Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da Atividade Antiofídica de *Aristolochia sprucei*:
Isolamento e Caracterização Estrutural de Composto Bioativo**

Isela Iveth González Rodríguez

Ribeirão Preto
2010

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“Avaliação da Atividade Antiofídica de *Aristolochia sprucei*:
“Isolamento e Caracterização Estrutural de Composto Bioativo”**

Isela Iveth González Rodríguez

Ribeirão Preto – SP

2010

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**“Avaliação da Atividade Antiofídica de *Aristolochia sprucei*:
“Isolamento e Caracterização Estrutural de Composto Bioativo”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Isela Iveth González Rodríguez
Orientador: Andreimar Martins Soares

**Ribeirão Preto – SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodríguez, Isela Iveth González

**Avaliação da Atividade Antiofídica de *Aristolochia sprucei*:
Isolamento e Caracterização Estrutural de Composto Bioativo, Ribeirão Preto, 2010**

109p.. :il. 30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Soares, Andreimar Martins

1.Atividade Antiofídica 2.*Aristolochia sprucei* 3.*Bothrops asper* 4.Panamá

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Isela Iveth González Rodríguez

Título do trabalho: Avaliação da Atividade Antiofídica de *Aristolochia sprucei*:
Isolamento e Caracterização Estrutural de Composto Bioativo

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho:

A minha mãe, Dília.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por brindar-me a oportunidade de continuar estudando e dar-me fortaleza para superar todas as dificuldades que tive no caminho para chegar até aqui.

A meu querido amigo, Aristides por seus conselhos, sua ajuda e apoio incondicional os quais me deram força para seguir adiante.

A meu orientador, Prof. Dr. Andreimar Martins Soares pela oportunidade, disponibilidade, incentivo e acima de tudo por o apoio e orientação que sempre me brindou. Serei sempre grata a você, meu amigo.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, do Departamento de Física e Química (FCFRP-USP), por ter cedido espaço e equipamento no laboratório sob sua responsabilidade, colaborando assim para a realização das análises fitoquímicas apresentados neste trabalho.

Ao técnico de laboratório, José Carlos Tomas, do Laboratório de Fitoquímica da FCFRP-USP, pelo auxílio técnico-científico fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, do Departamento de Ciências Farmacêuticas (FCFRP-USP) pela colaboração nos ensaios de modelagem molecular.

Ao Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva, do Departamento de Química (FFCLRP-USP) pela colaboração nos estudos de ressonância magnética nuclear.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira, do Laboratório de Química de Produtos Naturais aplicadas a Biotecnologia (UNAERP) por o auxílio nas provas de cromatografia de alta eficiência (CLAE).

Ao Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes, do Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Botucatu (UNESP) por a colaboração nos ensaios de dicroísmo circular.

À Secretaria Nacional de Ciências e Tecnologia do Panamá (SENACYT) e ao Instituto para a Formação e Aproveitamento dos Recursos Humanos (IFARHU) por o apoio brindado nos meus estudos de Pós-graduação no Brasil.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho.

RESUMO

RODRIGUEZ, I.I.G. Avaliação da atividade antiofídica de *Aristolochia sprucei*: Isolamento e caracterização estrutural de composto bioativo. 2010. 109 fl. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Muitas espécies do gênero *Aristolochia* (Familia Aristolochiaceae) têm sido usadas na medicina tradicional e folclórica como medicamentos e tônicos, as quais demonstravam atividades farmacológicas de interesse clínica e medica como anti-hemorrágica, anti-parasita, antibacteriano, antifúngico, analgésico, antitumoral entre outras. Visando a obtenção de mais informações sobre essas plantas e na procura por substâncias com efeitos antiofídicos, neste trabalho avaliou-se à ação de extratos aquoso, metanólico e de acetato de etila de folhas e caule contra as ações tóxicas da peçonha de *Bothrops asper*, ambos procedentes do Panamá e contra o efeito miotóxico da peçonha de *Bothrops jararacussu* e das miotoxinas BthTX-I (isolada de *B. jararacussu*) e Mtx-II (isolada de *B. asper*). O extrato das folhas em acetato de etila apresentou a melhor inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *B. asper*, demonstrando inibição de 45%, 35% e 33% nas proporções de 1:5, 1:10 e 1:30 (m/m), respectivamente. Enquanto que, o extrato de caule em acetato de etila demonstrou maior eficácia na neutralização da atividade coagulante, e, além disso, inibiu 96%, 92% e 87% do edema, da miotoxicidade e hemorragia induzidas pela peçonha de *B. asper*, respectivamente. Os percentuais diferenciados na neutralização das ações tóxicas da peçonha de *Bothrops asper*, revelam diferentes perfis do potencial antiofídico de *Aristolochia sprucei*. Um dos componentes bioativos foi isolado do extrato de caule desta planta por CLAE, e a caracterização química, por ressonância magnética nuclear, demonstrou ser o ácido aristolóquio que inibiu a atividade miotóxica das peçonhas de *B. jararacussu* e de *B. asper* em 80% e 85% e assim como a atividade miotóxica da BthTX-I e Mtx-II em 64% e 60%, respectivamente. A atividade hemolítica indireta da peçonha de *B. asper* foi inibida em 43% pelo o ácido aristolóquio. A análise dos espectros de dicróismo circular e os estudos de interação por modelagem molecular sugerem que o ácido aristolóquio forma um complexo com a Mtx-II de *B. asper* inibindo sua atividade. A ligação do ácido aristolóquio com as miotoxinas (MjTX-1, BthTX-II) modificou a forma e a intensidade dos espectros de dicróismo circular da miotoxina e induziu alterações na porcentagem dos diversos domínios que constituem a estrutura secundária desta miotoxina. Os resultados obtidos confirmam que os extratos de *A. sprucei* possuem propriedades antiofídicas e sugerem a necessidade de aprofundar estudos que permitam utilizar com segurança os extratos e o princípio ativo isolado como suplementos dos antisoros para aumentar a eficácia na neutralização dos efeitos tóxicos locais da peçonha das serpentes.

Palavras chave: Atividade antiofídica, *Aristolochia sprucei*, ácido aristolóquio *Bothrops sp.* Panamá, fosfolipases A₂, miotoxinas, dicróismo circular, modelagem molecular.

ABSTRACT

RODRIGUEZ, I. I. G. Assessment of antiophidic activity of *Aristolochia sprucei*: Isolation and structural characterization of composite bioactive. 2010. 109 p. Dissertation of Sciences Master. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A lot of species of genus *Aristolochia* (Familia Aristolochiaceae) have been used in traditional medicine and folk, such as medicaments and tonics, which show pharmacological activities of clinic and medical interest, like antihemorrhagic, antiparasitic, antibacterial, antifungic, analgesic, antitumoral between others. Expecting to get more information about these plants and in the search by substances with antiophidic effects, in this work was evaluated the action of aqueous, metanolic and ethyl acetate extracts from leaves and stems of *Aristolochia sprucei* against the toxic action of *Bothrops asper* venom, both native from Panamá and against the myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom and BthTX1 (isolated from *B. jararacussu*) and Mtx-II (isolated from *Bothrops asper*). The leaves extracts in ethyl acetate showed the best inhibition registered of PLA₂ activity of venom de *B. asper* showing inhibition of 45 %, 35 % and 33 %, in proportion (m/m) of 1:5, 1:10 and 1:30 respectively. As regards to stem extract in ethyl acetate, it showed high efficacy in neutralization of coagulant activity, besides It inhibited 96 %, 92 % and 87 % of edema, myotoxicity and hemorrhage induced by *B. asper* venom, respectively. One of bioactives components was isolated from stem extract of this plant by CLAE and the chemical characterization by nuclear magnetic resonance, this showed that the compound is the aristolochic acid. This compound inhibited the myotoxic activity of *B. jararacussu* and *B. asper* venom in 80 % and 85 %, so like myotoxic activity of BthTx-I and MTx-II in 64 % and 60 % respectively. The indirect hemolytic activity of *B. asper* venom was inhibited in 43 % by the aristolochic acid. The analyze of spectrum of circular dichroism and the studies of interaction by molecular modelagem suggest that the aristolochic acid forms a complex 1:1 with the miotoxin inhibiting their activity. The joint of aristolochic acid with the miotoxins (MjTX-1, BthTx-II) changes the way and the intensity of spectra from dichroism circular of miotoxin and It induced alteration in percentage of several domains that constitute a secondary structure from this toxin. The results obtained confirm that the extracts of *A. sprucei* have antiophidic properties and it suggest the necessity of deepen studies that allow to use with safety the extracts and the isolated active principle, like antiserum supplements to increase the efficacy in the neutralization of local toxics effects of snakes venoms.

Keywords: Antiophidic activity, *Aristolochia sprucei*, *Aristolochic acid*, *Bothrops sp.* Panamá, phospholipases A₂, miotoxins, circular dichroism, molecular modeling

RESUMEN

RODRIGUEZ, I.I.G. Evaluación de la actividad antiofídica de *Aristolochia sprucei*: Aislamiento y caracterización estructural de compuesto bioactivo. 2010. 109 p. Disertación de maestría. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Muchas especies del género *Aristolochia* (Familia Aristolochiaceae) han sido usadas en la medicina tradicional y folclórica como medicamentos y tónicos, los cuales demostraron actividades farmacológicas de interés clínico y médico como antihemorrágica, antiparasítica, antibacteriana, antifúngica, analgésica, antitumoral entre otras. Con la visión de obtener más información sobre esta planta y de encontrar sustancias con efecto antiofídico, se evaluó la acción de extractos acuosos, metanólico y de acetato de etilo de las hojas y tallos de *Aristolochia sprucei* contra los efectos tóxicos del veneno de *Bothrops asper*, ambos procedentes de Panamá, contra el efecto miotóxico del veneno de *Bothrops jararacussu* y de las miotoxinas BthTX-1 (aislada de *Bothrops jararacussu*) y MTx-II (aislada de *B. asper*). El extracto de hojas de acetato de etila presentó la mejor inhibición registrada de la actividad fosfolipásica del veneno demostrando inhibición de 45 %, 35 % y 33 % en las proporciones (m/m) de 1:5, 1:10 y 1:30, respectivamente. Por otro lado, el extracto de tallo de acetato de etila demostró mayor eficacia en la neutralización de la actividad coagulante y además, inhibió 96 %, 92 % y 87 % del edema, de la miotoxicidad y hemorragia causada por el veneno de *B. asper*, respectivamente. Los porcentajes diferenciados en la neutralización de las acciones tóxicas del veneno de *Bothrops asper*, muestran diferentes perfiles de potencial antiofídico de *Aristolochia sprucei*. Unos de los componentes activos fue aislado del extracto de tallo de esta planta por CLAE y la caracterización química por resonancia magnética nuclear mostro que el compuesto era el ácido aristoloquio que inhibió la actividad miotóxica del veneno de *B. jararacussu* y *Bothrops asper* en 80 % y 85 % y la BthTX-1 y Mtx-II en 64 % y 60 % respectivamente. La actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. asper* fue inhibida en 43 % por este compuesto. Los análisis de los espectros de dicroísmo circular y los estudios de interacción por modelaje molecular sugieren que el ácido aristoloquio forma un complejo 1:1 con la Mtx-II de *B. asper* inhibiendo su actividad. La unión del ácido aristoloquio con las miotoxinas (MjTX-1, BthTX-II) modifico la forma y la intensidad de los espectros de dicroísmo circular de la miotoxina e indujo alteraciones en el porcentaje de los diversos dominios que constituyen la estructura secundaria de esta miotoxina. Los resultados obtenidos confirman que los extractos de *A. sprucei* poseen propiedades antiofídicas y sugieren la necesidad de aprofundar estudios que permitan utilizar con cuidado los extractos y el principio activo aislado como suplementos de antisueños para aumentar la eficacia en la neutralización de los efectos tóxicos locales del veneno de serpientes.

Palabras clave: Actividad antiofídica, *Aristolochia sprucei*, ácido aristolóquio, *B. asper*, Panamá, fosfolipasas A₂, miotoxinas, dicroísmo circular, modelaje molecular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes da peçonha das serpentes.....	5
Figura 2. Hidrólise de um fosfolipídio pela PLA ₂	7
Figura 3. Exemplo de estrutura de PLA ₂	11
Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de catálise das PLA ₂ s.....	12
Figura 5. Espécime adulto de <i>Bothrops asper</i> do Panamá	13
Figura 6. Constituintes ativos das plantas medicinais	18
Figura 7. Localização geográfica dos grupos indígenas que habitam no Panamá....	20
Figura 8. Exemplar de <i>Aristolochia sprucei</i> do Panamá	26
Figura 9. Locais de coleta das serpentes <i>B. asper</i> e de planta <i>A. sprucei</i>	36
Figura 10. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de <i>B. asper</i> pelo extrato de <i>A. sprucei</i>	47
Figura 11. Inibição da atividade edematizante da peçonha de <i>B. asper</i> do Panamá pelos extratos de folhas e caule de <i>Aristolochia sprucei</i> em acetato de etila.....	49
Figura 12. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de <i>B. asper</i> do Panamá pelo extrato acetato de etila de <i>A. sprucei</i>	51
Figura 13. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de <i>B. asper</i> do Panamá pelo extrato metanólico de <i>A. sprucei</i>	52
Figura 14. Inibição da atividade hemorrágica da peçonha de <i>B. asper</i> do Panamá pelo extrato de <i>A. sprucei</i> em acetato de etila.....	53
Figura 15. Cromatografia de camada delgada das 13 primeiras frações obtidas do extrato de folha de acetato de etila de <i>A. sprucei</i>	55
Figura 16. Cromatografia de camada delgada das frações de 14-23 obtidas do extrato de folha de acetato de etila de <i>A. sprucei</i>	56
Figura 17. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de <i>B. asper</i> pelas frações de extrato de folha em acetato de etila de <i>A. sprucei</i> na proporção 1:30 (m/m).....	57
Figura 18. Análises do extrato bruto de <i>A. sprucei</i> (caule e folha) em acetato de etila em cromatografia de alta eficiência (CLAE).....	58
Figura 19. Análises espectroscópicas de RMN de próton (RMN ¹ H) e de carbono (RMN ¹³ C) do composto isolado por CLAE	60

Figura 20. Estrutura química do Ácido Aristolóquio I isolado de <i>A. sprucei</i>	62
Figura 21. Inibição da atividade miotóxica das peçonhas de <i>B. jararacussu</i> e <i>B. asper</i> e das miotoxinas BthTX-I e Mtx-II pelo ácido aristolóquio	63
Figura 22. Inibição da atividade fosfolipásica pelo Ácido Aristoloquio.....	64
Figura 23. Espectro de dicroísmo circular da interação entre o ácido aristoloquio e as miotoxinas isoladas.	66
Figura 24. Mapas das grades de afinidade entre a miotoxina II de <i>B. asper</i> e o ácido aristolóquio de <i>A. sprucei</i>	68
Figura 25. Modelo molecular do complexo ácido aristolóquio com a miotoxina II de <i>B. asper</i>	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas pertencentes à superfamília das fosfolipases A ₂ (PLA ₂ s)	9
Tabela 2. Informação etnobotânica das plantas usadas pelos indígenas do Panamá no tratamento de acidentes por picadas de serpentes.....	21
Tabela 3. Compostos químicos isolados de plantas antiofídicas	25
Tabela 4. Usos medicinais tradicionais das espécies de <i>Aristolochia</i>	28
Tabela 5. Informação etnofarmacológica validada cientificamente das espécies de <i>Aristolochia</i>	29
Tabela 6. Extratos de plantas validados cientificamente com atividade inibitória contra a peçonha e toxinas de <i>B. asper</i>	31
Tabela 7. Efeito dos extratos de folhas e caule de <i>Aristolochia sprucei</i> em diferentes solventes sobre a atividade coagulante da peçonha bruta de <i>B. asper</i> do Panamá	48
Tabela 8. Comparação dos deslocamentos químicos obtidos por RMN na amostra com padrões da literatura do ácido aristolóquio I	61
Tabela 9. Porcentagem dos diversos domínios da estrutura secundária das miotoxinas (BthTX-II e MjTX-I) na presença e ausência do ácido aristolóquio de <i>A. sprucei</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac-F: Extrato de folhas em acetato de etila de *Aristolochia sprucei*

Ac-C: Extrato de caule em acetato de etila de *Aristolochia sprucei*

ANAM: Autoridade Nacional do Ambiente

Aq-F: Extrato de folhas em água de *Aristolochia sprucei*

Aq-C: Extrato de caule em água de *Aristolochia sprucei*

BthTX-I: Bothropstoxina-I de *Bothrops jararacussu*

BthTX-II: Bothropstoxina-II de *Bothrops jararacussu*

DMC: Dose mínima coagulante

DMSO: Dimetilsulfóxido

M-C: Extrato de caule em Metanol de *Aristolochia sprucei*

M-F: Extrato de folhas em Metanol de *Aristolochia sprucei*

MjTX-I: Miotoxina I de *Bothrops moojeni*

Mtx-II: Miotoxina II de *Bothrops asper*

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPS: Organização Panamericana da Saúde

PBS: Tampão fosfato em salina

PLA₂: Fosfolipase A₂

svPLA₂s: PLA₂s de peçonhas de serpentes

SD: “*Standard Deviation*” - Desvio padrão

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Acidentes Ofídicos: Um problema de saúde pública	1
1.2. Fisiopatologia do envenenamento com a peçonha botrópica.....	2
1.3. Peçonha das serpentes.....	3
1.3.1. Fosfolipases A ₂	6
1.4. <i>Bothrops asper</i> do Panamá.....	13
1.5. Agentes antiofídicos	14
1.5.1. Soroterapia.....	14
1.5.2. Plantas Medicinais e Medicamentos à base de plantas	16
1.5.2.1. Aspectos históricos sobre o uso de plantas medicinais na terapêutica	16
1.5.2.2. Constituintes ativos de plantas medicinais	17
1.5.3. Plantas com potencial antiofídico	19
1.6. O gênero <i>Aristolochia</i>	26
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Peçonha e miotoxinas	33
3.2. Animais.....	33
3.3. Material Vegetal	34
3.4. Preparações dos extratos.....	37
3.5. Determinação quantitativa de proteínas	37
3.6. Protocolo de neutralização	37

3.7. Atividades enzimáticas, tóxicas e farmacológicas.....	37
3.7.1. Atividade fosfolipásica	37
3.7.2. Atividade miotóxica	38
3.7.3. Atividade indutora de edema.....	38
3.7.4. Atividade coagulante	39
3.7.5. Atividade hemorrágica.....	39
3.8. Fracionamento Cromatográfico	39
3.8.1. Cromatografia em Coluna	40
3.8.2. Cromatografia em camada delgada	40
3.8.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
3.8.3.1. Substâncias Polares.....	41
3.8.3.2. Substâncias Apolares	41
3.9. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	42
3.10. Análise de Espectros de Dicroísmo Circular	42
3.11. Estudo Estrutural de Interação Molecular.....	43
3.12. Análise estatística	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Inibição da atividade fosfolipásica	46
4.2. Inibição da atividade coagulante	48
4.3. Inibição do edema	48
4.4. Inibição da atividade miotóxica.....	50
4.5. Inibição da atividade hemorrágica.....	50
4.6. Fracionamento Cromatográfico	54
4.7. Análises em Cromatografia líquida de alta eficiência	54
4.8. Análises por Ressonância Magnética Nuclear	59
4.9. Inibição das atividades miotóxica e fosfolipásica induzida pelo Ácido Aristolóquio.....	59
4.10. Análise de Espectros de Dicroísmo Circular	65
4.11. Estudos de Interação Molecular	67
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes Ofídicos: Um problema de saúde pública

Os envenenamentos por picadas de serpentes são um problema de saúde pública em diversas regiões do mundo, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais, tornando a pesquisa por agentes antiofídicos e conhecimentos de seus efeitos tóxico-farmacológicos de grande relevância (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006a; KASTURIRATNE *et al.*, 2008). A estimativa global de acidentes ofídicos chega a um número de 2,5 milhões de casos por ano, contabilizando mais de 100.000 mortes (CHIPPAUX, 1998).

Na América Latina, cerca de 90% dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (PINHO; PEREIRA, 2001; NUÑEZ *et al.*, 2004). No Brasil, registra-se de 12 a 14 casos/100.000 habitantes, informando-se um total de 22.000 picadas de serpentes, em sua maioria provocadas por serpentes do gênero *Bothrops* (OTERO *et al.*, 1992a; MEIER e WHITE, 1995; OTERO, 2001a; SASA e VAZQUEZ, 2003; FAN *et al.*, 2004; CHIPPAUX, 2006; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; GUTIÉRREZ; ROJAS; AYMERISH, 2006; OTERO, *et al.*, 2007; KASTURIRATNE *et al.*, 2008; OTERO-PATÍÑO, 2008).

Em países como Costa Rica, Nicarágua, Honduras, Panamá, Colômbia, Venezuela e Equador, a serpente *Bothrops asper*, é responsável por 50 a 80% dos acidentes que acontecem (OTERO-PATÍÑO, 2009). No Panamá, apresenta-se a maior incidência de picadas por esta espécie registrando-se de 54-62 casos/100.000 habitantes, aproximadamente 2.000 picadas por ano (QUINTERO, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a).

Este problema ressalta-se por sua alta incidência em algumas regiões e províncias da República do Panamá, tais como: Panamá leste, Veraguas, Coclé e Chiriquí onde se apresenta uma alta incidência de picadas de serpentes de 100 por 100.000 habitantes/ano (OTERO-PATÍÑO, 2008). Esta situação tem particular importância no Panamá nas regiões onde as serpentes vivem perto das casas, dada a tendência atual de nossas populações de crescer e invadir o nicho ecológico desta espécie, englobando-a dentro do hábitat humano.

A maioria destes acidentes ocorre em trabalhadores da área agrícola (85–90% dos casos) (OTERO *et al.*, 1992a; 2001; SASA e VÁZQUEZ, 2003;). Estes

acidentes acontecem em sua maioria em adultos jovens (faixa etária de 15-45 anos em 54% dos casos), seguido de acidentes com crianças (30%), e a maioria das picadas ocorre nos membros inferiores (70%) (MEIER e WHITE, 1995; OTERO *et al.*, 1992a, 2001a; SASA e VÁZQUEZ, 2003; CHIPPAUX, 2006; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; GUTIÉRREZ; ROJAS; AYMERISH, 2006; OTERO, *et al.*, 2007; OTERO-PATÍÑO, 2008; KASTURIRATNE *et al.*, 2008).

1.2. Fisiopatologia do envenenamento com a peçonha botrópica

Em geral são descritas três atividades fisiopatológicas da peçonha botrópica: atividade inflamatória aguda, sobre a coagulação sanguínea e plaquetas e hemorrágica (PINHO e PEREIRA, 2001; FRANÇA e MÁLAQUE, 2009).

Inflamação aguda: É causada por um conjunto de frações da peçonha, bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas e responsáveis pelos fenômenos locais, como edema, bolhas e necrose. Possivelmente, decorrem da atividade inter-relacionada de proteases, hialuronidases e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, da ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação pró-coagulante da peçonha (FRANÇA e MÁLAQUE, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b).

Atividade sobre a coagulação sanguínea e plaquetas: A maioria das peçonhas botrópicas ativa, de modo isolado ou simultâneo, o fator X e a protrombina. Possui também ação semelhante à trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Essas ações produzem distúrbios da coagulação, caracterizados por consumo dos seus fatores, geração de produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio, podendo ocasionar incoagulabilidade sanguínea. Este quadro é semelhante ao da coagulação intravascular disseminada. As peçonhas botrópicas podem também levar a alterações da função plaquetária bem como plaquetopenia (FRANÇA e MÁLAQUE, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b).

Hemorragia: É atribuída fundamentalmente a componentes específicos denominados hemorraginas, as metaloproteases dependentes de zinco. São comuns à família Viperidae, como mencionado anteriormente. O mecanismo de ação envolve lesões na membrana basal dos capilares, associadas à plaquetopenia e alterações da coagulação (FRANÇA e MÁLAQUE, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009 b).

Os envenenamentos com a peçonha de *Bothrops asper* induzem proeminentes danos locais nos tecidos, caracterizados pela formação de bolhas, edema, hemorragia, dermonecroses e mionecroses (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2009). A necrose muscular é uma séria consequência dos acidentes botrópicos que pode levar a uma perda permanente de tecido e da funcionalidade, requerendo, muitas vezes, a amputação do membro atingido (IWAGANA e SUZUKI, 1979; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006a; GUTIÉRREZ *et al.* 2007; WARELL, 2007).

As manifestações clínicas das alterações sistêmicas induzidas por *B. asper* incluem hemorragia, efeitos na agregação plaquetária, coagulopatias, hipotensão, alterações hemodinâmicas, edema pulmonar e falha renal aguda (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE 1989; OTERO *et al.*, 1992a,b; CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995; OTERO *et al.* 1996; OTERO-PATÍÑO *et al.*, 1998; LIZANO, 2003; NUÑEZ *et al.*, 2004).

Também podem ocorrer outros efeitos menos comuns tais como hemólise intravascular, dano agudo do miocárdio e se a vítima não for atendida rapidamente pode apresentar falha múltipla de órgãos levando-a a morte (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; SINGH *et al.*, 2000; OTERO *et al.*, 2002; WARRELL, 2004; SOARES *et al.*, 2004; MORA *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a,b).

1.3. Peçonha das serpentes

A peçonha das serpentes são secreções tóxicas produzidas e armazenadas por um par de glândulas exócrinas localizadas nos dois lados da cabeça das serpentes, logo atrás dos olhos, diretamente por baixo da pele. Ao ocorrer a picada, a peçonha é injetada pelos dentes inoculadores e posteriormente distribuída a outras partes do corpo através do sistema circulatório (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; CHIPPAUX, 2006).

A peçonha é uma mistura complexa de diversas moléculas de natureza orgânica que são farmacologicamente ativas e que atuam sinergicamente na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento. Entre os constituintes da peçonha das serpentes se incluem carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, peptídeos, e componentes inorgânicos, tais como, cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (Fig. 1) (RAMOS e SELISTRE-DE ARAÚJO, 2006).

Entretanto, a maior parte das substâncias presentes nas peçonhas das serpentes são proteínas, que correspondem cerca de 90 a 95% do peso seco da peçonha, muitas das quais apresentam atividade enzimática (YANG, 1974; KOH *et al.*, 2006; CHIPPAUX, 2006; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; ANGULO e LOMONTE, 2008). Algumas das proteínas com atividade enzimática são: fosfolipases A₂ (miotóxicas, cardiotoxícas, citotóxicas), proteases (metaloproteases hemorrágicas, serinoproteases), L-aminoácido oxidases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e b-glucosaminidases (JIMENEZ-PORRAS, 1970; LEE, 1972; MEBS e OWNBY, 1990; TU, 1996; LEE GAN, 2002; McCUE, 2005; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; JIANG; XU; YANG, 2009).

Sendo a composição química das peçonhas tão complexa as lesões produzidas por elas dependem da natureza desses elementos e da interação biológica de cada um deles, além, é claro, da quantidade de peçonha injetada e das condições de saúde da vítima (FRANÇA e MÁLAQUE, 2009).

A peçonha botrópica possui atividade proteolítica, que determina o edema inflamatório no local da picada; atividade coagulante, transformando diretamente o fibrinogênio em fibrina, além disso, têm capacidade de ativar o fator X e a protrombina da cascata de coagulação sanguínea. Possui também atividade hemorrágica, provocada pelas metaloproteases, que atuam no endotélio vascular na região da picada e também à distância. Outras atividades que podem participar da fisiopatologia do envenenamento são a fibrinogenolítica, fibrinolítica e agregadora de plaquetas (FRANÇA e MÁLAQUE, 2009).

A necrose muscular pode produzir uma perda irreversível do tecido e, em alguns casos, torna-se necessário amputar o membro atingido (IWAGANA e SUZUKI, 1979; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; GUTIÉRREZ *et al.* 2007; WARELL, 2007). O dano isquêmico e a hipotensão produzidas pela peçonha botrópica podem ser induzidos pelo edema, hemorragia, mionecrose e defibrinação (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE 1989; OTERO *et al.*, 1992a,b; CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995; OTERO *et al* 1996; OTERO-PATÍÑO *et al.*, 1998; NUÑEZ *et al.*, 2004; OTERO-PATÍÑO, 2009).

Figura 1. Componentes da peçonha das serpentes. CVF (*Cobra Venom Factor* ou proteína ativadora do complemento), CRISP (proteínas secretórias ricas em cisteínas), LAAO (L-Aminoácido Oxidase), NGF (*Nerve Growth Factor* ou fator neurotrópico), VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), RGD (motivo Arg-Gly-Asp), ACE (Acetilcolinesterase). (Adaptado de RAMOS e SELISTRE-DE ARAÚJO, 2006).

1.3.1. Fosfolipases A₂

De todas as enzimas presentes nas peçonhas das serpentes, as fosfolipases A₂ são as mais comumente encontradas e estudadas, não somente pelas suas propriedades químicas, mas também pela sua importância biológica (KINI, 2003).

Com a ação da enzima, os fosfolipídeos são hidrolisados, desestruturando a membrana e comprometendo a sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especificamente na ligação 2-acil éster de 3-*sn*-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfoglicerídeos (ARNI e WARD, 1996; KINI *et al.*, 2003). Os ácidos graxos liberados, como ácido araquidônico e ácido oléico podem ser importantes na estocagem de energia. O ácido araquidônico pode também funcionar como segundo mensageiro e como substrato para duas vias enzimáticas: a via das ciclooxygenases (Figura 2), a qual produz prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (RIBARDO *et al.*, 2001); e a via catalisada pela lipoxigenase que gera como substratos leucotrienos e lipoxinas (PETERS-GOLDEN, 1998) (Figura 2). Esses produtos metabólicos atuam como potentes mediadores pró-inflamatórios (DENNIS, 1997; CORDA *et al.*, 2002).

Os lisofosfoglicerídeos são intermediários no metabolismo dos diacilglicerolfosfolipídeos e em concentrações elevadas são agentes hemolíticos, tóxicos e causam dano nas membranas celulares (DIAZ e ARM, 2003; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; WAGNER e BREZESINSKI, 2008). Além disso, os lisofosfoglicerídeos podem ser posteriormente catalisados por fatores ativadores de plaquetas.

A atividade catalítica das PLA₂s sobre membranas sugere um importante papel das fosfolipases A₂ das peçonhas de serpentes (svPLA₂s) em sua toxicidade. De fato, as svPLA₂s possuem uma grande variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, tais como: mionecrótico, anticoagulante, inibição de agregação plaquetária, neurotóxico, cardiotoxico, hipotensor e indutor de edema (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; HARRIS *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2000; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

O desarranjo dos componentes fosfolipídicos está associado a severas alterações na integridade estrutural e funcional das membranas celulares com conseqüente influxo de íons cálcio (GUTIÉRREZ *et al.*, 1989), que causa a liberação de proteases dependentes de cálcio (DUNCAN, 1978), ativação de PLA₂s endógenas (TRUMP, 1996) e colapso mitocondrial (GOPALAKRISHNAKONE *et*

al.,1984). As somatórias de todas essas alterações moleculares poderiam resultar em morte celular.

Estudos têm sido realizados com o intuito de entender a correlação entre a atividades das sPLA₂ e sua expressão durante a inflamação (MURAKAMI *et al.*, 1997). Inicialmente, foi encontrado que o aumento de quantidades de prostaglandinas, leucotrienos e lisofosfoglicerídeo, também chamados de citocinas inflamatórias, pode levar ao desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias e, em muitos casos, ao desenvolvimento de câncer (DENNIS, 2000; CORDA *et al.*, 2002).

No caso de peçonhas botrópicas, como no de outras espécies de serpentes, existem isoformas de fosfolipases A₂ que aparecem em um mesmo indivíduo ou em diferentes indivíduos da mesma espécie (TOYAMA *et al.*, 2000; COGO *et al.*, 2006).

Sabe-se que as serpentes possuem vários genes que codificam diversas isoformas, no entanto, a expressão e síntese destas não são bem conhecidas ainda. Embora essas isoformas apresentem grande semelhança bioquímica, significativas diferenças são detectadas em suas atividades enzimáticas e farmacológicas.

Figura 2. Hidrólise de um fosfolípido pela PLA₂. Quebra da ligação *sn*-2 do fosfolípido e consequente liberação do lisofosfoglicerídeo e ácido graxo e seus respectivos produtos de catálise (adaptado de KINI, 1997).

Devido ao seu papel central em muitos processos celulares, as PLA₂s de diversas fontes têm sido exaustivamente estudadas, não somente com o intuito de entender suas bases moleculares do mecanismo catalítico e suas ligações interfaciais (SCOTT; SIGLER, 1994), mas também para elucidar suas funções regulatórias no organismo e no interior das células (MURAKAMI *et al.*, 1997; MURAKAMI e KUDO, 2001).

As PLA₂s constituem uma superfamília de enzimas pertencentes a 15 grupos e seus subgrupos (Tabela 1), que também podem ser divididas considerando a origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características bioquímicas adicionais, funcionais e estruturais em cinco tipos distintos: as denominadas PLA₂s secretadas (sPLA₂), dentre elas as PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes, as PLA₂s citossólicas (cPLA₂), as PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂), as acetil-hidrolases fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) e as PLA₂s lisossomais (SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Segundo Schaloske e Dennis (2006), as sPLA₂s, são enzimas com Mr variando entre 14.000 e 18.000, usualmente contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto. Estas enzimas apresentam uma histidina no sítio ativo e requerem presença do íon Ca²⁺ para a catálise.

Tabela 1. Classificação das enzimas pertencentes à superfamília das fosfolipases A₂ (PLA₂s)*.

Grupo	PLA ₂	Fonte	Massa relativa (Mr)	Características
IA	sPLA ₂	Hydrophiidae e Elapidae	13 - 15	7 pontes dissulfeto
IB	sPLA ₂	Pâncreas suíno e humano	13 - 15	7 pontes dissulfeto
IIA	sPLA₂	Crotalinae, Viperidae, fluido sinovial humano	13 - 15	7 pontes dissulfeto
IIB	sPLA ₂	Víbora de Gaboon	13 - 15	6 pontes dissulfeto
IIC	sPLA ₂	Testículo de rato e murino	15	8 pontes dissulfeto
IID	sPLA ₂	Baço/pâncreas humano e murino	14 - 15	7 pontes dissulfeto
IIE	sPLA ₂	Cérebro/coração/útero humano e murino	14 - 15	7 pontes dissulfeto
IIF	sPLA ₂	Testículo/embrião, humano e murino	16 - 17	6 pontes dissulfeto
III	sPLA ₂	Humano, murino, lagarto, abelha	15 – 18; 55 (humano/murino)	8 pontes dissulfeto
IVA	cPLA ₂	Humano, murino	85	Domínio C2
IVB	cPLA ₂	Humano	114	Domínio C2
IVC	cPLA ₂	Humano	61	Acilado
IVD	cPLA ₂	Humano, murino	92-93	Domínio C2
IVE	cPLA ₂	Murino	100	Domínio C2
IVF	cPLA ₂	Murino	96	Domínio C2
V	sPLA ₂	Macrófago, pulmão, coração/humano e murino	14	6 pontes dissulfeto
VIA-1	iPLA ₂	Humano, murino	84-85	8 repetições de sequência consenso
VIA-2	iPLA ₂	Humano, murino	88-90	7 repetições de sequência consenso
VIB	iPLA ₂	Humano, murino	88-91	Ligada a membrana
VIC	iPLA ₂	Humano, murino	146	Proteína integral de membrana
VID	iPLA ₂	Humano	53	Triacilglicerol lipase
VIE	iPLA ₂	Humano	57	Triacilglicerol lipase
VIF	iPLA ₂	Humano	28	Triacilglicerol lipase
VIIA	PAF-AH	Humano, murino, suíno, bovino	45	Secretada, a/b hidrolase
VIIB	PAF-AH	Humano, bovino	40	Intracelular, PAF a/b hidrolase
VIIIA	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp
VIIIB	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp
IX	sPLA ₂	Caracol (conodipine-M)	14	6 pontes dissulfeto
X	sPLA ₂	Leucócito, timo, baço/humano	14	8 pontes dissulfeto
XIA	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA ₂ -I)	12.4	6 pontes dissulfeto
XIB	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA ₂ -II)	12.9	6 pontes dissulfeto
XII	sPLA ₂	Humano, murino	19	7 pontes dissulfeto
XIII	sPLA ₂	Parvovirus	< 10	sem pontes dissulfeto
XIV	sPLA ₂	Fungo simbiótico, bactéria	13 -19	2 pontes dissulfeto
XV	PLA ₂	Humano, murino, bovino	45	Glicosilada, sequência sinal
	lisossomal		(deglicosilada)	N-terminal

* Adaptado de Schaloske e Dennis (2006).

As PLA₂s de peçonhas de serpentes (svPLA₂s) estão classificadas no grupo I e II, sendo que as da família Viperidae encontram-se no grupo IIA (SIX e DENNIS, 2000; SOARES *et al.*, 2004a; RODRIGUES *et al.*, 2004).

As moléculas de PLA₂s dos grupos I e II estão estabilizadas por sete ligações dissulfeto nas posições 11-77, 27-124, 29-45, 44-105, 51-96, 61-91 e 84-98 (HARRIS, 1991). A divisão entre as classes I e II é baseada em dois critérios estruturais que são identificados na sequência de aminoácidos: (i) nas enzimas da classe II falta a ligação Cys11-Cys77, mas aparece outra ponte dissulfeto alternativa, Cys51-Cys133, e (ii) a classe I possui cerca de dois a três aminoácidos inseridos na região 52-65, chamada de “loop elapídico”, enquanto que a classe II possui esta volta truncada, mas, em adição apresenta de cinco a sete aminoácidos estendendo a região C-terminal (ARNI e WARD, 1996).

As fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas botrópicas pertencem ao grupo IIA das fosfolipases e podem ser subdivididas em dois subgrupos: (i) Asp49 que são as proteínas cataliticamente ativas, e (ii) Lys49 que são as proteínas que praticamente possui baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (OWNBY *et al.*, 1999). A diferença nas propriedades enzimáticas das duas classes de proteínas está baseada principalmente na presença do resíduo de aspartato (Asp) na posição 49 no primeiro grupo, quando comparado com a presença de lisina (Lys) na mesma posição da cadeia polipeptídica no outro grupo. A troca de aminoácidos é suficiente para causar a perda da habilidade da proteína em se ligar no cálcio (Ca²⁺), um cofator essencial para fazer com que a enzima expresse sua atividade catalítica.

A estrutura terciária conservada das svPLA₂s (Figura 3) é constituída por duas α -hélices antiparalelas (hélice 2 e 3) com características anfipáticas, nas quais os resíduos hidrofílicos estão expostos ao solvente e os resíduos hidrofóbicos dispostos no interior. Os resíduos polares do sítio catalítico (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52) estão situados no interior destas duas α -hélices, representando então a exceção para a distribuição descrita anteriormente. As PLA₂s são também constituídas por uma região N-terminal, representada por uma α -hélice 1 (resíduos 1 a 12). Em seguida está localizada uma curta hélice (*short helix*) formada pelos resíduos 18-23. Entre os resíduos 25-34 está o *loop* ligante de cálcio, seguido pela α -hélice 2 (resíduos 40 a 55) à qual se liga a folha b curva antiparalela (β -wing) (resíduos 75 a 77 e 82 a 84). Após a região β -wing, está a α -hélice 3 (resíduos 90 a 107) que se

liga a uma região bastante flexível, denominada *alça* C-terminal (resíduos 108 a 113). A presença de 7 pontes dissulfeto nas posições entre Cys51-Cys133 e a extensão C-terminal de 5-7 aminoácidos é característica das PLA₂s do grupo II (RENETSEDER et al., 1985; ARNI e WARD, 1996).

Figura 3. Exemplo de estrutura de PLA₂. Representação em fita da estrutura terciária da subunidade A da miotoxina II Lys49 de *Bothrops asper*. As pontes dissulfeto aparecem em vermelho (Adaptado de RCSB PDB- código PDB 1CLP).

As seqüências representantes do sítio catalítico e do sítio de ligação ao cálcio respectivamente, (₄₂DXCCXXHD₄₉) e (₂₇XCGXGG₃₂), são altamente conservadas nas svPLA₂s do grupo IIA das enzimas cataliticamente ativas (MURAKAMI e KUDO, 2002).

O mecanismo catalítico da reação PLA₂-fosfolípido envolve o ataque nucleofílico de uma molécula de água na ligação *sn*-2 do substrato fosfolípídico (Figura 4). No modelo proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico do

resíduo His48 envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp99, impede que ocorra rotação do anel imidazólico e mantém o nitrogênio da posição 1 deste anel em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato, e nesse momento o anel imidazólico da His48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação.

Subseqüentemente à hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfolipídio, este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado juntamente com o ácido graxo (VERHEIJ *et al.*, 1980; ARNI e WARD, 1996; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O íon Ca^{2+} , coordenado pelo resíduo Asp49, uma molécula de água e os átomos de oxigênio dos resíduos Gly30, Trp31 e Gly32, são responsáveis pela estabilização do intermediário reativo (ARNI e WARD, 1996).

Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de catálise proposto para PLA_2 s. Interação dos resíduos do sítio catalítico de sPLA_2 s e do íon cálcio com o estado de transição da reação catalítica no qual uma molécula de água polarizada pelos resíduos H48 e D99 se liga ao grupo carbonila do substrato. Posição do íon Ca^{2+} , esfera azul e os ligantes de coordenação, em vermelho, responsáveis pela estabilização do intermediário reativo (adaptado de VERHEIJ *et al.*, 1980).

Em um modelo de ação, proposto por Kini e Evans (1989), as PLA_2 s de peçonhas de serpentes exibem uma variedade de efeitos farmacológicos por interação específica a “sítios alvo” presentes na superfície de células ou tecidos.

Tais efeitos podem ser dependentes e/ou independentes da atividade enzimática. Nos mecanismos dependentes da atividade enzimática, a hidrólise de fosfolípidios ou a liberação dos produtos desta hidrólise podem causar os efeitos farmacológicos, pois os danos às membranas podem afetar as proteínas a elas ancoradas. Já nos mecanismos independentes a interação, como agonista ou antagonista, com as proteínas alvo é responsável pelos efeitos farmacológicos (KINI, 1997; 2003; 2005).

1.4. *Bothrops asper* do Panamá

A espécie *Bothrops asper* é a serpente peçonhenta, solenóglifa, vivípara, mais importante e de distribuição cosmopolita no Panamá. São de fácil distinção por sua fosseta loreal, sua cabeça cuneiforme e pupilas elipticamente verticais (Figura 5). Sua cor pode ser bronzeada, chocolate, oliva, gris, rosado ou quase preto, com triângulos laterais escuros bordejados de claros cujos ápices fundem-se no meio da costa para dar a aparência de uma letra “X” sobre todo o corpo (Figura 5).

Figura 5. Espécime adulto de *Bothrops asper* do Panamá. Ressalta os detalhes da cabeça, cor e aparência de um espécime adulto (1,2-1,8 m de comprimento) (Foto cedida pelo Dr. Aristides Quintero Rueda, Panamá, 2008).

De um modo geral, pouco é conhecido a respeito da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá. Até o momento, foi caracterizada a peçonha bruta e foram isoladas e caracterizadas funcional e estruturalmente quatro fosfolipases A_2 básicas denominadas MTX-I, MXT-II, MTX-III e MXT-IV e uma fosfolipase A_2 acídica

denominada Basp-I-PLA₂ (QUINTERO, 2009). As MTX-I (PM: 14.156 e pl: 8,1), MTX-III (PM 14.253 e pl: 8,3) e Basp-I-PLA₂ (PM 14.246 e pl: 4,6), são PLA₂s Asp49 cataliticamente ativas. Enquanto que, a MTX-II (PM: 14.249 e pl: 8,2) e MTX-IV (PM: n.d. e pl: 8,1) são PLA₂s-símbles Lys49 cataliticamente inativas. Além disso, as PLA₂s (MTX-I, II, III e IV) induziram atividade miotóxica, reação inflamatória com migração de leucócitos ao músculo e ativação de macrófagos para exercer fagocitose e produção de superóxido. MTX-II exerceu um forte efeito citotóxico contra células tumorais JURKAT, *C. albicans* e *E. coli*. A fosfolipase A₂ acídica, testada no plasma enriquecido com plaquetas, mostrou potente efeito inibitório na agregação plaquetária induzida pela ADP e colágeno (QUINTERO, 2009).

1.5. Agentes antiofídicos

1.5.1. Soroterapia

O tratamento preconizado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para os acidentes ofídicos é a administração endovenosa de soro antiofídico de acordo com a gravidade do envenenamento que, embora tenha reduzido bastante a mortalidade, muitas vezes não apresenta um efeito protetor satisfatório (CHIPPAUX; GODWA, 1988; CHIPPAUX; GOYFFON, 1997; LIZANO *et al.*, 2003; KOH *et al.*, 2006; CALVETE ; JUÁREZ; SANZ, 2007; LOMONTE *et al.*, 2009).

O soro antiofídico, monovalente ou polivalente, é produzido com base em três tipos de substâncias ativas: (i) IgG derivada de soro eqüino, (ii) F(ab)₂ de soro eqüino e (iii) Fab de soro ovino (LOMONTE *et al.*, 2009).

A produção do soro antiofídico na América começou a ser realizada no Brasil a partir de 1901, no Instituto Butantan, pelo pesquisador Vital Brazil (BRAZIL, 1903) quem aceitou uma proposta de parceria apresentada pelo pesquisador Clodomiro Picado Twight, da Costa Rica, o que permitiria que o soro antiofídico produzido no Instituto Butantan, que era efetivo contra a peçonha das serpentes costarriquenhas, fosse introduzido com sucesso na Costa Rica, iniciando se assim a soroterapia como tratamento para os acidentes ofídicos na Costa Rica (GUTIÉRREZ, 2010). Este fato foi fundamental no desenvolvimento da soroterapia para toda à América Central.

Atualmente, o Instituto Clodomiro Picado, da Universidade de Costa Rica criado em abril de 1970, é o centro produtor de soro antiofídico para todos os países da América Central.

No Brasil, há três grandes centros produtores do soro antiofídico, que são: Instituto Vital Brazil (IVB, Niterói, RJ), Instituto Butantan (São Paulo, SP) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG). Contudo, trabalhos mostram que existem diferenças na capacidade neutralizante dos soros produzidos por estes centros (DA SILVA *et al.*, 2007).

Apesar da soroterapia reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos da peçonha no organismo da vítima, conseguindo evitar, por muitas vezes, o óbito, ela apresenta algumas desvantagens como uma série de efeitos colaterais e reações adversas (reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro de origem animal), e, ineficiência no combate do rápido dano tecidual local causada pelas toxinas presentes na peçonha da serpente (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE 1991; CARDOSO *et al.*, 1993; THEAKSTON, 1996; GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; LOMONTE *et al.*, 2009). Isto faz com que o paciente não responda com êxito ao tratamento, aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingido (BON e GOYFFON, 1995; ALAN e GOMEZ, 1998a; CHIPPAUX e GODWA, 1988) e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade (CARDOSO *et al.*, 2009). Além disso, existem outros inconvenientes para essa terapia, tais como: (i) a indisponibilidade do soro para algumas regiões rurais do país, onde ocorre a maioria dos acidentes; (ii) variações significativas na composição da peçonha e na reatividade antigênica, devido à diversidade taxonômica e geográfica das serpentes, o que pode levar a sérias limitações clínicas durante a soroterapia; e (iv) limitação da soroterapia de origem animal e sua ineficiência em neutralizar alguns efeitos tóxicos em alguns casos de envenenamento (WEN, 2009; DA SILVA, *et al.*, 2007).

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

1.5.2. Plantas Medicinais e Medicamentos à base de plantas

As plantas medicinais constituem uma alternativa para tratar diversas enfermidades. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), por causa da pobreza e da falta de acesso a medicamentos industrializados, aproximadamente 65 a 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas para os primeiros cuidados de saúde (AKERELE, 1993).

Segundo a Organização Panamericana da Saúde (OPS) considera-se planta medicinal aquela que ao longo dos tempos foi usada pelas populações para prevenir, curar uma doença ou alterar processos fisiopatológicos e é reconhecida por seu efeito benéfico para a saúde (PENSO, 1980; DE CASTRO, 1981; DA CUNHA *et al.*, 2007). Considera-se preparação farmacêutica ou medicina vegetal aquela medicina que é produzida exclusivamente de plantas (partes aéreas e não aéreas, resinas e óleos) em seu estado bruto ou como uma preparação farmacêutica (RATES, 2001; DA CUNHA *et al.*, 2007).

1.5.2.1. Aspectos históricos sobre o uso de plantas medicinais na terapêutica

A utilização de plantas como medicamento decorre ao longo da história do homem. Existem evidências que indicam o uso de plantas medicinais na terapêutica por diversas civilizações antigas (assírios, chineses e egípcios). Em papiros egípcios do ano 2.300 a.C aparecem os nomes de algumas plantas, como: mirra, cânhamo, ópio, aloe, cicuta e cássia, utilizadas nas atividades diárias, como embalsamento de múmias. Através dos escritos de Aristóteles (384-322 a.C), Hipócrates (460-377 a.C) e Teofrasto (370-285 a.C) pode se apreciar que os gregos conheciam e utilizavam muitas plantas medicinais, algumas das quais ainda são usadas (VOEKS, 2004).

As plantas com propriedades medicinais ou tóxicas adquiriram fundamental importância na medicina e na terapêutica grega ao grau de existir uma casta conhecida como “rhizotomoi” chamados procuradores de raízes (HILL, 1965). O interesse romano pela botânica médica tem uma longa e rica história. Os testemunhos neste campo são narrados por grandes estudiosos como Plínio (61-113 d.C) e Galeno (130-200 d.C) (INGLIS, 1968). Ervas, raízes, ungüentos e emplastos eram recursos terapêuticos usados com freqüência na medicina romana. O laserpício (*laserpicium*) era sobremaneira usado como antídoto contra picadas de cobras e de escorpiões (ANDRÈ, 2006).

No século I (d.C.) o grego Pedanius Dioscórides escreveu sua grande obra mestra “Matéria Médica”, um tratado de 600 plantas medicinais conhecidas nesse tempo, entre

elas as Aristolochiaceae. Este tratado foi considerado a bíblia da etnobotânica durante 15 séculos. Durante a idade Média houve uma sensível redução nos relatos sobre uso das plantas com finalidades medicinais. Os quais ressurgiram na segunda metade do século XV e no final do século XVIII, com destaque para as idéias de Paracelso, explicadas na *Teoria das Assinaturas*, apresentadas no livro *Phytognomonica*, de Giambattista della Porta (1538-1615), publicado em 1588. De acordo com a *Teoria das Assinaturas*, as plantas teriam sinais que orientariam sobre o poder curativo destas. Por exemplo, poderiam servir como antiofídicas as plantas que apresentassem desenho foliar que lembrasse o zig-zag da locomoção de serpentes ou qualquer outro “sinal” que sugerisse alguma semelhança com “cobras”. A coloração também poderia ser um “sinal”, assim poderiam servir para o sangue as plantas que apresentassem coloração avermelhada nos frutos, flores ou folhas (VILAR; CARVALHO; FURTADO, 2005).

Nesta época, com a revolução científica, surgiram os herbolários e alquimistas, especialmente nos monastérios do norte da Europa, que exibiram um especial interesse pelo valor medicinal e folclórico das plantas (HILL, 1965; FONT-QUER, 1973).

1.5.2.2. Constituintes ativos de plantas medicinais

São diferentes e numerosos os componentes químicos das plantas, cujas propriedades curativas e alimentares estão profundamente relacionadas com os componentes de carbono, hidrogênio e oxigênio, dando origem a inúmeras combinações químicas (LYON, 1981).

Ademais, as plantas também possuem compostos que protegem a outros sistemas de oxidações, hidrólises, isomerizações, mediante a inibição de sistemas enzimáticos, ou podem até permitir uma melhor absorção pelo organismo, ao facilitarem a passagem de membranas.

Os constituintes ativos das plantas medicinais (Figura 6) são oriundos do metabolismo primário (como carboidratos, lipídeos, eicosanóides, proteínas e peptídeos) e/ou metabolismo secundário destas (como fenóis e derivados, cumarinas, lignóides, flavonóides, isoflavonóides e outros), além de apresentar diversos compostos orgânicos e inorgânicos (DA CUNHA *et al.*, 2007).

É importante salientar que uma planta adquire o *status* de “medicinal” quando possui constituintes farmacologicamente ativos que conferem a essa planta a possibilidade de ser usada direta ou indiretamente na terapêutica com benefícios para o tratamento ou prevenção de uma determinada patologia (DA CUNHA *et al.*, 2007).

Figura 6. Constituintes ativos das plantas medicinais (Adaptado de DA CUNHA *et al.*, 2007).

1.5.3. Plantas com potencial antiofídico

Os indígenas das civilizações mesoamericanas e andinas pré-colombianas acreditavam que para cada doença a natureza provia um remédio facilmente disponível perto de seus assentamentos. Nestas culturas os curandeiros utilizavam toda classe de ritos para o tratamento das picadas de serpentes, como o canto, a dança, sucção, cataplasmas, bebidas e banhos preparados com decocção das raízes e partes aéreas de diversas plantas. Desde o século XVII se sabia que estas práticas eram comuns a todos os povos indígenas da América do Norte, do Sul e Central. Entre os gêneros de plantas destacavam: *Agave*, *Alisma*, *Aristolochia*, *Asclepias*, *Astragalus*, *Bidens*, *Bothrychium*, *Caucalis*, *Crotalaria*, *Daucus*, *Eryngium*, *Euphorbia*, *Fraxinus*, *Hieracum*, *Ipomoea*, *Liatris*, *Lilium*, *Osmorhiza*, *Podophyllum*, *Polygala*, *Polygonatum*, *Plantago*, *Silene*, *Spilanthes* (RUSSELL, 1983).

Durante o século XIX continuou-se entre os povos indígenas das Américas o uso popular de plantas medicinais, para tratar picadas de serpentes sendo que esse conhecimento foi transmitido de geração em geração (OTERO *et al.*, 2000b). Somente a partir do século XX que iniciou-se os testes experimentais para avaliar suas propriedades antiofídicas.

É assim, que mais de 700 plantas têm sido descritas em todo o mundo como sendo utilizadas pela medicina tradicional para tratar as picadas de serpentes (HOUGHTON e OSIBOGUN, 1993; SELVANAYAGAM *et al.*, 1994; REYES; JIMENEZ, 1995).

Atualmente, alguns grupos indígenas ainda utilizam este conhecimento para curar algumas doenças das pessoas em suas comunidades. Este conhecimento tende a desaparecer, quando consideramos que vastas áreas do território nacional do Panamá, e também do cerrado brasileiro, estão dando lugar a regiões de pastagem e monoculturas. A flora panamenha, assim como a brasileira, possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico (JOLY, *et al.*, 1987; 1990; GUPTA *et al.*, 1993; MORS *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005; 2009).

No Panamá, as plantas medicinais com potencial antiofídico são utilizadas principalmente pelos indígenas das tribos Kunas, Guamies, Teribes e Chocos. (JOLY *et al.*, 1987; 1990; GUPTA *et al.*, 1993; CABALLERO-GEORGE *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2005). Estes indígenas concentram-se em reservas, distribuídos assim: (i) Kunas, habitam a comarca de Kuna Yala, reserva de Mandungandi, Wala

Morti, reserva de Murra e Orfila: Alto Chucunaque, povos de Paya, Payita e Púcuro em Alto Tuira; os (ii) Teribes habitam ao longo do rio Teribe e San San na província de Bocas do Touro e os (iii) Guamies habitam nas províncias de Bocas do Touro, Chiriquí e Veraguas, utilizam, em primeira instância, plantas medicinais, as quais tem sido utilizadas por seus ancestrais para tratar diferentes doenças (Figura 7) (JOLY *et al.*, 1987; 1990; GUPTA *et al.*, 1993; 2005).

Figura 7. Localização geográfica dos grupos indígenas que habitam no Panamá (Adaptado de <http://www.vmapas.com/America/Panama/maps-slideshow-pt.html>).

Estudos etnobotânicos realizados por JOLY *et al.* (1987; 1990) e GUPTA *et al.*, (1993; 2005) indicam que os três principais grupos indígenas do Panamá conheciam e faziam uso das mesmas plantas medicinais. Nesses estudos obtiveram-se informações tais como, nome comum da planta utilizada, o mal para qual é usada, como se administrava e a forma de preparar o remédio (JOLY *et al.*, 1987; 1990; GUPTA *et al.*, 1993; 2005). Baseando-se nestes estudos, confeccionou-se uma tabela onde se compilaram as informações das plantas que seriam utilizadas pelos indígenas do Panamá em casos de envenenamento por picadas de serpentes (Tabela 2).

Tabela 2. Informação etnobotânica das plantas usadas pelos indígenas do Panamá no tratamento de acidentes por picadas de serpentes *

Grupo Indígena	Família	Nome Científico	Nome Comum	Parte da planta utilizada	Modo de preparação	Modo de aplicação
Gnobe Bugle	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia odoratissima</i>	Estrella	Caule		
Guamies	Annonaceae	<i>Cymbopetalum costaricense</i>		Ramos	Infusão	Oral
Guamies	Araceae	<i>Dracontium costaricense</i>	Ta	Folhas	Decocção	Oral
Guamies	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia sprucei</i>	Flor de Culebra Bala Yugwo	Toda a planta	Infusão	Oral
Guamies	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia pilosa</i>	Cudrama	Toda a planta	Ferver em água quente	Oral
Guamies	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia silvicola</i>		Caule	Decocção	Oral
Guamies	Commelinaceae	<i>Dichorisandra hexandra</i>	Migran Mingna buguere Roban dloyo (Teribes)	Tubérculos	Decocção	Oral
Guamies	Menispermaceae	<i>Cissampelos tropaeifolia</i>	Mocri (Teribes)	Caule	Decocção	Oral
Guamies	Passifloraceae	<i>Passiflora biflora</i>				
Guamies	Passifloraceae	<i>Passiflora pediculata</i>	Modrera	Caule	Decocção	_____
Guamies	Passifloraceae	<i>Passiflora sexflora</i>	Nguibita tibi	Toda a planta	Decocção	_____
Guamies	Passifloraceae	<i>Passiflora vitifolia</i>	Pasionaria Guate silvestre Sulegusep dup Kusep (Kunas)	Caule	Infusão	_____
Guamies	Rubiaceae	<i>Hamelia patens</i>	Uvero	Casca do caule	Infusão	_____
Guamies	Scrophulariaceae	<i>Russelia sarmentosa</i>		Toda a planta	Decocção	_____
Guamies	Simaroubaceae	<i>Simaba cedron</i>	Cedrion	Frutos	Infusão	_____

* Adaptado de JOLY *et al.*, 1987; 1990; GUPTA *et al.*, 1993; 2005.

Tabela 2. (cont.) Informação etnobotânica das plantas usadas pelos indígenas do Panamá no tratamento de acidentes por picadas de serpentes *

Grupo Indígena	Família	Nome Científico	Nome Comum	Parte da planta utilizada	Modo de preparação	Modo de aplicação
Kunas	Araceae	<i>Dracontium dressleri</i>		Folhas e raízes		Oral
Kunas	Araceae	<i>Xanthosoma mexicanum</i>	Naibe' mor dup sipuguad	Frutos	Infusão	Oral
Kunas	Capparaceae	<i>Cleome serrata</i>	Uerki dup.	Folhas jovens	Decocção	Oral
Kunas	Gesneriaceae	<i>Chrysothemis friedrichsthaliana</i>	Pirguak sipuguad	Toda a planta	Infusão	Oral
Kunas	Labiatae	<i>Hyptis capitata</i>	Iná etolo	Folhas jovens	_____	Oral
Kunas	Monimiaceae	<i>Siparuna SP.</i>	Urgurguia dup	Ponta dos ramos com folhas	Decocção	Oral
Kunas	Moraceae	<i>Dorstenia contrajerva</i>	Ina niilaki'saila Upsensapi (Kuna) Klok Wua ko (teribes)	Toda a planta	Infusão	Oral
Teribes	Araceae	<i>Dracontium sprucearum</i>	Dgur dworoyo, Shlapgur dloyo, Dgurg poglo	Rizoma Tubérculo	Decocção	Oral
Teribes	Araceae	<i>Homalomena wendlandii</i>		Caule	Decocção	Oral
Teribes	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia aff grandiflora</i>	Shlup duir dwroyo	Folhas	Decocção	Oral
Teribes	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia sprucei</i>	Bala-yugwo, Trop shguo	Folhas	Decocção	Oral
Teribes	Convolvulaceae	<i>Ipomoea Alba</i>	Musigui	Folhas; Toda a planta	Decocção	Cataplasma Banho
Teribes	Maranthaceae	<i>Calathea warscewiczii</i>	Gurbum prak	Rizoma Folhas	Maceração Frescas ou morna	Cataplasma
Teribes	Passifloraceae	<i>Passiflora costaricensis</i>	Dgurg tiorku	Caule e Folhas	Decocção	Banho

Adaptado de JOLY *et al.*, 1987; 1990; GUPTA *et al.*, 1993; 2005.

Apesar de várias regiões do mundo e das Américas, assim como no Panamá, usarem as plantas como recurso terapêutico da medicina tradicional no tratamento de picadas de serpentes, poucas dessas plantas têm sido testadas em experimentos bem controlados e ainda menos têm mostrado efetividade frente à peçonha e toxinas de serpentes. O tratamento da medicina tradicional é geralmente orientado a melhorar o paciente dos efeitos locais (dor, edema, necrose) e deter a hemorragia provocada pela peçonha (OTERO *et al.*, 2000b).

Algumas pesquisas têm sido realizadas testando plantas usadas por curandeiros e obtiveram-se resultados promissores de atividade antiofídica. Ainda que estas substâncias tenham sido testadas, comprovando-se sua atividade neutralizante, é preciso realizar estudos fitoquímicos onde se identifiquem e caracterizem os compostos que possuam este potencial inibitório (SOSA *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2004; 2005; 2009).

Uma vez realizado estes estudos e comprovado cientificamente que estas plantas inibem o efeito nocivo das toxinas da peçonha de serpentes, acredita-se que estas plantas podem ser alternativas econômicas para aquelas pessoas que estão mais expostas a serem vítimas de acidentes ofídicos e que não têm o acesso imediato à soroterapia. Estas comunidades que são mais afetadas poderiam fazer uso da medicina natural, a qual poderia reduzir o índice de morte e os traumas que os acidentes por animais peçonhentos como as serpentes causam no Panamá (OTERO *et al.*, 2000a).

Além disso, a contínua busca e identificação de novos compostos que podem ser úteis como alternativas ou complemento da soroterapia por envenenamento por picada de serpente é uma tarefa de grande importância (SOARES *et al.*, 2005; 2009). Tem-se demonstrado cientificamente o grande potencial terapêutico destas plantas contra peçonha de serpentes nas Índias Orientais, Venezuela, América Central e do Sul, tais como, *Cissus assamica* (YANG; WANG; LIU, 1998), *Parkia biglobosa* (ISUZU; HARVEY 2003), *Aristolochia rugosa* e *Aristolochia trilobata* (HAZLETT, 1986; MARTZ, 1992; HOUGHTON; OSIBOGUN, 1993; COE; ANDERSON, 1996), *Costus lasius*, *Dendropanax arboreus* (INDRAYANTO; SETIAWAN; CHOLIES, 1994; INOUE *et al.*, 1996, OTERO, *et al.*, 2000a), *Eclipta prostrata* (MORS *et al.*, 1989; MARTZ, 1992; HOUGHTON; OSIBOGUN, 1993; MELO, 1994; REYES-CHILPA, 1994; ABUBAKAR, *et al.*, 2000), *Bauhinia excisa*

(WONG, 1976), *Costius speciosus* (INDRAYANTO; SETIAWAN; CHOLIE, 1994, INOUE *et al.*, 1996).

No Brasil, comprovou-se experimentalmente a atividade antiofídica de *Casearia sylvestris* (BORGES *et al.*, 2000; 2001; CAVALCANTI *et al.*, 2007), *Mandevilla velutina* e *M. illustris* (BIONDO *et al.*, 2003; 2004), *Baccharis trimera* (JANUÁRIO *et al.*, 2004), *Mikania glomerata* (MAIORANO *et al.*, 2005), *Pentaclethra maculosa* (da SILVA, *et al.*, 2005; 2007), *Cordia verbenacea* (TICLI *et al.*, 2005), *Bauhinia forficata* (OLIVEIRA *et al.*, 2005), *Sapindus saponaria* (da SILVA *et al.*, 2009), *Eclipta alba* (DIOGO *et al.*, 2010), *Jacaranda decurrens* (GACHET e SCHÜHLY, 2009), *Anacardium humile* (COSTA *et al.*, 2009), entre outras.

Na África, também se apresentam relatos de neutralização de efeitos tóxicos da peçonha de serpentes por compostos bioativos extraídos de plantas, tais como: *Steganotaenia araliacea*, *Combretum collinum*, *Solanum incanum* e três espécies de *Grewia* (*G. bicolor*, *G. fallax* e *G. truncata*), *Vernonia*, *Erythrina abyssinica*, *Sansevieria kirkii*, *Mucuna pruriens*, *Parkia biglobosa*, *Schumanniphyton magnificum*, *Mucuna pruriens* var. *utilis* leaves, *Strophanthus gratus* e *Strophanthus hispidus* (KOKWARO, 1991; HOUGHTON e OSIBOGUN, 1993; AGUIYI *et al.*, 1999; ABUBAKAR, *et al.*, 2000; GUERRANTI *et al.*, 2002).

A estrutura de alguns inibidores com atividade antiofídica obtidos de extratos vegetais, juntamente com o tipo de atividade neutralizante associada a estes, são mostrados a seguir (Tabela 3).

Tabela 3. Compostos químicos isolados de plantas antiofídicas*.

Família	Espécie da planta	Compostos isolados
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia</i> sp.	Ácido aristolóquico (AA)
Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	diterpeno clerodano (Bt-CD)
Betulaceae	<i>Betula alba</i>	Betulina e ácido betulínico
Polygalaceae	<i>Bredemeyera floribunda</i>	Bredemeierosídeos B e D
Leguminosae	<i>Brongniartia podalyrioides</i> “Cabeça de Negro”	Edunol Cabenequinas A-I e A-II
Boraginaceae	<i>Cordia verbenacea</i>	Ácido rosmarínico (Cv-RA)
Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i>	Ar-turmerone
Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	Cinarina
Papilionaceae	<i>Derris sericea</i>	Derricidina
Papilionaceae	<i>Derris urucu</i>	2,5-dihidroxi-3,4-dihidroxipirrolidina
Moraceae	<i>Dorstenia brasiliensis</i>	Bergapten
Asteraceae	<i>Eclipta prostrata</i>	Wedelolactona, Sitosterol e Estigmasterol, D-manitol
Asteraceae	<i>Eclipta prostrata</i>	Demetilwedelolactona
Boraginaceae	<i>Ehretia buxifolia</i>	Ehretianone
Combretaceae	<i>Guiera senegalensis</i>	Taninos
Fabaceae	<i>Harpalyce brasiliensis</i>	Edunol
Apocynaceae	<i>Hemidesmus indicus</i>	2-hidróxi-4-metóxi ácido benzóico
Apocynaceae	<i>Mandevilla velutina</i>	Esteróides
Asteraceae	<i>Mikania glomerata</i>	Coumarina
Fabaceae	<i>Mimosa pudica</i>	D-manitol, sitosterol
Papilionaceae	<i>Periandra mediterranea</i>	Triterpenos, esteróis, Sitosteróis e Periandrininas (mixt.)
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus klotzchianus</i>	Quercetina
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus klotzchianus</i>	Rutina
Piperaceae	<i>Piper caldense</i>	Caldensina
Sapindaceae	<i>Sapindus saponaria</i>	Flavonóides
Asteraceae	<i>Silybum marianum</i>	Silimarina
Loganiaceae	<i>Strychnos nux vomica</i>	Amida (SNVNF)
Symplocaceae	<i>Symplocos racemosa</i>	Benzoil-salireposido salireposido
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	12-metóxi-4-metil-voacalotina (MMV)
	<i>Thea sinensis</i>	Melanina
Asteraceae	<i>Vernonia condensata</i>	Ácido caféico e derivados do Ácido clorogênico
Musaceae	<i>Musa paradisiaca</i>	Ácido gálico
Fabaceae	<i>Pentaclethra macroloba</i>	Macrolobinas-A e B,
Fabaceae	<i>Pithecellobium dulce</i>	Ácido gálico, Ácido tânico
Asteraceae	<i>Pluchea indica</i>	b-sitosterol estigmasterol

*Adaptado de Soares *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2007; Gomez, *et al.*, 2007.

1.6. O gênero *Aristolochia*

A Aristolochiaceae é uma pequena família pertencente à super-ordem Magnoliiflorae, sendo considerada uma das primitivas angiospermas herbáceas que compreende sete gêneros e aproximadamente 625 espécies. Sua distribuição é pantropical crescendo no mediterrâneo a uma temperatura de 20°C. O gênero *Aristolochia* é o maior contendo 400 espécies de herbáceas perenes, das quais somente três são nativas do nordeste da Europa e as demais podem ser encontradas na Ásia tropical, África e América do Sul (TIAN-SHUNG *et al.*, 2005).

No Panamá a família é representada pelo o gênero *Aristolochia* (Figura 8).

Figura 8. Exemplar de *Aristolochia sprucei* do Panamá. Planta trepadeira, lenhosa, perene, com fruto em forma de cápsula (Foto de Isela González, Panamá, 2009).

Muitas espécies de *Aristolochia* fornecem à medicina popular as plantas usadas contra picadas de serpentes, as quais são utilizadas como um tônico e um redutor da febre.

Em diversos países, espécies relacionadas a esta planta têm sido amplamente estudadas, no entanto, não no Panamá. Nas Índias ocidentais, Venezuela, América Central e do Sul, as espécies *Aristolochia rugosa* e *Aristolochia trilobata* são plantas utilizadas pelos indígenas contra picadas de serpentes (SANCHEZ e RODRÍGUEZ-ACOSTA, 2008). É muito conhecido o uso de espécies de *Aristolochia* na medicina popular chinesa assim como em outras partes do mundo. Assim, diversas espécies de *Aristolochia* são usadas como medicamentos e tônicos (Tabela 5).

Em alguns estudos realizados com espécies de *Aristolochia* (Tabela 6) foram demonstrados a detecção de metabólitos secundários como compostos nitrogenados, ácido aristolóquio e aristoloquina, os quais tem propriedades imunoestimulatória, anti-inflamatória e inibição de PLA₂s (CHEN e ZHU, 1987; VISHWANATH e VEERABASAPPA, 1987; VISHWANATH; FWAZY; FRANSON, 1988; HOUGHTON e OSIBOGUN, 1993; HASHIMOTO *et al.*, 1999; COE e ANDERSON, 2005; JIMÉNEZ-FERRER *et al.*, 2005). SANCHEZ e RODRÍGUEZ-ACOSTA (2008) descreveram que o ácido aristolóquio inibe a inflamação, estimulada por complexos imunes e agentes não imunes, tais como, o óleo croton ou a carragenina.

O gênero *Aristolochia* tem apresentado propriedades neutralizantes contra a peçonha de serpentes, como por exemplo, inibição das peçonhas de *Naja naja atra* e *Bungarus multicinctus* (VISHWANATH; KINI; GOWDA, 1987). Também foi observado que plantas que possuem o ácido aristolóquio inibem as fosfolipases A₂ isoladas de serpentes (VISHWANATH; VEERABASAPPA; GOWDA, 1987).

Tabela 4. Usos medicinais tradicionais das espécies de *Aristolochia* **

Espécies	Parte usada	Uso popular
<i>A. acutifolia</i>	Toda a planta	Tratar a erisipela
<i>A. albida</i>	Rizoma	Ungüento para doenças da pele; tratar a disenteria, cólicas gastrointestinais e antiofídico; como adjuvante
<i>A. argentina</i>	Partes aéreas	Como emenagogo, antiséptico, diaforético e diurético, tratamento de artrite, antiofídico e anti-prurido
<i>A. baetica</i>	Raiz	Como emenagogo e anticâncer
<i>A. birostri</i> , <i>A. bracteata</i>	Raiz	Anticâncer
	Toda a planta	Como um emenagogo, antiparasita, purgante, repelente de mosquito, analgésico e inseticida
<i>A. brevipes</i>	Rizoma	Tratamento da artrite, antiparasita, analgésico para dentes, antiofídico
<i>A. chamissonis</i>	Toda a planta	Para a debilidade
<i>A. chilensis</i>	Raiz	Como um emenagogo
<i>A. cinnabarina</i>	Raiz	Analgésico
<i>A. clematitis</i>	Raiz	Anti câncer, problemas menstruais, úlceras em pernas, antiparasita e antitumoral, como um depurativo e repelente de insetos
<i>A. contorta</i>	Raiz	Anticâncer
<i>A. constricta</i> **	Parte aérea	Antiespasmódico, analgésico, anticâncer, antiparasita, anti-inflamatório, como emenagogo e antiofídico
<i>A. cucurbitifolia</i>	Frutos, raiz	Como analgésico, antiflogístico, expectorante, antitussígeno, antiasmático; antiofídico e anti-inflamatório
<i>A. debilis</i>	Raiz	Como bronquiático; anti-hipertensivo
<i>A. gibbertii</i>	Toda a planta	Anti-inflamatório, analgésico para dor estômago e como remédio para a indisposição
<i>A. gigantea</i>	Toda a planta	Como um emenagogo, anticéptico, abortivo, antiparasita e enfermidades da pele
<i>A. grandiflora</i>	Parte aérea	Como agente uterotônico, citotóxico e antimicrobiano; antiofídico; como repelente de larvas de moscas e moscas.
<i>A. heterophylla</i>	Frutos, raiz	Como expectorante, antitussígeno, analgésico e antiasmático
<i>A. indica</i>	Raiz	Como um emenagogo, cardiotônico, diurético, anti-inflamatório, abortivo, sedativo leve; antiparasita, antiofídico.
<i>A. kaempferi</i>	Toda a planta	Antiasmático, antitussígeno, contra hemorróidas; antiofídico, antibacteriano, antiprurido, hipotensivo, expectorante e emético.
<i>A. kankauensis</i>	Frutos, raiz	Como expectorante, antitussígeno, analgésico e antiasmático
<i>A. liukuensis</i>	Raiz	Como anti-inflamatório, detoxicante e analgésico.
<i>A. macroura</i>	Toda a planta	Antiofídico e antireumático; como estimulante circulatório, anti-inflamatório, antiséptico e abortivo.
<i>A. manshuriensis</i>	Toda a planta	Como bronquiático; anti-hipertensivo
<i>A. maurorum</i>	Toda a planta	Como um antiséptico, a
<i>A. mollissima</i>	Raiz	Como analgésico, anticâncer, antiparasita, anti-inflamatório, antireumático
<i>A. paucinervis</i>	Frutos, raiz	Tratamento de infecção da pele, gases, gangrena, analgésico e infecção do trato respiratório superior.
<i>A. rotunda</i>	Toda a planta	Anticâncer e como um depurativo
<i>A. rodriguesii</i>	Raiz, partes aéreas	Como abortivo e anti-inflamatório; antiofídico
<i>A. triangularis</i>	Córtex	Como antireumático, agente anti-infertilidade, diaforese, diurético, antiséptico, como um emenagogo, abortivo, antiparasita e enfermidades da pele.
<i>A. tuberosa</i>	Raiz	Antiparasita, antiofídico
<i>A. yunnanens</i>	Raiz	Tratamento de enfermidades gastrointestinais, antiparasita e analgésico
<i>A. zollingeri</i>	Frutos, raiz	Como um expectorante, analgésico, antitussígeno, antiasmático, antiofídico

Adaptado de TIAN SHUNG *et al.* (2004).** *A. constricta* é sinonímia de *A. sprucei*

Tabela 5. Informação etnofarmacológica validada cientificamente das espécies de *Aristolochia* *.

Espécies	Parte usada	Bioatividade
<i>A. acutifolia</i>	Toda a planta	Insecticida, antiespasmódico
<i>A. argentina</i>	Partes aéreas	Insecticida, antibacteriano, antifúngico
<i>A. bracteata</i>	Sementes	Toxicidade, Anti-inflamatório, antibacteriano analgésico
<i>A. bracteolata</i>	Toda a planta	Antiplasmodial
<i>A. constricta</i>**	Toda a planta	Antiespasmódico
<i>A. debilis</i>	Toda a planta	Inibição da atividade COX-2, Inibição da atividade iNOS, Inibição de testosterona-5-reductase, de formação de lipídeo peroxidase, de formação de melanina
<i>A. elegans</i>	Toda a planta	Antimitótico, Antiviral
<i>A. fructus</i>	Toda a planta	Antagonista da atividade do receptor Leucotrieno B ₄
<i>A. grandiflora</i>	Toda a planta	Habilidade neutralizante contra os efeitos das hemorragias
<i>A. indica</i>	Partes aéreas, raízes	Antibacteriano, inibitória do tumor, atividade abortiva, efeito espermato gênico
<i>A. macroura</i>	Folhas	Citotoxicidade
<i>A. manshuriensis</i>	Suspensão celular, Cultivo	Atividade cardiotônica e hipóxica, Efeito sinérgico para pesticida
<i>A. mollissima</i>	Toda a planta	Inibição da mutagênese da Trp-P-1
<i>A. aff. Orbicularis</i>	Raízes	Antireumático, Contraceptivo, tratamento da artrite
<i>A. papillaris</i>	Toda a planta	Efeito repelente contra <i>Sitophilus zeamais</i>
<i>A. paucinervis</i>	Rizomas, Folhas	Atividade relaxante do músculo liso
<i>A. taliscana</i>	Raízes	Bacteriostático, bactericida do <i>Helicobacter pylori</i> , antidermatofítico, antifúngico
<i>A. triangularis</i>	Toda a planta	Tripanocidal
<i>A. trilobata</i>	Folhas, Córtex	Citotoxicidade, antitumoral, ação mitótica
		Antibacteriano, anti-inflamatório

*Adaptado de TIAN SHUNG *et al.* (2004).** *A. constricta* é sinonímia de *A. sprucei*

No Panamá, embora exista a soroterapia antiofídica, algumas comunidades distantes, não têm acesso imediato a esse recurso terapêutico ou não têm as condições ótimas de armazenagem e utilizam algumas plantas que formam parte da farmacopéia da medicina tradicional, para tratar as pessoas que são picadas por serpentes (JOLY *et al.*, 1987; 1990; GUPTA *et al.*, 1993; 2005). Por esta razão, é necessário estudar espécies de plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional do Panamá contra os efeitos das toxinas e da peçonha de animais peçonhentos.

Diversos estudos (REYES-CHILPA *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1999; BORGES *et al.*, 2000, 2001; OTERO *et al.*, 2000a, b; NUÑEZ *et al.*, 2004; 2005; DA SILVA *et al.*, 2005; PEREAÑEZ *et al.*, 2008) têm sido realizados testando a atividade inibitória de extratos de diversas espécies de plantas contra os efeitos das toxinas e às atividades da peçonha de *Bothrops asper* (Tabela 7). No entanto, nenhum desses estudos avaliou a atividade inibitória de extratos de plantas da família Aristolochiaceae.

Portanto, nosso trabalho avaliou o potencial antiofídico de acordo à indicação popular da espécie *Aristolochia sprucei* e composto isolado contra as ações tóxicas da peçonha de *Bothrops asper*, ambos procedentes do Panamá.

Tabela 6. Extratos de plantas validados cientificamente com atividade inibitória contra a peçonha e toxinas de *Bothrops asper*. *

Espécie de planta	Família	Peçonha ou Toxina ^a	Atividade inibida ^b
<i>Brongniartia podalyrioides</i>	Leguminosae	Peçonha	L
<i>Brongniartia intermédia</i>	Leguminosae	Peçonha	L
<i>Bursera simaruba</i>	Urseraceae	Peçonha	H
<i>Persea americana</i>	Lauraceae		H
<i>Phoebe brenesii</i>	Lauraceae		H
<i>Clusia torresii</i>	Clusiaceae		H
<i>Clusia palmana</i>	Clusiaceae		H
<i>Croton draco</i>	Euphorbiaceae		H
<i>Pimenta dióica</i>	Myrtaceae		H
<i>Sapindus saponaria</i>	Sapindaceae		H
<i>Smilax cuculmeca</i>	Smilacaceae		H
<i>Viola koschnyi</i>	Myristicaceae		H
<i>Casearia sylvestris</i>	Flacourtiaceae	Peçonha, metaloproteases, PLA ₂	H, M, E, D, P, PLA ₂
<i>Allamanda cathartica</i>	Apocynaceae	Peçonha	H
<i>Bixa orellana</i>	Bixaceae		L, H, E, D, C, PLA ₂
<i>Brownea rosademonte</i>	Caesalpiniaceae		L, H, E, D, C, PLA ₂
<i>Sena doriensis</i>	Caesalpiniaceae		H, E, D, C, PLA ₂
<i>Capsicum frutescens</i>	Solanaceae		H
<i>Castilla elástica</i>	Moraceae		H
<i>Ficus nymphaeifolia</i>	Moraceae		H, E, D
<i>Citrus limon</i>	Rutaceae		L, H, E, C
<i>Dracontium croatii</i>	Araceae		L, E, D, PLA ₂
<i>Gonzalagunia panamensis</i>	Rubaceae		H, E, D, C, PLA ₂
<i>Heliconia curtispatha</i>	Heliconiaceae		L, H, E, D, C, PLA ₂
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Passifloraceae		H
<i>Philodendron tripartitum</i>	Araceae		H
<i>Piper arborium</i>	Piperaceae		H
<i>Pleopeltis percussa</i>	Polypodiaceae		L, H, E, D, C, PLA ₂
<i>Pseudoelephantopus spicatus</i>	Asteraceae		H
<i>Renealmia alpinia</i>	Zingiberaceae		L, H, E, PLA ₂
<i>Sida acuta</i>	Malvaceae		L, H
<i>Siparuna techaphora</i>	Monimiaceae		H
<i>Strutans orbicularis</i>	Loranthaceae		L, H, E, C, PLA ₂
<i>Tabebuia rósea</i>	Bignoniaceae		L, H, E, D, C, PLA ₂
<i>Trichomanes elegans</i>	Hymenophyllaceae		L, H, E, D, C, PLA ₂
<i>Piper peltatum</i>	Piperaceae	Peçonha, PLA ₂	M, E, PLA ₂
<i>Piper umbellatum</i>	Piperaceae		M, E, PLA ₂
<i>Pentaclethra macroloba</i>	Fabaceae	Peçonha, metaloproteases	H, PLA ₂
<i>Heliconia lathispatha</i>	Heliconiaceae	Peçonha	C, P, PLA ₂
<i>Heliconia wagnerina</i>	Heliconiaceae		C, P, PLA ₂

*Adaptado de Lomonte *et al.* (2009).^a PLA₂: fosfolipase A₂^b L: letalidade, H: hemorrágica, C: coagulante, D: desfibrinante, M: miotóxica, P: proteolítica, PLA₂: fosfolipase A₂

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve com objetivo avaliar o potencial antiofídico dos extratos vegetais e composto isolado da planta *Aristolochia sprucei* contra as ações farmacológicas e tóxicas da peçonha de *Bothrops asper*, ambos procedentes do Panamá.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar a capacidade dos extratos vegetais e composto isolado na neutralização dos efeitos farmacológicos e tóxicos da peçonha de *Bothrops asper* quanto a:

- Atividade fosfolipase A₂
- Atividade miotóxica
- Atividade indutora de edema
- Atividade coagulante
- Atividade hemorrágica

2.2.2. Isolar e caracterizar estruturalmente o composto bioativo da planta *Aristolochia sprucei* contra as ações farmacológicas e tóxicas da peçonha de *Bothrops asper* por meio de análises Cromatográficas e RMN

2.2.3. Avaliar a interação do complexo enzima (toxina) - inibidor (composto isolado) pela via de simulação computacional e por dicroísmo circular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peçonha e miotoxinas

A peçonha foi obtida de serpentes adultas *Bothrops asper* do Panamá capturadas em Caldera (latitude: 8°39'6.37"N; longitude: 82°23'30.18" O) e Gómez (San Andrés) (latitude 8°35'12.04"N, longitude 82°44'16.38"O) na província de Chiriquí e em Gamboa (latitude 9°07'17.81"N, longitude 79°41'36.94"O) na província do Panamá (Fig. 12), pelo Prof. Dr. Aristides Quintero Rueda (Departamento de Química, Faculdade de Ciências Naturais e Exatas, FCNE, Universidade Autônoma de Chiriquí, UNACHI) e Isela González Rodríguez, mestrande da FCFRP-USP. O ponto de coleta foi marcado utilizando um sistema de posicionamento global "Global Positionment System" (GPS), modelo Garmin 60CSx. Os espécimes foram depositados e mantidos no cativeiro no serpentário do Gamboa Rain Forest Resort, Panamá, e autenticados com a colaboração do Dr. Wilson Fernandes (Chefe do Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan - SP, Brasil) e da Profa. Dra. Ida Sano-Martins (Chefa do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan-SP). A peçonha bruta foi obtida por manipulação manual das serpentes mediante picada em um copo de coleta coberto com parafilm. A peçonha foi centrifugada a 1000 xg por 15 minutos, e o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C com a colaboração da Profa. Dra. Nora Ortiz de Moreno (Departamento de Microbiologia, Faculdade de Medicina, Universidade do Panamá).

As miotoxinas bothropstoxinas-I (Lys49 BthTX-I) e II (Asp49 BthTX-II) de *Bothrops jararacussu* (HOMSI BRANDEBURGO *et al.*, 1988), a miotoxina II (Lys49 MTX-II) de *Bothrops asper* (QUINTERO, 2009), e a moojenitoxina I (Lys49 MjTX-I) de *Bothrops moojeni* (SOARES *et al.*, 2000a) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Andreimar M. Soares (FCFRP, USP).

3.2. Animais

Para o estudo das atividades, biológicas da peçonha utilizaram-se camundongos machos, linhagem Suíça (*Swiss*), pesando entre 18 a 22 gramas. Os animais foram adquiridos do Biotério Central do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), e foram mantidos em local e condições adequados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação

Animal (COBEA) e com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (CEUA No. 08.1.1096.53.1) (Anexo No. 1).

3.3. Material Vegetal

A planta incluída neste trabalho foi selecionada de acordo com os seguintes critérios:

1. Existência de informes na literatura que indicavam se a planta selecionada era usada em outros países por sua ação neutralizante contra os efeitos tóxicos de peçonhas de serpentes.
2. Existência de informes na literatura que indicavam se a planta selecionada era usada no Panamá por sua ação neutralizante contra os efeitos tóxicos de peçonhas de serpentes, e que os efeitos não tenham sido avaliados cientificamente.
3. Existência de informação não bibliográfica referente ao uso das plantas em medicina folclórica que permita avaliar cientificamente seu uso.

As coletas do vegetal foram realizadas com aprovação da Autoridade Nacional do Ambiente (ANAM) do Panamá (Permissão Científica de Coleta No. SE/P-50-07) (Anexo No. 2) na Serra Llorona (latitude: 9°17'12.49" N; longitude: 79°37'02.81" O) e Santa Rita (latitude: 9°20'34.90" N; longitude: 79°48'21.27" na Província de Colón.

As exsiccatas foram identificadas pelo biólogo Alex Martinez (Centro de Farmacognosia da Flora Panamenha (FLORPAN), Universidade do Panamá) e uma exsicata de cada espécime (Registro 8234a) foi depositada no Herbário da Escola de Biologia, da Faculdade de Ciências Naturais e Exatas, Universidade do Panamá, com o sob a diretoria da Professora MSc. Mireya Correa.

Após a coleta, o material *in natura* foi separado em folhas e caule. Para evitar degradação dos compostos químicos, o material foi secado colocando-se um ventilador que proporcionara ar às amostras durante uma semana. As amostras que não secaram totalmente foram levadas ao Centro de Pesquisa de Farmacognosia da Flora Panamenha (CIFLORPAN) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Panamá.

As plantas foram colocadas por 24 horas em uma estufa seca Equarthem a 50°C. Posteriormente, o material foi triturado em moinho de facas Thomas-Wiley

(Laboratório Mill Model 4) para pulverização do material com corte grosso e tamisação com *mesh* 50 para que possa ser devidamente armazenado.

O material pulverizado foi exportado para o Brasil ao Laboratório de Bioquímica Toxicológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto com aprovação da Autoridade Nacional do Ambiente (ANAM) do Panamá (Permissão de Exportação No. SEX/P-66-07) (Anexo No. 3).

Figura 9. Locais de coleta (destacadas em círculo vermelho) das serpentes *Bothrops asper* (Gómez e Caldera na Província de Chiriquí e Gamboa na Província de Panamá) e de *Aristolochia sprucei* (Santa Rita na Província de Panamá e Serra Llorona na Província de Colón, ambos destacadas em círculo azul) (Fonte: Mapa gerado e adaptado com o software Google Earth versão 5.0.1).

3.4. Preparações dos extratos

O material vegetal acondicionado segundo os procedimentos relatados acima foi submetido a processo de extração em água quente por 24 horas e mantido ao abrigo da luz. Os extratos aquosos foram filtrados e liofilizados. Os resíduos da filtração secaram-se em estufa e foram submetidos a uma nova extração com solventes de diferentes polaridades (acetato de etila e metanol), e subsequente fracionamento cromatográfico para obtenção de frações puras.

3.5. Determinação quantitativa de proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras utilizadas, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de extinção a 1,0 mg/mL em 278 nm de 0,666 (DOTY; GEIDUSCHEC, 1953).

3.6. Protocolo de neutralização

Os ensaios de neutralização foram feitos usando uma relação peçonha: extrato vegetal de 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:30 (m/m), com uma pré-incubação de 30 minutos a 37°C. Após este período, as atividades enzimáticas, tóxicas e farmacológicas da peçonha bruta e das miotoxinas foram realizadas como descrito a seguir, mantendo os seguintes grupos:

Grupo (a): Peçonha bruta + PBS (controle positivo)

Grupo (b): Peçonha bruta + extrato vegetal (ou componente isolado)

Grupo (c): Extrato vegetal + PBS (controle negativo)

Grupo (d): DMSO + PBS (controle diluente)

3.7. Atividades enzimáticas, tóxicas e farmacológicas

3.7.1. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988). O experimento consiste na elaboração de um gel (CaCl₂ 0,01 M; gema de ovo 1:30 (v/v) PBS, pH 7,2; eritrócitos 1:3 (v/v) PBS; ágar bacteriológico 1%; azida de sódio 0,005%, sendo o volume final

completado com PBS) que é vertido em placas em temperatura de 45-50°C. Após a solidificação do gel foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) e aplicadas nas amostras, em volume final de 40 µL. As amostras constaram de peçonha bruta ou toxina previamente incubada com os diferentes extratos e frações, por 30 min a 37°C, em diferentes proporções. Os géis contendo as amostras foram colocados em estufa a 37°C por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel é um indicativo de atividade e foram medidos (cm) para a quantificação da atividade fosfolipásica.

Realizaram-se determinações por quadruplicado. A atividade fosfolipásica indireta foi definida como o diâmetro em milímetros da área de hemólise (mm ± SD).

3.7.2. Atividade miotóxica

A miotoxicidade foi induzida em grupos de 5 camundongos *Swiss* machos (18-22 g) através de injeção i.m. (intramuscular), no músculo gastrocnêmio direito, de 50 µL das diferentes concentrações da peçonha bruta ou toxina (25 µg), diluídos em solução salina tamponada em fosfato (PBS) e previamente incubadas com os diferentes extratos e frações, por 30 min a 37°C, em diferentes proporções. Três horas depois, o sangue dos camundongos foi coletado, por corte na extremidade da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugado a 480 *xg* por período de 20 minutos. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se 4 µL de plasma incubados com 1,0 mL de reativo do kit CK-UV cinético (Bioclin) dissolvido em água destilada, por 3 min a 37°C, através de leituras em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade foi expressa em unidades/litro (média ± SD). Uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (SOARES, *et al.*, 2000a; b).

3.7.3. Atividade indutora de edema

O edema foi induzido em grupos de 5 camundongos *Swiss* machos (18-22 g) os quais receberam injeções por via i.d. (intradérmica) na região subplantar da pata direita, 50 µL de soluções contendo 10 µg da peçonha bruta ou toxina, dissolvidos em PBS e previamente incubadas com os diferentes extratos e frações, por 30 min a 37°C, em diferentes proporções. A primeira leitura das patas foi realizada antes da inoculação das amostras (tempo 0). O aumento da área na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão (Mitutoyo, Japão) em um intervalo

de 0,5, 1 e 3 horas depois da injeção e expresso em mm de edema induzido (SOARES *et al.*, 2000a).

3.7.4. Atividade coagulante

A dose mínima coagulante (DMC), definida como sendo a quantidade de amostra capaz de coagular o plasma humano citratado, num tempo de 60 segundos (GENÉ *et al.*, 1989), foi avaliada com a peçonha bruta de *Bothrops asper* do Panamá (10, 20 e 40 µg). Amostras contendo a peçonha foram dissolvidas em PBS e depois adicionadas ao plasma citratado mantido a 37°C. Para as provas de neutralização a peçonha foi previamente incubada com os diferentes extratos e frações, por 30 min a 37°C, em diferentes proporções. A atividade foi caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em comparação com o tempo de coagulação do controle contendo cloreto de cálcio 0.2 M. As frações e a peçonha foram previamente incubadas a 37°C durante 30 min e em seguida adicionadas a 200 µL de plasma, sendo cronometrado o tempo de coagulação.

3.7.5. Atividade hemorrágica

Esta atividade foi realizada segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984). Foram utilizadas 50 µL das amostras contendo 50 µg da peçonha diluída em PBS injetando-se por via i.d. (intradérmica) no dorso de 5 camundongos machos de 18-22 g. Após 3 horas, os animais foram sacrificados com CO₂, as peles removidas e os halos hemorrágicos medidos em dois ângulos retos e expressos em cm. Define-se como dose mínima hemorrágica (DMH) a mínima concentração das peçonhas necessária para produzir um halo com cerca de 1 cm de diâmetro. As amostras contendo a peçonha e os extratos vegetais e suas respectivas frações foram incubadas em diferentes proporções por 30 minutos a 37°C. Uma vez sacrificados, os animais foram reencaminhados ao Biotério Central para incineração.

3.8. Fracionamento Cromatográfico

Para o fracionamento cromatográfico realizaram-se estudos em colaboração com o Prof. Dr. Norberto P. Lopes (FCFRP-USP) e Prof. Dr. Paulo S. Pereira (UNAERP).

3.8.1. Cromatografia em Coluna

Cerca de 470 mg de folhas de *Aristolochia sprucei* foram submetidas à extração através de maceração contínua à temperatura ambiente em 2,5 mL de diclorometano, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna cromatográfica de vidro contendo sílica gel 60 (70-250 mesh ASTM) e fracionado utilizando como eluente hexano e acetato de etila em diferentes proporções com gradientes crescentes de polaridade. No processo de eluição foi adicionada a coluna 150 mL de hexano (duas vezes), seguido de 150 mL de solvente na proporção 5 % de acetato de etila e 95 % de hexano (duas vezes). Posteriormente, adicionou-se 150 mL de 10 % de acetato de etila e 90 % de hexano, seguido de 150 mL de 15 % de acetato de etila e 85 % de hexano (duas vezes). Seguido de 200 mL na proporção 20 % de acetato de etila e 80 % de hexano. Logo, colocou-se 200 mL da proporção 25 % de acetato de etila e 75 % de hexano; seguido de 200 mL da proporção 50 % de acetato de etila e 50 % de hexano; posteriormente, colocou-se 200 mL da proporção 75 % de acetato de etila e 25 % de hexano e finalmente, 200 mL de acetato de etila 100 %.

No processo de fracionamento foram coletadas 101 frações de 15,5 mL/frasco. O solvente de cada fração obtida foi eliminado por evaporação a temperatura ambiente o que resultou na obtenção de um precipitado em cada frasco que foi solubilizado com metanol, acetato de etila e diclorometano, com ajuda de um sonificador.

3.8.2. Cromatografia em camada delgada

Uma alíquota do precipitado solubilizado com metanol, acetato de etila e diclorometano correspondente a cada fração obtida do análise cromatográfico em coluna foi colocada com um pequeno capilar na parte inferior de placas cromatográficas de gel de sílica 60 PF₂₅₄. No sitio de aplicação da amostra formou-se uma pequena mancha circular.

As placas cromatográficas de sílica gel contendo as amostras foram colocadas em cubas contendo 50 mL de solvente, na proporção 30 mL de hexano e 20 mL de acetato de etila. Depois que o solvente ascendeu pelas placas, estas foram retiradas das cubas e secas até que estiveram livres do solvente. Para a visualização da fluorescência dos compostos, as placas foram reveladas a luz ultravioleta Minerallight 254 e 365 nm. Posteriormente, as cromatoplasmas foram nebulizadas com ácido sulfúrico a 5% em etanol (H₂SO₄-CH₃-CH₂-OH) e 1 % de

ácido nítrico (HNO_3), como revelador esquentando as placas sobre uma prancha térmica por 5 min a $75^\circ \pm 10^\circ\text{C}$.

Em função do "índice de retenção" de cada composto (R_f), as 101 frações obtidas na cromatografia de coluna foram reunidas em 70 frações, as quais foram novamente testadas em cromatografia da camada delgada e pela similaridade de seu R_f agruparam-se em 23 frações.

3.8.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O extrato bruto da planta *Aristolochia sprucei* de folha e caule com o solvente acetato de etila, foi analisado mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando uma coluna analítica Supelco^{TM} LC18 (25 cm x 4,6 mm, Supelco®) em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo CLASS-LC10).

O material foi (analisado em duas condições apolar e polar) em gradiente linear:

3.8.3.1. Substâncias Polares

O tempo de corrida foi fixado em 40 minutos utilizando fluxo de 1,0 mL/min, coletando-se frações de 3,0 mL/tubo monitoradas a 254 nm em espectrofotômetro ultravioleta, com gradiente crescente de 10-66% MeOH de 0-32 min, de 32-35 min gradiente decrescente de 66-10% MeOH até 10% MeOH de 35-40 min da corrida.

3.8.3.2. Substâncias Apolares

O tempo de corrida foi fixado em 35 minutos utilizando fluxo de 1,0 mL/min, coletando-se frações de 3,0 mL/tubo monitoradas a 210 e 330 nm em espectrofotômetro ultravioleta, com gradiente crescente de 40-80% MeOH de 0-15 min, 80-100% MeOH de 15-20 min, 100% MeOH de 20-30 min para decrescer com 100-40% MeOH de 30-33 min até 40% MeOH de 33-35 minutos.

Foi utilizado como padrão ácido aristolóquio ($\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{NO}_7$, PM. 341,27 g/mol) da Sigma (No. A5512).

3.9. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob a supervisão de Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva.

As frações separadas por CLAE foram analisadas por RMN, para isso de 1-5 mg das amostras polares foram colocados em tubos para ressonância e dissolvidas em 500 μL de água deuterada (D_2O) e as amostras apolares dissolvidas em 500 μL de clorofórmio deuterado e dimetilsulfóxido deuterado.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-500 [500.134 MHz (^1H) e 125.772 MHz (^{13}C)] usando clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. Os dados espectrais representam a média de 50 varreduras (0,2 s/varredura).

3.10. Análise de Espectros de Dicroísmo Circular

A análise de espectros de dicroísmo circular da moojenitoxina I, MjTX-I de *Bothrops moojeni* e bothropstoxina-II, BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, com inibidor, ácido aristolóquio de *A. sprucei*, foi analisado com a colaboração do Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes (Depto. de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP, Brasil).

Os espectros de dicroísmo circular para as PLA_2 s miotóxicas (BthTX-II e MjTX-I) com inibidor (ácido aristolóquio) foram mensurados em um espectropolarímetro JASCO J-815 (JASCO Inc., Tóquio, Japão) usando cubeta de quartzo de 0,5 mm de comprimento e os seguintes parâmetros: velocidade de digitalização de 100 nm/min; largura de banda de 2 nm; resolução de 0,5 nm e de temperatura 20°C.

As amostras foram preparadas por dissolução de 0,15 mg de cada PLA_2 miotóxica (BthTX-II e MjTX-I) em 100 μL de água deionizada ultrapura a concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$, submetidas a uma centrifugação (spin) a 4°C e suas concentrações (0,6 mg/mL) foram verificadas em espectrofotômetro –

Nanodrop. Essa solução de proteína foi utilizada como solução estoque para uma solução a 250 µg/mL, no volume de 200µL. Para as medidas com inibidores, foi utilizada uma proporção de 8 moléculas de ligante para 1 molécula de proteína. Cada espectro corresponde à média de 35 acumulações. Os dados foram coletados no intervalo de 185-260nm. Todas as amostras foram analisadas na presença de fluxo de N₂ para que O₂ presente no ar não interferisse na leitura dos dados dentro do equipamento.

Os espectros de dicroísmo circular foram analisados em termos de estrutura secundária utilizando o algoritmo CDSSTR (JOHNSON, 1999) disponível nos pacotes de programas para deconvolução de curvas de dicroísmo circular, CDPro (SREERAMA e WOODY, 2000). Para a deconvolução, foi utilizado o IBasis de numero 9 (SREERAMA ; VENYAMINOV ; WOODY, 1999) que contem um set de 42 proteínas. A unidade utilizada para os espectros de CD foi a MRE (Média de Resíduos de Elipticidade/ graus cm² decimol⁻¹resíduo⁻¹) que é uma das mais utilizadas. As coordenadas x e y de todos os espectros apresentados foram marcados num gráfico desenhado com o programa *Origin* versão 8.0.

3.11. Estudo Estrutural de Interação Molecular

A interação do complexo enzima-inibidor (miotoxina II de *B. asper* e ácido aristolóquio de *A. sprucei*) foi analisada pela via de simulação computacional com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique T. de P. da Silva (Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP, Universidade de São Paulo, USP-RP).

Uma ferramenta comum para avaliar a complementaridade entre as moléculas potenciais de ligação e os alvos é o “docking” molecular. O método baseado em mecânicas moleculares e utilizado neste trabalho, foi o AutoDock, o qual tem sido aplicado com excelente sucesso na predição de conformações de complexos enzima-inibidor, complexos peptídeo-anticorpo, e mesmo interações proteína-proteína, essas aplicações e outras tem sido revistas a todo momento (MORRIS, 1998; LORBER, 1999).

As coordenadas da miotoxina II de *B. asper* foram obtidas do " RCSB PDB-Protein Data Bank" (código PDB 1CLP) e complexada com a estrutura do ácido aristolóquio obtida no *ChemIDplus Advanced* e configurada tridimensionalmente no MDL ISIS Draw 2.5.4. As moléculas de água foram extraídas do complexo. As

moléculas da miotoxina II de *B. asper* e o ácido aristolóquio foram submetidas separadamente a cálculos de cargas atômicas. As cargas foram determinadas utilizando métodos disponíveis no programa AutoDock 3.0 (MORRIS *et al.*, 1998). Para a macromolécula foram adicionados os hidrogênios polares (hidrogênios ligados a heteroátomos) e calculadas as cargas Kollman (WEINER *et al.*, 1981; WEINER e KOLLMAN, 1984; WEINER *et al.*, 1986).

A estrutura do ácido aristolóquio foi adicionada todos os hidrogênios, calculadas as cargas Gasteiger (GASTEIGER e MARSILI, 1980) e os hidrogênios não polares foram reunidos aos carbonos aos quais estavam ligados. Os arquivos da miotoxina II e do ácido aristolóquio foram reunidos em um único arquivo para efetuar os cálculos de superposição. O AutoDock requer mapas de grade de afinidade pré-calculados para cada um dos tipos de átomos presentes nos ligantes a serem submetidos à superposição. Os mapas das grades de afinidade consistem de uma rede de pontos, espaçados regularmente, que armazenam a energia potencial de um átomo "prova" em relação a todos os átomos da macromolécula. As grades de afinidade foram então geradas usando o programam auxiliar AutoGrid (GOODFORD, 1985). Um dos átomos da cadeia lateral da histidina 48 no sítio ativo da miotoxina II foi escolhido como centro da grade que foi construída com 71x71x71 pontos com espaçamento de 0,375 Å entre os pontos da grade. Nos cálculos utilizando o AutoGrid e o AutoDock foram empregados potenciais para ligações de hidrogênio envolvendo os heteroátomos O, N e S, tanto para o ligante quanto para a macromolécula (MORRIS *et al.*, 1998).

No experimento de superposição molecular foram realizadas 50 corridas de algoritmo genético Lamarckiano (algoritmo genético com busca local) e o número máximo de avaliações de energia de 500.000 e os outros parâmetros de algoritmo genético (GA) e busca local (LS) de acordo com o descrito por Morris e colaboradores (1998). A energia livre é utilizada no cálculo da constante de inibição K_i , usando a equação $G=RT \ln K_i$, onde R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta, assumida como temperatura ambiente, 298,15 K. Para facilitar a análise dos dados, os valores de K_i foram transformados nos seus respectivos pK_i ($pK_i = -\log K_i$).

Após a realização dos cálculos de superposição molecular e da variação de G envolvida na formação do complexo ligante-enzima, analisaram-se as interações químicas e o posicionamento da conformação energeticamente mais estável de cada

ligante no sítio ativo da miotoxina II. Para tanto se construíram arquivos contendo a conformação mais estável de cada ligante, prevista pelo AutoDock, e todos os resíduos de aminoácidos próximos ao ligante. Foram identificados todos os heteroátomos da macromolécula a uma distância inferior a 3,5 Å de um heteroátomo do ligante, como possíveis pontos de formação de ligação de hidrogênio (HÖLTJE e FOLKERS, 1996).

3.12. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, sendo expressos os resultados pela média +/- desvio padrão (SD) e os níveis de significância considerados dentro do intervalo de confiança $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Inibição da atividade fosfolipásica

Os efeitos inibitórios dos diferentes extratos de *Aristolochia sprucei* sobre a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. asper* são mostrados na Figura 10.

Observou-se maior inibição da atividade fosfolipásica pelo extrato de *Aristolochia sprucei* em acetato de etila tanto das folhas quanto para o caule. O extrato metanólico das folhas mostrou inibição de 41, 28 e 33% da atividade fosfolipásica da peçonha bruta para as proporções de 1:5, 1:10 e 1:30 (m/m), respectivamente. O extrato das folhas em acetato de etila apresentou a melhor inibição registrada da atividade fosfolipásica da peçonha bruta nas proporções de 1:5, 1:10 e 1:30 (m/m), demonstrando inibição de 45%, 35% e 33% respectivamente. O extrato aquoso das folhas, na proporção de 1:5 (m/m), inibiu 38% da atividade fosfolipásica da peçonha bruta, entanto que o extrato aquoso de caule demonstrou este mesmo percentual de inibição somente com a proporção de 1:30 (m/m).

Considerando as duas partes da planta testada (folhas e caule) nos três solventes diferentes (aquoso, acetato de etila e metanol), os resultados ressaltam que a maior inibição da atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *B. asper* foi obtida com extratos de folhas na proporção 1:5 (m/m), nos solventes metanólico e de acetato de etila.

Figura 10. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops asper* pelo extrato de *Aristolochia sprucei* em diferentes proporções 1:5, 1:10 e 1:30 (m/m) em diferentes solventes. Abreviaturas: Ac-F (Folhas em acetato de etila), Ac-C (Caule em acetato de etila), M-F (Folhas em Metanol), M-C (Caule em Metanol), Aq-F (Folhas em água) e Aq-C (Caule em água). Resultados expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 3).

4.2. Inibição da atividade coagulante

Na Tabela 7 foram apresentados os resultados do efeito inibitório dos extratos aquoso, metanólico e acetato de etila de folhas e caule de *Aristolochia sprucei* sobre a coagulação causada pela peçonha bruta de *Bothrops asper* do Panamá. O extrato do caule em acetato de etila foi à parte da planta testada que exibiu o maior efeito inibitório da atividade coagulante causada pela peçonha, prolongando o tempo de coagulação do plasma em relação ao controle.

Tabela 7. Efeito dos extratos de folhas e caule de *Aristolochia sprucei* em diferentes solventes sobre a atividade coagulante* da peçonha bruta de *Bothrops asper* do Panamá.

Parte da planta	Extrato Aquoso			Extrato Metanólico			Extrato Acetato de etila			Peçonha	Controles		
	Proporção			Proporção			Proporção				Solventes		
	Peçonha: Extrato 1:5	Peçonha: Extrato 1:10	Peçonha: Extrato 1:30	Peçonha: Extrato 1:5	Peçonha: Extrato 1:10	Peçonha: Extrato 1:30	Peçonha: Extrato 1:5	Peçonha: Extrato 1:10	Peçonha: Extrato 1:30		Água	Metanol	Acetato de etila
Folha	36*	43*	36*	63*	65*	58*	87*	59*	103*	50*	Não coagulou	Não coagulou	Não coagulou
Caule	22*	43*	53*	43*	69*	81*	160*	178*	198*				

* Tempo de coagulação (TC) em segundos (n = 3).

4.3. Inibição do edema

A figura 11 apresenta o edema tempo-dependente induzido pela peçonha de *B. asper* do Panamá e os efeitos neutralizantes na presença dos extratos de folhas e caule de *A. sprucei* em acetato de etila.

Observou-se a maior inibição (cerca de 96%) ocorreu após 180 min da injeção da peçonha (previamente incubada com o extrato) pelo extrato de folhas na proporção 1:2 (m/m). Para o extrato de caule nas diferentes proporções testadas (1:2, 1:5, 1:10 e 1:20, m/m), observou-se aos 60 minutos, inibições do edema correspondentes a 81, 82, 96 e 83%, respectivamente.

Figura 11. Inibição da atividade edematizante da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá pelos extratos de folhas e caule de *Aristolochia sprucei* em acetato de etila. Abreviaturas: F (folhas), C (caule). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 5).

4.4. Inibição da atividade miotóxica

A figura 12 apresenta a inibição, pelo extrato de folhas e caule em acetato de etila de *A. sprucei*, da miotoxicidade produzida pela peçonha bruta de *B. asper*.

A melhor inibição aconteceu com o extrato de caule (92%) de *A. sprucei* na proporção de 1:30 (m/m), seguido do extrato de folha (81%) na proporção de 1:10 (m/m). A inibição da miotoxicidade pelo extrato metanólico de *A. sprucei* foi menor à observada com o extrato de acetato de etila (Fig. 13).

4.5. Inibição da atividade hemorrágica

A figura 14 apresenta a inibição da atividade hemorrágica produzida pela peçonha bruta de *B. asper* utilizando extrato de folhas e caule em acetato de etila de *A. sprucei*. Os extratos de folhas e caule de *A. sprucei* (1:30 e 1:60, m/m) inibiram a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de forma similar. Observou-se uma inibição de 82 e 87% da atividade hemorrágica pelo extrato de folhas e caule na proporção 1:60 (m/m), respectivamente.

Figura 12. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá pelo extrato acetato de etila de *Aristolochia sprucei*. A peçonha de *B. asper* foi utilizada como controle positivo, enquanto que, o PBS foi considerado o controle negativo. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 5).

Figura 13. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá pelo extrato metanólico de *Aristolochia sprucei*. A peçonha de *B. asper* foi utilizada como controle positivo, enquanto que, o PBS foi considerado o controle negativo. Abreviaturas: F: folhas, C: caule. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 5).

Bothrops asper : *Aristolochia sprucei* - Extrato de acetato de etila (m/m)

Figura 14. Inibição da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops asper* do Panamá pelo extrato de *Aristolochia sprucei* em acetato de etila nas proporções 1:30 e 1:60 (m/m). A peçonha de *B. asper* foi utilizada como controle positivo, enquanto que, o PBS foi considerado o controle negativo. Abreviaturas: F: folhas, C: caule. Resultados expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 5).

4.6. Fracionamento Cromatográfico

O extrato de folhas em acetato de etila de *A. sprucei* foi fracionado inicialmente em coluna de sílica gel. As 101 frações obtidas da coluna de sílica gel foram avaliadas em cromatografia de camada delgada e agrupadas segundo a similaridade do R_f em 23 frações (Fig. 15 e 16) para dar continuidade aos estudos fitoquímicos.

Foi testada a capacidade inibitória da atividade fosfolipásica de cada uma das 23 frações (Fig. 17) obtidas na cromatográfica de camada delgada a partir do extrato de folhas de *A. sprucei* em acetato de etila e obtidas na cromatografia de camada delgada. A maior inibição foi observada para a fração 21 (41%) seguida da fração 17 (32%).

4.7. Análises em Cromatografia líquida de alta eficiência

Na figura 18 apresentam-se os cromatogramas do padrão de ácido aristolóquio (Sigma, No. A5512) (Fig. 18A) e dos extratos de caule (Fig. 18B) e folha (Fig. 18C) de *Aristolochia sprucei* em acetato de etila que foram obtidos por CLAE.

Nas condições da análise observou-se que a simetria dos sinais obtidos foi boa com ótima resolução e tempo razoável de análise. O perfil cromatográfico correspondente ao padrão analisado, ácido aristolóquio I, demonstra um tempo de retenção de 18,20 minutos e um pico de absorção a 330 nm (Fig. 18A).

O cromatograma do extrato de caule (Fig. 18B) apresentou diversos picos, sendo o de tempo de retenção de 18,14 min com um perfil de absorção similar ao observado para o padrão de ácido aristolóquio I. Enquanto que, o cromatograma do extrato de folhas (Fig. 18C) apresentou sinais aos 3,16, 3,66, e 7,44 min, mas, não foi detectado nenhum pico próximo aos 18 minutos.

Figura 15. Cromatografia de camada delgada das 13 primeiras frações obtidas do extrato de folha de acetato de etila de *A. sprucei*. Placa eluída com hexano - acetato de etila (7:3, v/v). Revelador- Ultravioleta e nebulização de ácido sulfúrico seguido por aquecimento.

Figura 16. Cromatografia de camada delgada das frações de 14-23 obtidas do extrato de folha de acetato de etila de *A. sprucei*. Placa eluída duas vezes. Primeira eluição com hexano-acetato de etila (7:3, v/v). Segunda eluição com hexano-acetato de etila (1:1, v/v). Revelador- Ultravioleta e nebulização de ácido sulfúrico seguido por aquecimento.

Figura 17. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops asper* pelas frações de extrato de folha em acetato de etilo de *A. sprucei* na proporção 1:30 (m/m). Resultados expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 3).

Figura 18. Análises do extrato bruto de *Aristolochia sprucei* (caule e folha) em acetato de etila em cromatografia de alta eficiência (CLAE) usando uma coluna analítica Supelco^{TM} LC18 (25 cm x 4,6 mm, Supelco®) em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo CLASS-LC10). (A) Cromatograma de ácido aristolóquico I controle, padrão comercial Sigma. (B) Cromatograma do extrato de caule de *A. sprucei*. A seta indica a presença de sinal compatível com a de ácido aristolóquico I. (C) Cromatograma do extrato de folhas de *A. sprucei*. cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.8. Análises por Ressonância Magnética Nuclear

A figura 19 (A e B) apresenta as análises espectroscópicas de RMN de próton (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) do composto isolado por CLAE (Fig. 18 B). Os espectros analisados apresentam 17 sinais para átomos de carbono, 11 sinais para átomos de hidrogênio e dois substituintes: OCH_2O e OCH_3 o que corresponde estruturalmente com o ácido aristolóquio I (Fig. 20).

Os deslocamentos químicos (δ) do composto isolado por CLAE (Fig. 18B) foram comparados com padrões de deslocamentos químicos informados por NASCIMENTO e LOPES (2003) para ácido aristolóquio I (Tabela 8).

4.9. Inibição das atividades miotóxica e fosfolipásica induzida pelo Ácido Aristolóquio

Na figura 21, apresenta-se a inibição por ácido aristolóquio da atividade miotóxica induzida pelas peçonhas de *B. asper* e *B. jararacussu* e suas miotoxinas isoladas, a miotoxina-II e bothropstoxina-I, respectivamente. Observou-se uma inibição de 85% da atividade miotóxica da peçonha de *B. jararacussu*, de 80% para a peçonha de *B. asper*, de 64% para bothropstoxina-I e de 60% para miotoxina-II de *B. asper*. Na figura 22, apresenta-se a inibição por ácido aristolóquio da atividade fosfolipase A_2 induzida pela peçonha de *B. asper*. Observou-se uma inibição de aproximadamente 43% da atividade fosfolipase A_2 (hemolítica indireta) da peçonha de *B. asper*.

Figura 19. Análises espectroscópicas de RNM de próton (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) do composto isolado por CLAE. (A) Espectro de próton ^1H NMR (DMSO, 500 MHz, δ). (B) Espectro de carbono ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz, δ).

Tabela 8. Comparação dos deslocamentos químicos obtidos por RMN na amostra com padrões da literatura do ácido aristolóquio I.

Carbono	Amostra	4 ^{a,b}	Amostra	4 ^{a,c}
1	125,23	124,5		
2	113,10	112,2	7,76 s	7,80 s
3	146,60	146,0		
4	146,94*	146,2		
4 ^a	117,75	116,9		
4 ^b	130,80	129,8		
5	119,38	118,4	8,59 d	8,66 d
6	132,55	131,5	7,79 t	7,68 t
7	109,86	108,7	7,31 d	7,07 d
8	157,28	156,3		
8 ^a	119,76	118,8		
9	120,38	119,5	8,52 s	8,81 s
10	146,94*	145,7		
10 ^a	118,22	117,3		
11	168,60	167,9		
OCH ₂ O	103,87	103,0	6,43	6,34 s
OCH ₃	57,18	56,2	4,00	4,01 s

^a Dados obtidos da literatura (NASCIMENTO e LOPES, 2003)

^b Solvente: DMSO-*d*₆

^c Solvente: CDCl₃

Obs.: Houve um deslocamento dos sinais de ¹³C RMN em comparação com os dados da literatura.

Figura 20. Estrutura química do Ácido Aristolóquio I isolado de *Aristolochia sprucei*. (A) Estrutura química bidimensional. (B) Estrutura molecular tridimensional com todos os hidrogênios implícitos, desenhada no MDL ISIS Draw 2.5.4.

Figura 21. Inibição da atividade miotóxica das peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops asper* e das miotoxinas BthTX-I e Mtx-II pelo ácido aristolóquio na proporção de 1:30 (m/m), quando previamente incubado por 30 min a 37°C. Resultados expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 5).

Figura 22. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops asper* pelo Ácido aristolóquio isolado de *A. sprucei* na proporção 1:30 (m/m). Resultados expressos pela média $\pm$ S.D. (n = 3).

4.10. Análise de Espectros de Dicroísmo Circular

A figura 23 (A e B) apresenta as análises de espectros de dicroísmo circular da moojenitoxina I, MjTX-I de *Bothrops moojeni* e bothropstoxina-II, BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, na presença e ausência do inibidor ácido aristolóquio de *A. sprucei*. As miotoxinas na presença do inibidor exibem alguns enovelamentos que foram modificados em relação aos espectros destas proteínas sem o inibidor, demonstrando alterações na porcentagem dos diversos domínios que constituem a estrutura secundária das miotoxinas (Tabela 9). A ligação do inibidor com as miotoxinas modificou a forma e a intensidade dos espectros de dicroísmo circular (Fig. 23 A e B).

Tabela 9. Porcentagem dos diversos domínios da estrutura secundária das miotoxinas (BthTX-II e MjTX-I) na presença e ausência do ácido aristolóquio de *A. sprucei*.

	α -Hélice	Folha β	Curva β	Desordenadas
BthTX-II	57,0%	14,5%	12,0%	16,9%
BthTX-II + ácido aristolóquio	47,6%	13,7%	16,8%	22,7%
MjTX-I	47,5%	8,9%	16,5%	27,1%
MjTX-I + ácido aristolóquio	34,6%	16,7%	18,8%	29,3%

Figura 23. Espectro de dicroísmo circular da interação entre o inibidor e as mitotoxinas isoladas. (A) Espectro de dicroísmo circular da bothropstoxina-II, BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, com e sem inibidor, ácido aristolóquio de *A. sprucei*. (B) Espectro de dicroísmo circular da moojenitoxina-I, MjTX-I de *Bothrops moojeni*, com e sem inibidor, ácido aristolóquio de *A. sprucei*.

MRE (Análises de espectros de dicroísmo circular)

4.11. Estudos de Interação Molecular

Na interação molecular do ácido aristolóquio com a miotoxina II de *Bothrops asper* (Lys49-PLA₂) foram gerados os mapas das grades de afinidade (Fig. 24), que armazenam a energia potencial do átomo "prova" em relação a todos os átomos da macromolécula.

O ácido aristolóquio modelou-se dentro do canal hidrofóbico e no sítio ativo desta miotoxina (Fig. 25). Observou-se que o grupo NO₂ do ácido aristolóquio interage com a lisina 49 (Fig. 25).

Os anéis aromáticos do ácido aristolóquio (A, B e C) estão sendo flanqueados pelos resíduos: valina B31 e Leucina A2 por um lado e a Valina A31 por outro lado (Fig. 26). O grupo oxigênio ácido aristolóquio interagem com a lisina A 69 e B 69 por pontes de hidrogênio. A leucina 2 está interagindo com a Valina 31, os dois resíduos interagem com os anéis aromáticos do ácido aristolóquio (Fig. 26).

Figura 24. Mapas das grades de afinidade entre a miotoxina II de *B. asper* e o ácido aristolóquio (estrutura verde no centro da figura) de *A. sprucei*.

Figura 25. Modelo molecular do complexo ácido aristolóquio com a miotoxina II de *Bothrops asper*. Em destaque os detalhes estruturais dentro do canal hidrofóbico e no sítio ativo da miotoxina dimérica (a esquerda). Observar (a direita) que o grupo NO₂ do ácido aristolóquio interage com a lisina 49 (1). Os anéis aromáticos do ácido aristolóquio (A, B e C) estão sendo rodeados pelos resíduos: valina B31 (monômero B), Leucina A2 e a Valina A31 (monômero A) da miotoxina.

5. DISCUSSÃO

Embora o envenenamento ofídico represente um problema grave de saúde pública, especialmente nas áreas tropicais e subtropicais, a administração endovenosa de soro antiofídico constitui ainda o único tratamento preconizado pela OMS para o tratamento dos pacientes vítimas dos acidentes ofídicos (CHIPPAUX e GODWA, 1988; CHIPPAUX e GOYFFON, 1997; LIZANO *et al.*, 2003; KOH *et al.*, 2006; CALVETE; JUAREZ, SANZ, 2007; LOMONTE *et al.*, 2009).

Entretanto, a soroterapia mostra-se ineficiente no combate do dano tecidual local causado pelas toxinas presentes na peçonha das serpentes (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE 1991; CARDOSO *et al.*, 1993; THEAKSTON, 1996; GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; LOMONTE *et al.*, 2009)

Desta forma, a procura por inibidores de origem vegetal e/ou sintética contra as ações tóxicas da peçonha ofídica torna-se importante a fim de complementar à tradicional soroterapia, particularmente contra os efeitos locais do envenenamento (SOARES *et al.*, 2004b).

Apesar do número considerável de extratos de plantas que foram encontrados para neutralizar a peçonha de *B. asper*, apenas uns poucos princípios ativos foram isolados e caracterizados a nível estrutural e funcional (LOMONTE *et al.*, 2009)

Neste trabalho avaliou-se o potencial antiofídico da *Aristolochia sprucei* contra as ações tóxicas da peçonha de *Bothrops asper*, ambos procedentes do Panamá e contra o efeito miotóxico da peçonha de *B. jararacussu* e das miotoxinas BthTX-I (*B. jararacussu*) e Mtx-II (*B. asper*), e isolou-se do extrato de caule desta planta o ácido aristolóquio.

Inicialmente foram preparados extratos das folhas e do caule de *A. sprucei* em solvente aquoso, metanólico e em acetato de etila. Em seguida, foi testada a atividade hemolítica indireta (indicação da atividade PLA₂) induzida pela peçonha de *B. asper*, na presença ou ausência dos diferentes extratos de folhas e caule de *A. sprucei*, em diferentes proporções (m/m), após incubação prévia de 30 min a 37°C.

Observou-se que houve um decréscimo na atividade fosfolipásica da peçonha pelos extratos em acetato de etila das folhas (45%) e do caule (38%) de *A. sprucei*. A maioria das PLA₂s da peçonha de serpentes são desprovidas de atividade hemolítica direta, porém, na presença de fosfolipídios exógenos, exibem potente

atividade hemolítica indireta devido aos produtos de hidrólise: ácidos graxos livres e lisofosfoglicerídeo. Os lisofosfoglicerídeos são agentes hemolíticos, tóxicos e causam dano nas membranas celulares (DIAZ; ARM, 2003; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; WAGNER; BREZESINSKI, 2008).

Nossos resultados diferem dos resultados obtidos com extratos de diferentes espécies de *Aristolochia* utilizados como agentes antiofídicos na Índia e na América do Sul, onde foram realizados estudos com extratos brutos de *A. pandurata*, *A. maxima* e *A. ringens* e não mostraram atividade antiofídica (GOWDA, 1997). Tai, *et al.*, (1975) realizaram estudos com extrato de *Aristolochia radix* e informaram a inativação *in vivo* das peçonhas de *Naja naja atra* e *Bungarus multicinctus*.

Algumas peçonhas de serpentes, como a de *B. asper*, têm a propriedade de coagular o plasma *in vitro* e *in vivo* das vítimas do acidente ofídico (ROSENFELD, 1971; THEAKSTON; REID, 1983; KAMIGUTI; CARDOSO, 1989). Neste trabalho, o extrato de caule da *A. sprucei* em acetato de etila atuou como inibidor da atividade coagulante da peçonha de *B. asper*, prolongando o tempo de coagulação, possivelmente pela sua ação em serinoproteases similares à trombina.

As alterações na coagulação sanguínea constituem uma das principais características dos envenenamentos por serpentes da família Viperidae (MARKLAND, 1998). Estas alterações são associadas com quadros de defibrinação, coagulação intravascular disseminada e trombocitopenia resultante da ação de proteínas (serinoproteases, fosfolipases A₂, desintegrinas, metaloproteases e outros) que afetam diversos componentes do sistema hemostático (ROSENFELD, 1971; FAN; CARDOSO 1995; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

O efeito anticoagulante de algumas PLA₂s Asp49 isoladas de peçonhas de serpentes foi associado a uma região positivamente carregada entre os resíduos de Lys54 e Lys77 (KINI; EVANS, 1989; KINI, 2003; CHIOATO; WARD, 2003). Por outro lado, tem-se purificado fosfolipases A₂ que afetam os processos de coagulação, alterando a agregação plaquetária (FULY *et al.*, 1997) ou inibindo a cascata de coagulação (DÍAZ *et al.*, 1991).

As peçonhas de vipéridos apresentam também um grupo de moléculas denominadas “desintegrinas”, as quais tem uma relação de uma região com a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) que se une a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ das plaquetas, causando inibição da agregação plaquetária e afetando o processo hemostático (MARKLAND, 1998). Além disso, proteases fibrinolíticas, da família das metaloproteases, e serino

proteases presentes na peçonha de serpentes são capazes de hidrolisar a fibrina que forma os trombos (MARKLAND, 1998).

A eficácia dos extratos de plantas de atuar como inibidores das atividades hemolítica, coagulante, edematizante, miotóxica, hemorrágica e de outros efeitos tóxicos da peçonha de serpentes podem estar relacionados com componentes dos extratos que desnaturam constituintes bioativos, mediante a formação de complexos, ou são competidores por receptores ou por sistemas enzimáticos em processos fisiológicos ou sequestram íons necessários para a atividade de algumas enzimas presentes na peçonha (HOUGHTON, 1998). No caso específico de inibição da coagulação pelo extrato de *A. sprucei* formar-se-iam complexos que permitiriam interações entre compostos do extrato (GOWDA, 1997) com enzimas do tipo serinoproteases “thrombin-like” que causam alterações no sistema de coagulação (PIRKLE e THEODOR, 1998) e/ou PLA₂s (KINI, 2003).

As PLA₂s presentes nas peçonhas de serpentes apresentam uma ampla variedade de efeitos farmacológicos que podem interferir em diferentes processos fisiopatológicos. O ingresso das peçonhas de viperidos aos tecidos coloca em funcionamento um complexo processo inflamatório associado com a liberação e/ou síntese de inúmeros mediadores, os quais interagem de maneira complexa, afetando diferentes processos celulares e teciduais (GIORGI *et al.*, 1993). As PLA₂s desencadeiam uma cascata de eventos inflamatórios caracterizados por incremento da permeabilidade microvascular e formação de edema, captação de leucócitos dentro dos tecidos, nocicepção, dor, aquisição de um fenótipo proinflamatório e procoagulante nas células endoteliais (VALENTIN e LAMBEAU, 2000; KOH; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2006; BURKE e DENNIS, 2009 a, b; CISNE DE PAULA *et al.*, 2009).

O edema produzido *in vivo* em camundongos pela peçonha de *B. asper* foi inibido em 96% pelo extrato de caule de *A. sprucei* em acetato de etila, quando usado na proporção de 1:10 (m/m). Esta inibição, segundo GOWDA (1997) e HOUGHTON (1998), entre outros, poderia ser explicada com base em compostos derivados das plantas os quais tem atividade no metabolismo do ácido araquidônico. Estes compostos têm sido caracterizados como inibidores das atividades ciclooxigenase e lipooxigenase induzidas geralmente pelas PLA₂s da peçonha de serpentes (OTERO *et al.*, 2004). Neves e colaboradores (1993) isolaram um esteróide, Velutinol A, e um glicosídeo, ambos isolados da raiz de *Mandevilla*

velutina considerados potentes anti-inflamatórios que reduzem significativamente o edema induzido por PLA₂s. Mattos e colaboradores (2006) têm evidências que o Velutinol A inibe seletivamente as respostas das cininas mediada por receptores B1. As cininas podem evocar os sinais cardinais da inflamação (dor, edema, rubor e calor) e estão próximas do topo da cascata de mediadores envolvidos no processo inflamatório (MOREAU *et al.*, 2005)

Outros compostos isolados como o ácido 2-OH-4-metóxi benzóico da raiz de *Hemidesmus indicus*, neutralizou a inflamação induzida pela peçonha de *Vipera russelli* em camundongos machos albinos e reduziu o granuloma em ratos (ALAM e GOMES, 1998). O extrato de outra planta *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) inibiu 50% do edema produzido pela peçonha bruta e miotoxina II de *B. moojeni* (BORGES *et al.*, 2000, 2001).

Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Vishwanath, kini e Gowda, (1987), os quais isolaram um princípio ativo de *Aristolochia spp.* com alta afinidade pela PLA₂ de *Vipera russelli* e que interferiu, provavelmente, na síntese do ácido araquidônico, um intermediário na produção de prostaglandinas que contribuem na formação do edema, inibindo esta atividade (DIAZ e ARM, 2003).

Chaves, Barboza e Gutiérrez (1995) demonstraram que o tratamento prévio com indometacina (inibidor da via ciclooxigenase), dexametasona e mepacrine (duas drogas que inibem a atividade da PLA₂ por diferentes mecanismos) causam uma redução no edema induzido pela peçonha de *B. asper*. Assim, o edema induzido pela peçonha de *B. asper* no modelo da região subplantar da pata do camundongo é mediada, em parte, pela atividade da fosfolipase A₂ e por produtos de eicosanóides. A neutralização rápida da peçonha no sangue não garante a suspensão e a progressão do edema dentro de um curto período de tempo. Em diversos ensaios clínicos e experimentais tem sido demonstrado que antisoros são de valor limitado para parar a progressão do edema 12-24 h depois do primeiro tratamento, enquanto que, são altamente eficientes na recuperação do processo de coagulação sanguínea no mesmo intervalo de tempo (OTERO *et al.*, 1996, 1998).

A necrose do tecido muscular ou mionecrose é um dos efeitos locais mais sérios dos envenenamentos por serpentes da família Viperidae (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989). No caso de não ser neutralizado pelos antisoros, este efeito pode levar a uma importante perda do tecido muscular, o que, associado com uma deficiente regeneração muscular, culminam com seqüelas permanentes na vítima.

Em nosso trabalho, 92% da atividade miotóxica produzida pela peçonha de *B. asper* foi inibida, pelo extrato de caule de *A. sprucei* em acetato de etila, quando usado na proporção de 1:30 (m/m). As peçonhas de serpentes podem apresentar fosfolipases A₂ (PLA₂s), que induzem a miotoxicidade local ou danos musculares sistêmicos (GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1997; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003). Estas miotoxinas podem ser PLA₂s Asp49, a qual possui variantes cataliticamente ativas (KAISER *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1998), e, PLA₂s Lys49 que apresentam baixa atividade enzimática, mas, ainda assim são capazes de induzir miotoxicidade por um mecanismo independente da catálise enzimática (WARD *et al.*, 2002; LOMONTE *et al.*, 2003). A miotoxicidade de PLA₂s Lys49 parece estar relacionada a um segmento catiônico e hidrofóbico (resíduos 115 a 129) presente na região C-terminal destas enzimas (CHIOATO e WARD, 2003).

Em um modelo de ação, proposto por Kini e Evans (1989), as PLA₂s de peçonhas de serpentes exibem uma variedade de efeitos farmacológicos por interação específica a “sítios alvo” presentes na superfície de células ou tecidos. Tais efeitos podem ser dependentes e/ou independentes da atividade enzimática. Nos mecanismos dependentes da atividade enzimática, a hidrólise de fosfolipídios ou a liberação dos produtos desta hidrólise podem causar os efeitos farmacológicos, pois os danos às membranas podem afetar as proteínas a elas ancoradas. Já nos mecanismos independentes a interação, como agonista ou antagonista, com as proteínas alvo é responsável pelos efeitos farmacológicos (KINI, 1997; 2003; 2005).

O extrato de caule de *A. sprucei* foi efetivo na redução de 87% da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. asper*. A hemorragia, que pode ser local ou sistêmica, também é considerada um dos efeitos mais acentuados do envenenamento por serpentes botrópicas (GUTIÉRREZ e LOMONTE 1989; GUTIÉRREZ, 1995). As peçonhas das serpentes apresentam desintegrinas que afetam as plaquetas, induzindo ou inibindo sua agregação; ativadores fibrinolíticos, hemorraginas (fibrinogenases) que causam hemorragia agindo através de plaquetas ou por proteólise das paredes e da lâmina basal dos de vasos capilares, acontecendo o extravasamento (MOREIRA *et al.*, 1992, 1994; KAMIGUTTI *et al.*, 1996; MARKLAND, 1998). Estas toxinas hemorrágicas (metaloproteases) são enzimas dependentes de zinco, e algumas dessas têm sido isoladas e caracterizadas da peçonha de *B. asper* (BORKOW *et al.*, 1993; GUTIÉRREZ *et al.*, 1995; FRANCESCHI *et al.*, 1999).

Segundo Otero (1992a) estas toxinas podem causar uma severa anemia e choque que poderia gerar hemorragia no sistema nervoso central, o que levaria a morte ou a seqüelas para toda a vida. Muitos inibidores sintéticos de metaloproteases, tais como sais de EDTA e uma série de hidroxamatos, baseiam seu mecanismo de ação na quelação de zinco requerido para a catálise (BORKOW; GUTIÉRREZ; OVADIA, 1997; BOTTOMLEY *et al.*, 1998).

Os resultados de inibição da hemorragia obtidos neste trabalho são similares aos encontrados por outros autores, onde compostos do tipo flavonóides, quinonóides, xantenos, polifenóis e terpenos possuem proteínas ligantes e enzimas que inibem estas propriedades (ALAM e GOMES, 1998).

Muitos compostos antihemorrágicos têm sido purificados e identificados em diferentes fontes, tais como: *Curcuma longa* (raízes), *Eclipta alba* (folhas), *Baccharis trimera* (partes aéreas), *Mandevilla velutina*, *Mandevilla* spp., *Casearia* spp. e *Tabernaemontana catharinensis* (BIONDO *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 1992; JANÚARIO *et al.*, 2004). Ademais, foram encontrados triterpenos em *V. negundo* e *E. officinalis*, os quais atuam como antioxidantes (BHATTACHARYA *et al.*, 1999).

A capacidade de extratos de plantas que contêm compostos que inibem o efeito tóxico da peçonha de serpente tem sido muito estudada (MARTZ, 1992). Por exemplo, foi registrada a inibição da atividade hemorrágica sobre a peçonha de *B. asper* com extrato etanólico, acetato de etila e aquoso de algumas plantas. Estas plantas foram analisadas e apresentavam compostos químicos como catequinas, flavonas, antocianinas e taninos. Ademais, alguns extratos aquosos de plantas como *Eclipta prostrata* (Asteraceae) neutralizaram parcialmente o efeito hemorrágico da peçonha de *B. jararaca* (MELO *et al.* 1994). Segundo Ferreira e colaboradores (1992), o ar-turmerona, isolado de extratos de raízes de *Curcuma longa* (Zingiberaceae), inibiu a atividade hemorrágica da mesma peçonha (CASTRO *et al.*, 1999).

O gênero *Aristolochia* demonstrou potencial neutralizante sobre o efeito hemorrágico de *Bothrops atrox*, *Naja naja atra* e *Bungarus multicinctus*, devido a presença nestes extratos de flavonóides, tais como catequinas, flavonas, antocianinas e taninos condensados. Os autores sugerem que estas moléculas poderiam ter uma ação quelante dos íons zinco (CASTRO *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2005). Embora, maiores estudos estruturais de co-cristalização entre inibidores e toxinas seriam essenciais para melhor compreender o mecanismo de ação inibitório.

Para inibir os efeitos biológicos, farmacológicos e tóxicos da peçonha de *B. asper*, diversos estudos têm sido realizados na busca de inibidores naturais eficazes (BORGES *et al.*, 2000, 2001; OTERO *et al.*, 2000a,b; NUÑEZ *et al.*, 2004, 2005; DA SILVA *et al.*, 2005; PEREAÑEZ *et al.*, 2008).

Castro e colaboradores (1999) selecionaram 48 espécies vegetais da Costa Rica, distribuídas em 30 famílias diferentes, para avaliar a atividade inibitória contra o efeito hemorrágico da peçonha de *B. asper*. Destes, 10 espécies testadas foram positivas para a inibição da atividade hemorrágica quando o extrato e a peçonha foram pré-incubados em conjunto e depois injetados intradérmica em camundongos. A capacidade de neutralização dos extratos foi associada com a presença de vários tipos de compostos, especialmente flavonóides, que podem atuar como agentes quelantes do átomo de zinco que é essencial para que as metaloproteínases da peçonha possam exercer sua ação hemorrágica (CASTRO *et al.*, 1999).

A neutralização das atividades hemolítica indireta, coagulante e edematogênica da peçonha de *B. asper* foram encontradas em extratos de plantas estudadas na Colômbia por Otero e colaboradores (2000a, b), entre elas ressaltam: *Bixa orellana*, *Brownea rosademonte*, *Costus lasius*, *Gonzalagunia panamensis*, *Heliconia curtispatha*, *Piper arboreum*, *Pleopeltis percussa*, *Renealmia alpinia*, *Senna dariensis*, *Struthanthus orbicularis*, *Strychnos xinguensis*, *Tabebuia rosea* e *Trichomanes elegans*. Todas elas demonstraram neutralizar a atividade hemolítica indireta contra uma MIHD (Dose hemolítica indireta mínima) da peçonha de *B. atrox*, sendo maior para *B. orellana* e *B. rosademonte*.

Nuñez e colaboradores (2004) demonstraram uma significativa inibição do edema (24-68%) e das atividades hemolítica indireta, coagulante e desfibrinante (100%) da peçonha de *B. asper* pelo extrato de *Bixa orellana*, *Piper peltatum* e *Piper umbellatum*. Da Silva e colaboradores (2005) e, Pereañez e colaboradores (2008) demonstraram a inibição da atividade hemolítica indireta pelos extratos de *Pentaclethra macroloba* e *Heliconia cutispatha*, respectivamente.

Borges e colaboradores (2000, 2001) demonstraram a inibição da atividade proteolítica e hemorrágica da metaloprotease BaP1, isolada de *B. asper* e das atividades miotóxica e coagulante de diversas fosfolipases A₂ das classes I, II e III, entre elas PLA₂s de serpentes do gênero *Bothrops* pelo extrato aquoso de *Casearia sylvestris*.

São poucos os estudos que tem identificado, isolado e caracterizado princípios ativos de extratos vegetais contra os efeitos da peçonha de *B. asper*, entre estes, encontra-se o pterocarpano, edunol, que foi isolado de *Brongniartia podalyrioides* e *B. intermedia*, plantas utilizadas no México contra picada de serpentes. Este composto reduziu a mortalidade dos camundongos quando foi injetado pela via intraperitoneal imediatamente após a injeção da peçonha de *B. atrox* pela mesma via, embora a redução fosse modesta (REYES-CHILPA *et al.*, 1994).

Os extratos de *Piper umbellatum* e *P. peltatum*, que inibiram completamente a atividade da miotoxina I (Mtx-I) isolada da peçonha de *B. asper*, foram fracionados para obter como princípio ativo, um composto identificado como 4-nerolidilcatecol (NUÑEZ *et al.*, 2005). O composto isolado inibiu a atividade PLA₂ da Mtx-I, com uma concentração inibidora média (IC₅₀) de 987 mM, e reduziu significativamente a miotoxicidade e o edema induzido nos camundongos, quando foi administrado *in situ* imediatamente após injetar a Mtx-I, sua capacidade inibitória foi substancialmente menor ou insignificante (NUÑEZ *et al.*, 2005).

O extrato aquoso de *Pentaclethra macroloba* demonstrou propriedades inibitórias das atividades hemorrágicas e edematizantes de várias peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops spp.*, inclusive *B. atrox* e *B. asper* (DA SILVA *et al.*, 2005).

Neste trabalho, foram analisados cromatograficamente os extratos de *A. sprucei* que mostraram maior capacidade de neutralizar os efeitos farmacológicos e tóxicos da peçonha de *Bothrops asper*. As técnicas cromatográficas utilizadas para o fracionamento dos extratos e as substâncias de referência corresponderam as descritas em outros trabalhos para o isolamento de compostos ativos de extratos de *A. sprucei*.

As 23 frações isoladas pela combinação das técnicas cromatográficas em coluna e camada delgada inibiram em diferentes medidas a atividade hemolítica indireta da peçonha de *B. asper*. Estes resultados indicam que a planta *A. sprucei* tem bom potencial inibitório de fosfolipases existindo a possibilidade de que os compostos isolados sejam flavonóides que tem capacidade para inibir a atividade fosfolipásica ou terpenos como o ácido aristolóquio, os quais têm atividade antiofídica comprovada (MORS *et al.*, 2000).

A análise cromatográfica (CLAE-UV) apresentou um sinal com boa simetria, ótima resolução e com um tempo razoável de análise que permitiu isolar o ácido aristolóquio a partir do extrato de caule de *A. sprucei* em acetato de etila. O espectro de absorção e o tempo de retenção de composto ativo isolado coincidiram com os do padrão de ácido aristolóquio I utilizado na análise cromatográfica.

O principal composto ativo isolado de plantas do gênero *Aristolochia* é o ácido aristolóquio (AA) que é estruturalmente uma mistura de nitrofenantreno e ácidos carboxílicos, dos quais existem mais de 50 análogos, entre eles os principais constituintes: ácido aristolóquio (AA) I, AA II, AA C, AA D, AA 7-OH, AAI e ácido aristólico (YUAN *et al.*, 2007a). Têm sido descritos métodos de cromatografia de camada delgada, CLAE-UV e HPLC-MS para a análise de ácido aristolóquio usando apenas uma ou duas substâncias de referência (YUAN *et al.*, 2007b; KOH *et al.*, 2006). A maioria das análises registradas tem se concentrado em outros análogos de ácido aristolóquio em vista da toxicidade primária de *Aristolochia spp.* (KOH *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados dos perfis cromatográficos por CLAE-UV, o ácido aristolóquio foi o ácido detectado no extrato de caule de *A. sprucei*, não sendo detectado no extrato das folhas. No entanto, pode existir variabilidade nas concentrações de ácido aristolóquio, dependendo de diferentes fatores, tais como: lugar, temporada do ano e parte da planta coletada ou técnica de análise da amostra (SIME *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2004; KOH *et al.*, 2006). Finalmente, é importante lembrar que o ácido aristolóquio I é um constituinte químico específico e de distribuição restringida a espécies de plantas da família Aristolochiaceae (FEENY, 1995).

A estrutura de ácido aristolóquio isolado de *A. sprucei* foi definida com base nos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e por comparação com dados descritos na literatura (NASCIMENTO e LOPES, 2003). O ácido aristolóquio isolado da *A. sprucei* inibiu as atividades hemolíticas indiretas e miotóxicas das peçonhas de *B. asper* e *B. jararacussu* e das miotoxinas isoladas, Mtx-II e BthTX-I.

Os resultados obtidos neste trabalho concordam parcialmente com os obtidos por Vishwanath, Rao e Gowda (1987) que isolaram ácido aristolóquio, da *Aristolochia spp.*, que interage com as principais PLA₂s da peçonha de *Vipera russelli*. O ácido aristolóquio foi um inibidor competitivo com K_i de $9,9 \times 10^{-4}\text{M}$ com

fosfatidilcolina como substrato. A inibição de hemólise direta e indireta foi maior quando comparada com a atividade enzimática sob a fosfatidilcolina. O ácido aristolóquio inibiu a atividade formadora de edema produzido pela PLA₂s de *V. russelli*, mas este não inibiu outras atividades patológicas produzidas pela PLA₂s da peçonha desta espécie..

Alguns pesquisadores, utilizando modificações químicas de aminoácidos (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; SOARES e GIGLIO, 2003; SOARES *et al.*, 2004), anticorpos (LOMONTE *et al.*, 1992; RUCAVADO e LOMONTE, 1996) e mutagênese contra domínios específicos das PLA₂s (WARD *et al.*, 2002; CHIOATO e WARD, 2003) têm mostrado a existência de uma separação funcional entre a atividade enzimática e atividade tóxica de algumas PLA₂s devido à presença de diferentes domínios estruturais responsáveis por estes efeitos.

Neste trabalho, o ácido aristolóquio além de inibir a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. asper*, inibiu eficientemente a atividade miotóxica das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. asper* e das miotoxinas BthTX-I e Mtx-II na proporção de 1:30 (m/m).

Os estudos de dicroísmo circular realizados neste trabalho mostram que a ligação do ácido aristolóquio de *A. sprucei* (inibidor) com as miotoxinas (MjTX-I e BthTX-II) modificou a forma e a intensidade dos espectros de dicroísmo circular, essas modificações na forma e intensidade dos espectros pode ter relação com alguns enovelamentos que foram modificados na presença do inibidor em relação aos espectros destas proteínas sem o inibidor. A ligação do ácido aristolóquio, com as miotoxinas (MjTX-I e BthTX-II) causa uma alteração na estrutura secundária das miotoxinas, a qual é caracterizada por uma diminuição aparente no conteúdo de α -hélice, sem modificações detectáveis na estrutura terciária da PLA₂. A estrutura terciária conservada das svPLA₂s é constituída por duas α -hélices antiparalelas (hélices 2 e 3) com características anfipáticas, nas quais os resíduos hidrofílicos estão expostos ao solvente e os resíduos hidrofóbicos dispostos no interior. Os resíduos polares do sítio catalítico (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52) estão situados no interior destas duas α -hélices (RENETSEDER *et al.*, 1985; ARNI e WARD, 1996).

Vishwanath e colaboradores, (1987b) observaram que as PLA₂s de *Vipera russell* se ligam ao ácido aristolóquio, mesmo na ausência de substrato. No entanto,

a ligação do ácido aristolóquio a enzima livre é reduzida em comparação ao complexo enzima-substrato, o que sugere a natureza não-competitiva da inibição. Os estudos de dicroísmo circular no trabalho de Vishwanath e colaboradores, (1987b) mostram que a união do ácido aristolóquio com a PLA₂ altera a estrutura secundária da PLA₂, tais alterações estruturais podem afetar o domínio de reconhecimento de eritrócitos, alternativamente isso poderia alterar a hidrólise de substratos naturais.

O estudo da modelagem molecular apresentado neste trabalho mostra que o ácido aristolóquio de *A. sprucei* pode ser inserido dentro do canal hidrofóbico e no sítio ativo da Mtx-II de *B. asper* sem alterações de energia no sistema, produzindo-se a interação entre o grupo NO₂ do ácido aristolóquio com a lisina 49. A interação Mtx-II-ácido aristolóquio não evidencia nenhuma alteração na estrutura tridimensional da miotoxina. A interação entre a Mtx-II e o ácido aristolóquio encontra-se rodeada pelas duas α -hélices antiparalelas o que poderia explicar a diminuição aparente no conteúdo de α hélice observado no espectro de dicroísmo circular.

Além dos resultados apresentados neste trabalho, no que se referem a avaliação da atividade antiofídica de *Aristolochia sprucei* e ao isolamento e caracterização estrutural do co-cristalização e funcionais da cinética do complexo do ácido aristolóquio, se faz necessário estudos da cinética do complexo ácido aristolóquio - PLA₂ e mais especificamente, estudos que permitam avaliar a toxicidade do ácido aristolóquio isolado, assim como o mecanismo de inibição de efeitos tóxicos e farmacológicos de peçonhas de serpentes. Tais estudos auxiliariam na melhor compreensão do mecanismo de ação de inibidores de toxinas, e poderiam ser de extrema utilidade para a elaboração de novos fármacos com ação em diferentes processos fisiopatológicos.

6. CONCLUSÕES

A preincubação dos extratos de folhas e caule de *Aristolochia sprucei* com a peçonha bruta de *Bothrops asper* resultou na neutralização de diferentes atividades biológicas, farmacológicas e tóxicas desta peçonha, incluindo as atividades: hemorrágica, coagulante, PLA₂ indireta, edematogênica e miotóxica. Essa neutralização da peçonha pelos extratos vegetais ocorreu com percentuais diferenciados, revelando diferentes perfis do potencial antiofídico de *Aristolochia sprucei*.

O extrato de caule em acetato de etila demonstrou maior eficácia na neutralização das atividades hemorrágica, coagulante, edematogênica e miotóxica, enquanto que, a porcentagem de inibição da atividade fosfolipásica foi maior para o extrato de folhas em acetato de etila.

O cromatograma do extrato de folhas apresentou diferentes picos de absorção em diferentes tempos de retenção, mas, não foi possível detectar a presença de ácido aristolóquio. O ácido aristolóquio foi isolado do extrato de caule em acetato de etila e demonstrou efeito neutralizante das atividades miotóxica e hemolítica da peçonha bruta de *Bothrops asper* e miotoxinas isoladas.

A análise dos espectros de dicroísmo circular e os estudos de interação por modelagem molecular sugerem que o ácido aristolóquio forma um complexo com a miotoxina inibindo sua atividade. A formação do complexo proteína (miotoxina) – inibidor (ácido aristolóquio) modificou a forma e a intensidade dos espectros de dicroísmo circular da miotoxina e induziu alterações na porcentagem dos diversos domínios que constituem a estrutura secundária da miotoxina.

Os resultados obtidos confirmam que os extratos de *A. sprucei* possuem propriedades antiofídicas e sugerem a necessidade de aprofundar estudos que permitam utilizar com segurança os extratos e o princípio ativo isolado como suplementos dos antisoros para aumentar a eficácia na neutralização dos efeitos tóxicos da peçonha das serpentes. Estudos para identificar e isolar outros componentes do extrato de folhas de *A. sprucei* com propriedades antiofídicas devem ser realizados a fim de auxiliar na melhor compreensão do mecanismo de ação de inibidores de toxinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABUBAKAR, M.S.; SULE, M.I.; PATEH, U.U.; ABDURAHMAN, E.M.; HARUNA, A.K.; JAHUN, B.M. *In vitro* snake venom detoxifying action of the leaf extract of *Guiera senegalensis*. **J. Ethnopharmacol.** v. 69, p. 253–257. 2000.
- AGUIYI, J.C.; IGWEH, A.C.; EGESIE, U.G.; LEONCINI, R. Studies on possible protection against snake venom using *Mucuna pruriens* protein immunization **Fitoterapia**, v.70, p. 21-24, 1999.
- ALAN, M.I; GÓMEZ, A. Viper venom-induced inflammation and inhibition of free radical formation by pure compound (2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid) isolated and purified from anantamul (*Hemidesmus indicus* R.Br) root extract. **Toxicon**, v. 36, p. 207-215, 1998a.
- ALAN, M.I; GÓMEZ, A. Adjuvant Effects and Antiserum Action Potetiation by a (Herbal) Compound 2-Hydroxy-4-Methoxy Benzoic Acid Isolated from the Root Extract of the Indian Medicinal Plant “Sarsaparilla” (*Hemidesmus indicus* R. BR.) **Toxicon**, v. 36, p. 1423-1431, 1998b.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.; SOARES, A.M; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DIAZ,C.; LOMONTE, B.; 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. 755-63, 2000.
- ANDRÈ, J.M. La médecine à Rome. Paris. Éditions Tallandier, p. 687, 2006.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venomof the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 5, p-949-957, 2008
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram.** v. 28, p. 13-19, 1993.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipases A₂: structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827- 841, 1996.
- BHATTACHARYA, A.; CHATTERJEE, A.; GHOSAL, S.; BHATTACHARYA, S.K. Antioxidant activity of active tannoid principles of *Embllica officinalis* (amla). **Indian J. Exp. Biol.** v. 37, p. 676-680, 1999.

---

* Referências apresentadas de acordo a Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT, em 2002

- 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* (Apocinaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, p. 1017-1025, 2003.
- BIONDO, R.; SOARES, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation by direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant. Cell. Rep.**, v. 22, p. 549-552, 2004.
- BON, C.; GOYFFON, M. In: Envenenomings and their Treatments. Fondation Marcel Mérieux, Lyon France, 1995.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127B, p. 21-30, 2000.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HAMAGUCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863-1869, 2001.
- BORGES, M.H.; ALVES, D.L.F.; RASLAN, D.S.; PILO-VELOSO, D.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; DE LIMA, M.E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms **J. Pharmacol.** v. 98, p. 21-29, 2005.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 31, p. 1137-1150, 1993.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. **Toxicon**, v. 35, p. 865-877, 1997.
- BOTTOMLEY, K.M.; JOHNSON W.H.; WALTER, D.S. Matrix metalloproteinase inhibitors in arthritis. **J. Enzyme Inhibition**, v. 13, p. 79-101, 1998.
- BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. V. Tratamento das mordeduras das cobras. **Rev. Med.** v. 4, p. 265-278, 1903.

- BURKE, J.E.; DENNIS, E. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovasc. Drugs. Ther.** v. 23, p. 49–59, 2009a.
- BURKE J. E.; DENNIS, E. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism and signaling **J. Lipid Res.** v. S237- S242, 2009b.
- CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P.M.; SOLIS, P.N.; PIETERS L.; SHAHAT, A.A.; GUPTA, M.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A.J. Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. **Phytomedicine** v. 8, p. 59–70, 2001.
- CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrom.** v. 42; p. 1405-1414, 2007.
- CARDOSO, J.L.C.; FAN, H.W.; FRANCA, F.O.S.; JORGE, M.T.; LEITE, R.P.; NISHIOKA, S.A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; SANTORO, M.L.; CHUDZINSKI, A.M.; CASTRO, S.C.B.; KAMIGUTI, A.S.; KELEN, E.M.A.; HIRATA, M.H.; MIRANDOLA, R.M.S.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Randomized comparative trial of three antivenoms in treatment of envenoming by lance-head vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil **Q. J. Med.** v. 86, p. 315–325, 1993.
- CARDOSO, J.L.C. A fitoterapia antiveneno na Medicina Brasileira. Em: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S.; HADDAD, J.V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Editora Sarvier, 2009, p.481-485.
- CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMANA, E. Neutralization of the hemorrhagic effect induced by *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) venom with tropical plant extracts. **Rev. Biol. Trop.**, v. 47, p. 605–616, 1999.
- CAVALCANTI, W.L.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALACCI, M. Neutralization of snake phospholipases A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) activities in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, p. 490-497, 2007.
- CHAVES, F; BARBOZA, M; GUTIÉRREZ, J. M Pharmacological Study of Edema Induced by Venom of the Snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, p. 31-39, 1995.
- CHEN, Z.L.; ZHU, D-Y. *Aristolochia* alkaloids. In: Brossi, A. (Ed.). **The Alkaloids**, v. 31. Academic Press, London, 1987, p 29-65.

- CHIOATO L.; WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42, p. 869-883, 2003.
- CHIPPAUX, J.P.; GODWA, T.V. Venoms, antivenoms and Immunotherapy. **Toxicon** v. 36, p. 823-846, 1988.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake Venom Variability: Methods of study, Results and Interpretation **Toxicon**, v. 29, p. 1279-1303, 1991.
- CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, p. 823-46, 1997.
- CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull. World Bull. Health Organ.**, v. 76, p. 515–524, 1998.
- CHIPPAUX, J.P. Snake Venoms and Envenomations. Krieger Publishing Company, Malabar (FLA), 2006. p. 287.
- CHIPPAUX, J.P. The venom apparatus. In: J.P. CHIPPAUX Snake venoms and envenomations. Malabar (Florida): Krieger Publishing Company, 2006, p. 47–73.
- CISNE DE PAULA R.; CASTRO, H.C; RODRIGUES, C.R.; MELO, P.A.; FULY, A.L. Structural and pharmacological features of Phospholipases A₂ from snake venoms. **Prot. Pep. Letters**, v. 16, p. 899-907, 2009.
- COE, F.G.; ANDERSON, G.J. Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. **J. Ethnopharmacol.**, v. 53, p. 29–50, 1996.
- COE, F.; ANDERSON, G. Snakebite ethnopharmacopoeia of Eastern Nicaragua **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 303–323, 2005.
- COGO, J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.M.F.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, p. 1947–1959, 2006.
- CORDA, D.; IURISCI, C.; BERRIE, C. Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1582, p. 52-69, 2002.

- COSTA, T. R. ; MARCUSSI, S. ; FERNANDES, R. S. ; GONZALES, I. I. ; OLIVEIRA, C.Z.; MENALDO, D.L.; PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A.M. Evaluation of the antiophidian properties of anacardium humile aqueous extract. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2009, Recife - PE. XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia.
- DA CUNHA, A.P.; TEXEIRA, F.; DA SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. Plantas na terapêutica - Farmacologia e ensaios clínicos. Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, 2007, p. 476.
- DA SILVA, J.O; COPPEDE, J.; FERNANDES, V.C.; SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; MAZZI, M.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO S.V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **J. Ethnopharmacol.** v. 100, p. 145–152, 2005.
- DA SILVA, N.M.V; ARRUDA, E.Z.; MURAKAMI, Y.L.B.; MORAES, R.A.M.; EL-KIK, C.Z.; TOMAZ, M.A. FERNANDES, F.F.A.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; MELO A. P. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196-205, 2007.
- DENNIS, E.A. The Growing Phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochem. Sci.** v. 22, p. 1-2. 1997.
- DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. **Am. J. Respir. Crit. CareMed.** v. 161, p. S32-S35, 2000.
- DE CASTRO, J.L. Medicina Vegetal. Publicações Europa – America, Lisboa, p.141, 1981.
- DE OLIVEIRA, T.; DE AMORIM, H.L.N.; GUIMARÃES, J.A. Interfacial activation of snake venom phospholipases A₂ (svPLA₂) probed by molecular dynamics simulations. **J. Mol. Struct. Theochem.** v. 818, p. 31–41, 2007.
- DÍAZ C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE B.; GENÉ, J.S The effect of toxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: Relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1070, p. 455-460, 1991.

- DÍAZ, B.L.; ARM, J.P. Phospholipase A₂. **Prostag. Leukotr. Ess.** v. 69, p. 87–97, 2003.
- DIOGO, L. C.; MARCUSSI, S.; OLIVEIRA, C.Z.; MATRANGULO, P.V.F.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; GIULIATTI, S.; SOARES, A.M.; LOURENÇO, M.V. Inhibition of snake venom phospholipases A₂ by plant extracts from *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v.104, p. 293-299, 2009.
- DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E.P. In: **The proteins**. I-A. (Neurath, H.; Bailey. K. Eds), 1953.
- DUNCAN, C.J. Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. **Experientia**, v.34, p. 1531-5, 1978.
- EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.**, v. 2, p. 85-95, 1973.
- FAN, H.W.; CARDOSO, J.L. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: J. MEIER, J. WHITE, editors. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Boca Raton (Florida): CRC Press, p. 667–688, 1995.
- FAN, H.W.; SANTALUCIA, M.; OLIVEIRA, R.C. Epidemiology of snakebites in Brazil 18 years after the implementation of the national program for snakebites control. In: VIII Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology. Angra dos Reis, RJ-Brazil, 2004, p. 171.
- FEENY, P. Ecological opportunism and chemical constraints on the host associations of swallowtail butterflies. In: Scriber J.M., Tsubaki Y. & Lederhouse R.C. (eds): *Swallowtail Butterflies; Their Ecology and Evolutionary Biology*. Scientific Publishers, Gainesville, FL, 1995, p. 9–15.
- FERREIRA, L.A.; HENRIQUES, O.B.; ANDREONI, A.A.S.; VITAL, G.R.F.; CAMPOS, M.M.C.; HABERMEHL G.G.; MORAES. V.L.G. de Antivenom and biological effects of AR-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**, v. 30, p. 1211-1218. 1992.
- FONT-QUER, P. Plantas medicinales. El Dióscorides Renovado. Segunda edición, Labor S.A, Barcelona, España, 1973, p. 26-42.
- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: J.L.C. CARDOSO, F.O.S. FRANÇA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUE, V. HADDAD, (Eds.) Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica. São Paulo: Sarvier, p. 2009, p. 81–95,.

- FRANCESHI, A.M.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J.M. Isolation and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 38, p. 63–77, 2000.
- FULY, A.L.; MACHADO, O.L.; ALVES, E.W.; CARLINI, C.R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1372–1380, 1997.
- GACHET, M.S.; SCHÜHLY, W. Jacaranda - An ethnopharmacological and phytochemical review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, p. 14-27, 2009.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - A Rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, p. 3219-3228, 1980.
- GENÉ, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 27, p. 841-848, 1989.
- GIORGI, R.; BERNARDI, M.M.; CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 31, p. 1257–1265, 1993.
- GONZÁLEZ, F. In: G. Harling & L. Anderson (eds) Aristolochiaceae. Flora de Ecuador. University of Goteborg, Stockholm. & D. W. Stevenson. 1994, v. 51, p.1-42.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J.; ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, v.22, p. 85-98, 1984.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; PONRA, J.D.; THWIN, M.M. Myotoxic phospholipases from snake venoms: general myoglobinuric and local myonecrotic toxins. In: KINI, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, Chichester, 1997, p. 287–320.
- GOWDA, T.V Interaction of Snake venom phospholipases A₂ with plant isolates. In: *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function, Mechanism*, Kini RM (ed.). John Wiley and Sons, Chichester, 1997, p.321–352.

- GUERRANTI, R.; CHINYERE AGUIYI J.; ERRICO, E.; PAGANI, R.; MARINELLO, M. Effects of *Mucuna pruriens* extract on activation of prothrombin by *Echis carinatus* venom. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 175-180, 2001.
- GUPTA M.P.; CORREA M.D; SOLIS, P.N; JONESA, A; GALDAMES C; GUIONNEAU-SINCLAIR, F. Medicinal plant inventory of Kuna Indians: Part 1 **J. Ethnopharmacol.**, v. 40, p. 77-109, 1993.
- GUPTA, M.P.; SOLÍS, P.N.; CALDERÓN, A.I.; GUINNEAU-SINCLAIR, F.; CORREA, M.; GALDAMES C.; GUERRA, C.; ESPINOSA, A.; ALVENDA, G.I.; ROBLES, G.; O CAMPO, R. Medical Ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama **J. Ethnopharmacol.**, v. 96 p. 389–401, 2005.
- GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenin produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 2, p. 411-413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; GENE, J.A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v.27, p. 735-45, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p.1405-1424, 1995
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, p.19-29. 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: R.M. KINI, Editor, *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, p. 3, 1997.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVEZ, F. Neutralization of Local Tissue Damage Induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1529-1538, 1998.

- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.
- GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, D.G; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership **PLoS Medicine**, v. 3, p. 727-731, 2006a.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; AYMERICH, R. El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado, 2006b, p. 26.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr. Pharm. Design**. v. 13, p. 2935-2950, 2007.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: J.L.C. CARDOSO, F.O.S. FRANCA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUE, V. HADDAD, (Eds.) Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 366–375.
- GUTIÉRREZ, J.M.; FAN, H.W.; SILVERA, C. L.M; ANGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, p. 625-630, 2009a.
- 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, p. 958-975, 2009b.
- GUTIÉRREZ, J.M. Biografía Dr. Clodomiro Picado Twight (1887-1944), **Acta. Med. Costarric**. v. 52, p. 4-5, 2010.
- HARRIS, J.B.; GRUBB, B.D.; MALTIN, C.A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂ notexin and taipoxin. **Exp. Neurol.**, v.161, p.517- 526, 2000.
- HASHIMOTO, K.; HIGUCHI, M.; MAKINO, B.; SAKAKIBARA, I.; KUBO, M.; KOMATSU, Y.; MARUNO, M.; OKADA, M. Quantitative Analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v .64, p. 185-189, 1999.

- HAZLETT, D. Ethnobotanical observations from Cabecar and Guaymí settlements in Central America. **Econ. Bot.**, v. 40, p. 339–352, 1986.
- HILL, A. F. Botánica Económica. Plantas útiles y productos vegetales. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España, 1965, p. 616.
- HÖLTJE, H.D.; FOLKERS, G.; Molecular modeling basing principles and applications, WILEY-VCH: Weinheim, 1996. p. 310.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 615-27, 1988.
- HOUGHTON, P.J.; OSIBOGUN, I.M. Flowering plants used against snakebite. **J. Ethnopharmacol.**, v. 39, p.1–29, 1993.
- HOUGHTON, P.J. Plant extracts active towards snake venom enzymes. In: Enzymes from Snake Venom Ed. Graham S. Bailey, Alaken, Inc., Colorado, USA, 1998, p. 736
- INDRAYANTO, I.; SETIAWAN, B.; CHOLIES, N. Differential diosgenin accumulation in *Costus speciosus* and its tissue cultures. **Planta Medica**, v. 60, p.483-484, 1994.
- INGLIS, B. Historia de la Medicina. Ediciones Grijalbo, S.A., Barcelona, España, 1968, 221 p.
- ISUZU, I.U.; HARVEY, A.L. The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. **Toxicon**, v. 42, p. 763-768, **2003**.
- ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v. 9, p.401-410, 1964.
- IWAGANA, S; SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms In: Lee, C.Y (Ed) Snake Venom. Handbook of experimental Pharmacology. Springer, New York, 1979, v. 52, p. 61-158.
- JANÚARIO, A. H.; MARCUSSI, S.; SANTOS, S. L.; MAZZI, M. V.; SAMPAIO, S. V.; PIETRO, R. C. R. L.; CASTELLANO, E. E.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from

Baccharis trimera (Asteradeae): Anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem. Biol. Interact.**, v. 150, p. 243-251, 2004.

JIANG, X.; XU, J.; YANG, Q. Soluble expression, purification, and characterization of *Gloydius shedaoensis* venom glosedobin in *Escherichia coli* by using fusion partners. **Appl. Microbiol. Biot.** v. 85, p. 635-42, 2009

JIMENEZ-FERRER, J.E.; PÉREZ-TERÁN, Y.Y.; ROMÁN-RAMOS, R.; TORTORIELLO, J. Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. **Phytomedicine**, v. 12, p.116-122, 2005.

JIMENEZ-PORRAS, J.M. Biochemistry of Snake Venoms. **Clinic. Toxicol.**, v. 3, p. 389-431, 1970.

JOLY, L.G.; GUERRA S; SEPTIMO, R.; SOLIS, P.N; CORREA, M.D; GUPTA, M.P; LEVY S; SANDBERG F; PERERAD, P. Ethnobotanical Inventory of Medicinal Plants Used by the Guaymi Indians in Western Panama. Part I, **J. Ethnopharmacol.** v. 20, p. 145-171, 1987.

JOLY, L.G.; GUERRA, S.; SEPTIMO, R.; SOLIS, P.N.; CORREA, M.D.; GUPTA, M.P.; LEVY, S; SANDBERG, F; PERERAD, P. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymi Indians in Western Panama. part II **J. Ethnopharmacol.**, v. 28, p. 191-206, 1990.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 278, p. 319–325. 1990.

KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon**, v. 27, p. 955-963, 1989.

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

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DA SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.** v.5, e218. doi:10.1371/journal.pmed.0050218. 2008.

KINI, R. M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v.27, p. 613-35, 1989.

- KINI, R. M. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle,. In: R. M. Kini (Ed), *Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, 1997, p. 1-28.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-40, 2003.
- KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, p. 1147-61, 2005.
- KOH, D.C.I; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine **Cell. Mol. Life Sci.** v. 63, p. 3030–3041, 2006.
- KOH, H.L.; WANG, H.; ZHOU, S.; CHAN, E.; WOO S.O. Detection of aristolochic acid I, tetrandrine and fangchinoline in medicinal plants by high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v. 40, p. 653–661, 2006.
- KOKWARO, J.O. Conservation of medicinal plants in Kenya. In: Heywood, V., Synge, H & Akerele, O (eds). *Conservation of Medicinal Plants*. Cambridge, UK; Cambridge University Press. 1991. p.315-320.
- LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **BMC. Complement Altern. Med.**, v. 1, 14726882-1-10, 2001.
- LEE, C.Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms **Annu. Rev. Pharmacol.**, v. 12, p. 265-286, 1972.
- LEE GAN, G. Snake Venoms. **The Singapore Family Physician**, v. 28, p. 39-54, 2002.
- LI, Y.; YU, B.Z.; ZHU, H.; JAIN, M.K.; TSAI, M.O. Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. **Biochemistry**, v. 33, p. 14714-14722, 1994.
- LIZANO, S.; DOMONT, G; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants **Toxicon**, v. 42, p. 963–977, 2003.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RAMÍREZ, M.; DÍAZ, C. Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v.30, p. 239-245, 1992.

- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885–901, 2003.
- LOMONTE, B.; LEON, G.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; NUÑEZ, V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, p.1012–1028, 2009.
- LORBER, D. M. Computational drug design. **Chem. Biol.**, v. 6, p. R227-R228, 1999.
- LYON DE CASTRO, J. Medicina Vegetal. Teoría e Prática conforme a Naturopatia Publicações Europa-América Portugal, 1981, p. 374.
- MCCUE, M. Enzyme activities and biological functions of snake venoms. **Appl. Herpetolog.**, v. 2, p. 109-123, 2005
- MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA, P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 364-370, 2005.
- MARCUSSI, S.; MALOSSO, M.G.; MENALDO, D.L.; AMUI, S.F.; GIULIATTI, S.; LOURENÇO, M.V.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, P.S.; PEREIRA, A.M.S.; SOARES, A.M. Antisnake venom properties of *Jacaranda decurrens* and *in vitro* germoplasm bank. **Phytomed.** Submitted, 2010.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.
- MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v 30, p. 1131-1142, 1992,
- MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.**, v. 48, p. 223-236, 1990.
- MEIER, J.; WHITE, J., Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC Press, Boca Raton. USA, 1995, p. 768.
- MELO, P.A.; DO NASCIMENTO M.C.; MORS, W.B.; SUÁREZ-KURTZ. G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of Crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, p. 595-603, 1994.

- MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Ability of wedelolactone, heparin and parabromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**, v. 37, p.199–215, 1999.
- MORA, J.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ J.M. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: Insights into a hidden aspect of envenomation. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p.1-10, 2008.
- MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein–kinin system: current and future pharmacological targets. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 99, p. 6–38, 2005.
- MOREIRA, L.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M.; BORKOW, G. Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.**, v. 57, p. 124-133, 1992.
- MOREIRA, L.; BORKOW, G.; OVADIA M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, v. 32, p. 977-987, 1994.
- MORRIS, G.M.; GOODSELL, D.S.; HALLIDAY, R.S.; HUEY, R.; HART, W.E.; BELEW, R.K.; OLSON, A.J. Automated Docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Comput. Chem.**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.
- MORS, W.B.; DO NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; DA SILVA, M.H.; MELO, P.A.; SUAREZ-KURTZ, G. Neutralization lethal and myotic activities of South American rattlesnake venoms by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**, v. 27, p. 1003–1009, 1989.
- MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite: The molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.
- MURAKAMI, M.; TADA, K.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; SAWADA, H.; KUDO, I. Detection of secretory phospholipase A₂s related but not identical to type IIA isozyme in cultured mast cells. **FEBS. Lett.**, v. 413, p. 249-254, 1997.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A₂s. **Adv. Immunol.**, v. 77, p.163-194, 2001.

- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **J. Biochem.**, v. 131, p. 285-92, 2002.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A₂. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 1158-1164, 2004.
- NASCIMENTO, I.R.; LOPES L.M. Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 953-957, 2003.
- NEVES, P.C.A.; NEVES, M.C.A.; BELLA CRUZ, A.; SANT'ANA, A.E.G.; YUNES R.A.; CALIXTO J.B. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw edema induced by phospholipase A₂ and phospholipase C. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 243, p. 213-219, 1993.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (Western Diamondback Rattlesnake) **Archi. Biochem. Biophys.** v. 231, 1984, p. 309-319
- NUÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*, **Toxicon**, v. 44, p. 91–101, 2004.
- NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L.A.; MERFORT, I.; LOMONTE B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4 nerolidylcatechol as active principle, **Phytochemistry**, v. 66, p. 1017-1025, 2005.
- OLIVEIRA, C. Z.; MARCUSSI, S.; MAIORANO, V. A.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract of *Bauhinia forficata* against snake venom. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 213-216, 2005.
- OTERO, R.; TÓBON, G.S.; GÓMEZ, L.F.; OSORIO, R.G.; VALDERRAMA, R.; HOYOS, D. URRETA; J.E., MOLINA S.; ARBOLEDA, J.J. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó Aspectos clínicos y epidemiológicos. **Acta. Med. Colomb.**, v, 17, p. 229–249, 1992a
- OTERO, R.; OSORIO, R.G; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, C.A. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia) **Toxicon**, v. 30, p. 611–620, 1992b.

- OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; NÚÑEZ, V.; ROBLES, A.; ESTRADA, R.; SEGURA, E.; TORO, M.F.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A.; RAMÍREZ, E.C.; GÓMEZ, G.; CASTAÑEDA, J.; MORENO, M.E. A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 696–700, 1996.
- OTERO-PATIÑO, R.; CARDOSO, J.L.C.; HIGASHI, H.G.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A.; TORO, M.F.; GARCÍA, M.E.; SIERRA, A.; GARCÍA, L.F.; MORENO, A. M.; MEDINA, M.C.; CASTAÑEDA, N.; SILVA-DÍAZ, J.F.; MURCIA, M.; CÁRDENAS, S.Y.; DIAS DA SILVA, W.D. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Urabá, Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 183–189, 1998.
- OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.; GARCÍA, M.; DÍAZ, A. Evaluación experimental de la capacidad neutralizante de los extractos contra los efectos letal y enzimático del veneno de la Mapaná Equis (*Bothrops atrox asper*) In: OTERO, R; FONNEGRA R; JIMÉNEZ, S. Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes em Antioquia y Choco, 1^{era} edición Colômbia: Grandacolor Medellín, Capítulo II p. 59-71. 2000a.
- OTERO, R.; FONNEGRA R.; JIMÉNEZ, S.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S.; GARCÍA M.; SALDARRIAGA M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R.; DÍAZ, A.; VALDERRAMA R.; DUQUE A.; VÉLEZ, H. Mordeduras de serpientes y Etnobotánica em el Noroccidente Colombiano. Uso tradicional de las plantas In: OTERO, R; FONNEGRA R; JIMÉNEZ, S. Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes em Antioquia y Choco, 1^{era} edición Colômbia: Grandacolor Medellín, Capítulo II p. 31-57. 2000b.
- OTERO, R.; FONNEGRA R.; JIMÉNEZ, S.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S.; GARCÍA M.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R.; DÍAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE A.; VÉLEZ, H. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 493–504, 2000c.
- OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; RODRÍGUEZ, O.; CÁRDENAS, S.J.; RODRÍGUEZ, L., CARO, E. Aspectos actuales de las mordeduras de serpientes en Colombia. Propuesta de intervención para un problema grave de salud en Antioquia y Choco **Revista Epidemiológica de Antioquia**, v. 26, p. 43–48. 2001.
- OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M.B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J.L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L.M.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L.M.; URIBE, F. L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ A. Complications of *Bothrops porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia: a clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a University Hospital. **Toxicon**, v. 40, p. 1107–1114, 2002.

- OTERO, R. Envenenamiento ofídico. IN: CORREA, J.A., GÓMEZ, J.F., POSADA, R. (EDS.), Fundamentos de Pediatría. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín. Colombia, Tomo V, 2007.
- OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSORIO, R.G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; DÍAZ A.; QUINTANA, J.C Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Braz. J. Med. Res.**, v. 37, p. 969-977, 2007.
- OTERO-PATÍÑO, R., El accidente ofídico: realidades y perspectivas. In: Memorias VIII Congreso de APANAC, Panamá, 2008.
- OTERO-PATÍÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. **Toxicon**, v. 30, p. 1-14. 2009.
- OWNBY, C. L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.
- PENSO, G. The role of WHO in the selection and characterization of medicinal plants (vegetable drugs). **J. Ethnopharmacol.**, v. 2, p.183-8, 1980.
- PEREAÑEZ, J.A.; JIMÉNEZ, S.L.; QUINTANA, J.C; NÚÑEZ, V.; FERNÁNDEZ, M.; RESTREPO, Y. Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias. **Vitae**, v. 15, p. 157-164, 2008.
- PEREIRA, M.F.; NOVELLO, J.C.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; LANDUCCI, E.T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (jararacucu) venom with low phospholipase A₂ activity. **J. Protein Chem.** v. 17, p. 381–386. 1998.
- PETERS-GOLDEN, M. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. **Clin. Exp. Allergy.** v. 28, p. 1059-1065, 1998.
- PINHO, F.M.O; PEREIRA, I.D. **Ofidismo. Ass. Med. Brasil**, v. 47, p. 24-29, 2001.
- PIRKLE, H.; THEODOR, I. Trombin-Like Enzymes. In: Enzymes from Snake Venom Ed. Graham S. Bailey, Alaken, Inc., Colorado, USA. 1998, p. 736
- QUINTERO, A. El envenenamiento ofídico en Panamá: epidemiología, fisiopatología y evaluación por el Laboratorio Clínico. **Tecnomedica**, v. 1, p. 24-27, 2000.

- QUINTERO, A. Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá. Tese de Doutorado, FCFRP-Universidade de São Paulo, Brasil, p.181, 2009.
- RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 142, p. 328–346, 2006.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENT, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p.11627-11634, 1985.
- REYES-CHILPA, R.; GOMEZ-GARIBAY, F.; QUIJANO, L.; MAGOS-GUERRERO, G.A.; RIOS, T.; Preliminary results on the protective effect of edunol, a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (Leguminosae), against *Bothrops atrox* venom in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 42, p.199–203, 1994.
- REYES, R.; JIMENEZ, M. Química de las plantas alexíteras. **Interciencia**, v. 20, p. 257–264, 1995.
- RIBARDO, D.A.; CROWE, S.E.; KUHL, K.R.; PETERSON, J.W.; CHOPRA, A.K. Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A₂-activating protein and by activation of phospholipase C and D. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 5467-5475, 2001.
- RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, p. 305–314, 2004.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snakebites in South America In. BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. (Eds). *Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press New York, 1971, p. 345-381.
- RUCAVADO, A.; LOMONTE, B. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. **Toxicon**, v. 34, p. 567-577, 1996.
- RUSSELL, F.E. American Indians, snakes and snakebite. In Russell F.E (Editor). *Snake Venom Poisoning*. Scholium International INC., New York, USA, 1983, p 489-513.

- SCOTT, D.L.; SIGLER, P.B. The structural and functional roles of calcium ion in secretory phospholipases A₂. **Adv. Inorg. Biochem.**, v. 10, p.139-155, 1994.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1761, p. 1246-1259, 2006.
- SANCHEZ, E.E.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Inhibitors of snake venom and development of new therapeutics. **Inmunopharmacol. Immunotoxicol.** v. 5, p. 1-32, 2008
- SASA, M., VAZQUEZ, S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990–2000. **Toxicon**, v. 41, p. 19–22. 2003.
- SELVANAYAGAM Z. E., GNANAVENDHAN S. G., BALAKRISHNA K., BHIMA RAO R.. Antisnake venom botanicals from ethnomedicine. **J. Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 2, p. 45-100, 1994.
- SINGH, S.B; ARMUGAM, A.; KINI, R.M.; KANDIAH, J. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 375, p. 289–303, 2000.
- SIME, R.K.; FEENY, P.P.; HARIBAL, M.M. Sequestration of aristolochic acids by the pipevine swallowtail, *Battus philenor* (L.): Evidence and ecological implications. **Chemoecology**, v. 10, p. 169-178. 2000.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1488, p. 1-19, 2000.
- SOARES, A.M.; ANGRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and funcional characterization of a myotoxin I a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 373, p. 7-15, 2000a.
- SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and funcional characterization of a BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi* pauloensis venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-209, 2000b.

- SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, p. 855-868, 2003.
- SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, p.1677-1690, 2004a.
- SOARES, A. M.; JANÚARIO A.H.; LOURENÇO, M.V.; PEREIRA, A.M.; PEREIRA, P.S. Snake Venom effects-Neutralizing Brazilian plants **Drugs of the Future**, v. 29, p. 1-13, 2004b.
- SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S.; Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v 12, p. 2625-2641, 2005.
- SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; FERNANDES, R. S.; MENALDO, D.L.; COSTA, T. R.; LOURENÇO, M.V.; JANUARIO, A. V.; PEREIRA, P.S. Medicinal plant extracts and molecules as the source of new anti-snake venom drugs. **Front. Med. Chem.** v. 4, p. 309-346, 2009.
- SOSA, S.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R.G. ; PIZZA, C.; ALTINIER, G; TUBARO A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 211-215, 2002.
- SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Sci.**, v. 8, p. 370–380, 1999.
- SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Anal. Biochem.**, v. 287, p. 252-260, 2000.
- THEAKSTON, R.D,G.; REID, H. A Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **B. World. Health. Organ.**, v. 61, p. 949-956. 1983.
- THEAKSTON, R.D.G. Snake bite: the kinetics of envenoming and therapy. In: BON, C., GOYFFON, M. (Eds.), *Envenomings and Their Treatments*, Editions Fondation Marcel Merieux, Lyon, 1996. p. 117–126.

- THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of WHO workshop on the standardization and control on antivenoms. **Toxicon**, v. 41, p. 541–557, 2003.
- TIAN-SHUNG, W.; AMOORU, G.D.; CHUNG-REN, S.; PING-CHUNG, K. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities **Nat. Prod. Rep.**, v. 21, p. 594-624, 2004.
- TIAN-SHUNG, W.; AMOORU, G.D.; CHUNG-REN, S.; PING-CHUNG, K. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species **Nat. Prod. Chem.**, v. 32, p.855-1018, 2005.
- TICLI, F.K.; HAGE, L. I.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; STABELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new phospholipases A₂ snake venom inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318-327, 2005.
- TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II; a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, v. 82, p. 245-50, 2000.
- TRUMP, B.F. Characteristics and mechanisms of cell injury and cell death: the role of [Ca²⁺]_i. **Mar. Environ. Res.** v. 42, p. 57-63, 1996.
- TSAI, L.H.; LIU, H.J.; YANG, C.P.; CHANG C. Inactivation of Formosan snake venoms *in vitro* by the crude extract of *Aristolochia radix*. **J. Formosan Med. Ass.**, v. 74, p. 352-60, 1975.
- TU, A.T.; HENDON, R.R. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.76, p. 377–383, 1982.
- TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 37–62, 1996.
- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, 59–70. 2000.
- VERHEIJ, H.M.; VOLWERK, J.J.; JANSEN, E.H.; PUYK, W.C.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH J.; DE HAAS, G.H. Methylation of histidine-48 in pancreatic

- phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 19, p. 743–750, 1980.
- VILAR, J.C.; CARVALHO, C.M.; FURTADO, M.F.D. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas **Biol. Ger. Exp.** v. 6, p. 3-36, 2005.
- VISHWANATH, B.S.; RAO, A.; GOWDA, T.V. Interaction of phospholipase A₂ from *Vipera russelli* venom with Aristolochic acid: A circular dichroism study. **Toxicon**, v. 25, p. 939-946, 1987.
- VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, v. 25, p. 501–515, 1987.
- VISHWANATH, B; VEERABASAPPA GOWDA T. Interaction of Aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A₂: its effect on enzymatic and pathological activities. **Toxicon**, v. 25, p. 929-937, 1987.
- VISHWANATH, B.S.; FAWZY, A.A.; FRANSON, R.C. Edema-inducing activity of phospholipase A₂ purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. **Inflammation**, v. 12, p. 549-561, 1988.
- VOEKS, R.A. Disturbance Pharmacopoeias: Medicine and Myth from the Humid Tropics. **An. Assoc. Amer. Geog.**, v. 94, p. 868-888, 2004.
- WAGNER, K.; BREZESINSKI, G. Phospholipases to recognize model membrane structures on a molecular length scale. **Curr. Opin. Colloid. In.**, v.13, p. 47–53, 2008
- WARD, R.J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A.H.C; RULLER, R.; SÁ, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v. 362, p. 89–96, 2002
- WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites *In* C. BON & M. GOYFFON (eds.). Envenomings and Their Treatments. Foundation Marcel Mérieux, Lyon. 1996, p. 64-76.
- WARELL, D. Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America. *In*: J. Campbell; W.W. Lamar, eds. Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca: Cornell University Press, p. 709–761, 2004.

- WARELL, D. Venomous Animals. **Medicine**, v. 35, p. 659-662, 2007
- WEINER, P. K.; KOLLMAN, P. A. AMBER: Assisted model building with energy refinement. a general program for modeling molecules and their interactions, **J. Comp. Chem.**, v. 2, p. 287-303, 1981.
- WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; NGUYEN, D. T.; CASE, D. A. "An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. **J. Comp. Chem.**, v. 7, p. 230-252, 1986.
- WEN, FH Soroterapia. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Editora Sarvier, 2009. p, 432-445.
- YANG, C.C. Chemistry and evolution of toxins in snake venoms **Toxicon**, v. 12 p. 1-2, 1974.
- YANG, L. C.; WANG, F.; LIU, M. A study of an endothelin antagonist from a chinese anti-snake venom medicinal herb. **J. Cardiovasc. Pharm.** v.31, p. S249-S 250,1998.
- YUAN, k.; JIA, A.; LU, J.L.; ZHU, J.X. Structural identification of new C-glycosylflavones from *Mimosa pudica* **Chin. J. An. Chem.** v. 35, p. 739-742, 2007a.
- YUAN, Y.; NIE, L.; ZENG, D.; LUO, X.; TANG, F.; DING, L.; QIAN L.; GUOA, M.; YAO, S.H. Simultaneous determination of nine aristolochic acid analogues in medicinal plants and preparations by high-performance liquid chromatography v. **Talanta**, v. 73, p. 644–650, 2007b.