. C. G.; BRISTOT, D.; PIRES, C. L.; TOYAMA, D. O.; GAETA, H. H.; MONTEIRO, H. S.; TOYAMA, M. H. Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* venom. **BMC Complement Altern Med.**, v.12, n 139, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed, Munique: Springer, 1996.

WARRELL, D. A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes, **British Medical Journal**, v. 26, n. 331, p. 1244-1247, 2005.

WEI, JI-FU; WEI, XIAO-LONG; MO, YA-ZHEN; YANG, H.; HE, S. Induction of Mast-Cell Accumulation by Promutoxin, an Arg-49 Phospholipase A₂. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

YAMASHITA, K. M.; NOGUEIRA, T. O.; SENISE, L. V.; CIRILLO, M. C.; GONÇALVES, L. R. C.; SANO-MARTINS, I. S.; GIORGI, R.; SANTORO, M. L. Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.9, p.2057–206, 2011.

ZENI, A. L. B.; BECKER, A.; KRUG, M.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. **Journal of Venom and Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 664-676, 2007.

ZHANG, L. T.; ZHANG, Y. W.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H. Q. Antitumor triterpene saponins from *Anemone flaccida*. **Chinese Chemical Letters**, v.19, p.190–192, 2008.

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; SILVA, L. M. C.; SAMPAIO, S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. F. P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A2. **Toxicon**, v. 46, p.523–532, 2005.