UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico

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

Área de Concentração: **Toxicologia**

Orientada: Tássia Rafaella Costa

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Ribeirão Preto

2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Tássia Rafaella

Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico. Ribeirão Preto, 2010.

81 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Soares, Andreimar Martins.

1. *Anacardium humile*. 2. Plantas medicinais antiofídicas. 3. Inibidores naturais, 4. Peçonhas de serpentes. 5. Miotoxinas. 6. Fosfolipases A₂.

Nome da aluna: **Tássia Rafaella Costa**

Título do trabalho: Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico.

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 M. Soares**

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Dedico este trabalho:

A minha família....

Pessoas incríveis que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e tornando menos árdua a minha caminhada.

Alcançamos juntos mais uma vitória, uma das minhas maiores conquistas.

Amo vocês!!

Agradecimentos

Ao grande AMIGO e orientador Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, pelos ensinamentos e pela confiança. Por me apresentar um mundo novo e fascinante: A pesquisa científica. Obrigada pela paciência, pelos puxões de orelha e pelos incentivos. A você minha eterna gratidão!

Aos amigos de laboratório Renata, Danilo, Norival, Carolina, Lucas, Johara, Sil, Clayton e todos outros com quem tive o prazer de conviver durante esse tempo. Obrigada pela amizade, companheirismo, ensinamentos, diversão e apoio sempre. Vocês são pessoas maravilhosas!

A todos os técnicos e funcionários da FCFRP-USP pelo auxílio, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo S. Pereira, do Laboratório de Química de Produtos Naturais aplicadas a Biotecnologia (UNAERP) pelo auxílio na realização dos fracionamentos cromatográficos de alta eficiência (CLAE).

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. Marcos R. M. Fontes, do Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Botucatu (UNESP) pela colaboração nos ensaios de dicroísmo circular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

COSTA, T.R. Avaliação da Atividade Antiofídica do Extrato Vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e Caracterização Fitoquímica do Ácido Gálico com Potencial Antimiotóxico. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

Os envenenamentos ofídicos constituem um problema relevante de saúde pública em diversas regiões do mundo, particularmente em países da zona tropical e neotropical. A fisiopatologia do acidente ofídico é constituída por uma série de eventos complexos tanto a nível local quanto sistêmico, e o soro antiofídico é o único tratamento utilizado. No entanto, os efeitos tóxicos locais induzidos durante o envenenamento por serpentes, principalmente do gênero *Bothrops*, não são eficientemente neutralizados pela soroterapia tradicional. Por esta razão, procuram-se alternativas complementares, como as plantas medicinais antiofídicas que são usadas por comunidades que não têm acesso a soroterapia. A flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico, as quais têm sido pouco estudadas cientificamente. Neste estudo foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* de neutralização de peçonhas ofídicas com o extrato aquoso das entrecascas de *Anacardium humile* (EAAh), e, o isolamento e a caracterização fitoquímica de um inibidor de miotoxinas, o ácido gálico (AG). Para os ensaios de inibição, foram utilizadas soluções contendo peçonha bruta ou toxina isolada misturadas com diferentes quantidades de extrato vegetal que foram previamente incubadas por 30 min a 37 °C. Também foi realizada administração do extrato após o envenenamento em diferentes intervalos de tempo para os testes de inibição da miotoxidade. Observou-se que EAAh tem atividade inibitória sobre os efeitos tóxicos (letalidade, miotoxidade, e hemorragia) e farmacológicos/enzimáticos (edema, atividade fosfolipásica e coagulante) induzidos pelas peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e das toxinas isoladas. O extrato vegetal inibiu 100% a letalidade induzida pela peçonha de *C. d. terrificus* e sua principal neurotoxina, a crotoxina. O EAAh foi submetido a fracionamento cromatográfico analítico, e em condições polares foi possível identificar e isolar o ácido gálico, o qual demonstrou tempo de retenção e espectros de ressonância magnética nucleares similares ao padrão comercial e a dados de literatura deste mesmo composto, respectivamente. O ácido gálico isolado foi capaz de inibir a atividade miotóxica induzida pela peçonha bruta de *B. jararacussu* e sua principal miotoxina, a bothropstoxina-I, uma PLA₂-símile Lys49. A análise dos espectros de dicroísmo circular e os estudos de interação por modelagem molecular sugerem que o ácido gálico forma um complexo com a BthTX-I de *B. jararacussu* em seu sítio ativo, inibindo sua atividade tóxica. A ligação do ácido gálico com as miotoxinas não modificou nem a forma e nem a intensidade dos espectros de dicroísmo circular, não induzindo alterações significativas na porcentagem dos diversos domínios que constituem a estrutura secundária destas proteínas. O ácido gálico assim como outros taninos, tem revelado-se um bom inibidor das ações tóxicas de peçonhas de serpentes e está relacionado com a ação inibitória do extrato de *Anacardium humile*.

Palavras-chave: *Anacardium humile*, plantas medicinais antiofídicas, inibidores naturais, peçonhas de serpentes, miotoxinas, fosfolipases A₂.

ABSTRACT

COSTA, T.R. Evaluation of Antiophidian Activity from *Anacardium humile* Plant Extract: Isolation and Phytochemical Characterization of the Gallic Acid with Antimyotoxic Potential 2010. 81 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

Ophidian envenomations are a significant problem of public health in several regions of the world, particularly in tropical and neotropical countries. The pathophysiology of snakebite accidents is constituted by a complex series of events both locally and systemically, and the antivenom serum is the only treatment used. However, local toxic effects induced during envenomation by snakes, especially from the genus *Bothrops*, are not effectively neutralized by the traditional serum therapy. For this reason, additional alternatives are made necessary, such as the use of medicinal plants that are used by communities with no access to serum therapy. The Brazilian flora possesses a wide variety of medicinal plants with antiophidian potential, which have been little-studied scientifically. In the present study, we performed *in vitro* and *in vivo* neutralization of snake venoms with the aqueous extract of inner bark of *Anacardium humile* (EAAh), and the isolation and phytochemical characterization of an inhibitor of myotoxins, the gallic acid (GA). For the inhibition assays, we used solutions containing crude venom or isolated toxin mixed with different amounts of plant extracts that were previously incubated for 30 min at 37°C. Administration of the extract after envenomation was also performed at different time intervals for myotoxicity inhibition assays. It was observed that EAAh has inhibitory activity against the toxic (lethality, myotoxicity and hemorrhage) and pharmacological/enzymatic effects (edema-inducing, coagulant and phospholipase activities) induced by snake venoms of the genera *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* and isolated toxins. The plant extract inhibited 100% of the lethality induced by *C. d. terrificus* venom and its major neurotoxin, crotoxin. The EAAh was subjected to analytical chromatographic separation, and in polar conditions, it was possible to identify and isolate the gallic acid, which showed retention time and nuclear magnetic resonance spectra similar to the commercial standard and to literature data of this same compound, respectively. Gallic acid alone was able to inhibit the myotoxic activity induced by crude venom of *B. jararacussu* and its main myotoxin, BthTX-I, a Lys49 PLA₂-like enzyme. The analysis of circular dichroism spectra and interaction studies by molecular modeling suggest that gallic acid forms a complex with BthTX-I in its active site, which inhibits its toxic activity. The binding of gallic acid to myotoxins did not change neither the form nor the intensity of circular dichroism spectra, not inducing significant changes in the percentage of the various domains that form the secondary structure of these proteins. The gallic acid and other tannins have been showed to be good inhibitors of the toxic effects of snake venoms, and our study showed that this acid is related to the inhibitory action of the *Anacardium humile* extract.

Keywords: *Anacardium humile*, antiophidian medicinal plants, natural inhibitors, snake venoms, myotoxins, phospholipase A₂.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
AE: Acetato de Etila
AG: Ácido Gálico
BthTX-I: Bothropstoxina-I de *Bothrops jararacussu*
BthTX-II: Bothropstoxina-II de *Bothrops jararacussu*
CB: Fosfolipase A₂ de *Crotalus durissus terrificus*
CD: Dicroísmo Circular
CDCl₃: Clorofórmio Deuterado
CK: Creatina Cinase
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DCM: Diclorometano
DMC: Dose Mínima Coagulante
DMH: Dose Mínima Hemorrágica
DMSO: Dimetilsulfóxido
DMSO_{d6}: Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EAAh: Extrato Aquoso de *Anacardium humile*
FAG: Fração de AG Isolado do Extrato de *A. humile*
GPS: Sistema Global de Medição de Posição
i.d: Injeção Intradérmica
i.m: Injeção Intramuscular
i.p: Injeção Intraperitoneal
MRE: Média de Resíduos de elipticidade/ graus cm² dmol⁻¹ resíduo⁻¹
OMS: Organização Mundial de Saúde
PBS: Solução Salina Tamponada em Fosfato
PLA₂: Fosfolipase A₂
RMN: Ressonância Magnética Nuclear
SD: Desvio Padrão
TMS: Tetrametilsilano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inibição da atividade fosfolipásica das peçonhas de <i>Bothrops</i> , <i>Lachesis</i> e <i>Crotalus</i> pelo EAAh.....	19
Figura 2. Inibição da atividade miotóxica das peçonhas de <i>Bothrops</i> , <i>Lachesis</i> e da toxina BthTX-I pelo EAAh.....	20
Figura 3. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de <i>B. jararacussu</i> e da toxina BthTX-I pelo EAAh, sem pré-incubação e pós-envenenamento.....	21
Figura 4. Inibição da atividade edematogênica das peçonhas de <i>Bothrops</i> , <i>Lachesis</i> e <i>Crotalus</i> pelo EAAh.....	22
Figura 5. Inibição da atividade hemorrágica das peçonhas de <i>Bothrops</i> e <i>Lachesis</i> pelo EAAh.....	23
Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE analítica comparando os perfis cromatográficos de padrões comerciais com o do EAAh.....	28
Figura 7. Fluxograma esquematizando o fracionamento do EAAh e o isolamento do AG.....	29
Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE analítica realizada com a fração F5 do EAAh.....	30
Figura 9. Cromatograma obtido por CLAE semi-preparativa realizada com a fração F5 do EAAh.....	31
Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE semi-preparativa realizada com as frações reunidas (F5-F12) da 1ª purificação de F5.....	31
Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE analítica realizada com as frações reunidas (F10-F20; F21-F24; F25-F32) da 2ª purificação de F5.....	32
Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE analítica realizada com as frações F7 e F9 da 1ª purificação de F5 e com o AG comercial.....	33
Figura 13. Espectro de RMN de ¹ H para a amostra FAG.....	34
Figura 14. Espectro de RMN de ¹³ C para a amostra FAG.....	35
Figura 15. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de <i>B. jararacussu</i> e da toxina BthTX-II pelo AG.....	36

Figura 16. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de <i>B. jararacussu</i> e da toxina BthTX-I pelo AG.....	37
Figura 17. Inibição da atividade edematogênica da peçonha de <i>B. jararacussu</i> e da toxina BthTX-I pelo AG.....	38
Figura 18. Análise dos espectros de CD das miotoxinas (BthTX-I e BthTX-II) de <i>B. jararacussu</i> na ausência e na presença do AG.....	39
Figura 19. Interação molecular computacional do AG com a toxina BthTX-I.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do EAAh sobre a atividade coagulante induzida por peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Lachesis</i>	24
Tabela 2. Efeito do EAAh sobre a letalidade induzida pela peçonha de <i>C. d. terrificus</i> e pela crotoxina.....	25
Tabela 3. Porcentagem dos diversos domínios da estrutura secundária das miotoxinas BthTX-I e II na ausência e presença do inibidor.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Envenenamento ofídico	1
1.2. Plantas antiofídicas	4
1.3. <i>Anacardium humile</i>	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAIS e MÉTODOS	10
3.1. Peçonhas, toxinas e reagentes	10
3.2. Animais	10
3.3. Material vegetal	10
3.4. Fracionamento cromatográfico	11
3.5. Inibição das atividades enzimáticas e farmacológicas	13
3.5.1. Inibição da atividade fosfolipásica	13
3.5.2. Inibição da atividade miotóxica	13
3.5.3. Inibição da atividade indutora de edema	14
3.5.4. Inibição da atividade hemorrágica	15
3.5.5. Inibição da atividade coagulante	15
3.5.6. Inibição da letalidade	16
3.6. Ressonância magnética nuclear	16
3.7. Análise de espectro de dicroísmo circular	16
3.8. Interação molecular computacional	17
3.9. Análise dos resultados	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Inibição das atividades enzimáticas e farmacológicas das toxinas pelo extrato aquoso de <i>A. humile</i>	19
4.2. Fracionamento cromatográfico	26
4.3. Elucidação estrutural: Ressonância Magnética Nuclear	34
4.4. Inibição das atividades enzimáticas e farmacológicas das toxinas pelo ácido gálico	36
4.5. Análise de espectros de dicroísmo circular	38
4.6. Interação molecular computacional entre o inibidor e a toxina	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envenenamento ofídico

Os animais peçonhentos são aqueles capazes de produzir e inocular substâncias tóxicas, tais como serpentes, abelhas, aranhas, escorpiões e outros. As serpentes estão distribuídas por quase todos os ambientes terrestres (MEBS, 2002; CARDOSO et al., 2003) e ao longo da história da civilização, sempre exerceram algum tipo de influência sobre os homens, seja na arte, na religião ou ainda na ciência. Apesar de serem vistas totalmente de maneira destrutiva por muitas pessoas, estes répteis são de fundamental importância no controle biológico de diversos animais que afetam a vida da humanidade, como os ratos. Nas últimas décadas inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de investigar a bioquímica e farmacologia das peçonhas de serpentes.

Existem aproximadamente 2900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, sendo que apenas 410 são consideradas peçonhentas e classificadas de acordo com suas características morfológicas em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (CARDOSO et al., 2003). No Brasil, encontramos representantes das famílias Viperidae e Elapidae, sendo que 32 espécies de serpentes pertencem ao gênero *Bothrops*, 29 ao gênero *Micrurus*, 6 ao gênero *Crotalus* e 2 ao gênero *Lachesis* (FUNASA, 2001).

Os acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública, sobretudo em países tropicais e subtropicais, tanto pela incidência dos acidentes, quanto pela intensidade com que as peçonhas atuam nos organismos vivos. A maioria destes acidentes ocorre com vítimas oriundas da zona rural e as picadas são geralmente nos membros inferiores ou superiores e estão relacionados com fatores climáticos e o aumento da atividade humana no campo (PINHO; PEREIRA, 2001). O quadro clínico desenvolvido pela vítima pode ser muito variado, dependendo da quantidade de peçonha inoculada, da localização da picada, da idade da vítima e condições gerais de saúde antes do acidente e principalmente do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico.

O envenenamento por estas serpentes causa distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea, induzem hemorragia, edema e necrose local. Aproximadamente 20.000 acidentes ofídicos ocorrem por ano no Brasil, e destes casos 0,4% chegam a óbito (FUNASA, 2001). Na América Latina, aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (CARDOSO et al., 2003).

As toxinas de peçonhas de serpentes possuem inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais, que atuam por diferentes mecanismos na paralisia, morte e digestão da presa, além de representar uma arma eficiente na defesa contra predadores e outros inimigos naturais (MEBS et al., 2002). Estas peçonhas são constituídas por uma complexa mistura de substâncias orgânicas como carboidratos, lipídios, aminoácidos e proteínas, e inorgânicas, como cálcio, ferro, sódio, fósforo e zinco. Entretanto, cerca de 90 a 95% do peso seco da peçonha é formado por proteínas, muitas das quais apresentam atividade enzimática (BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ, 2002; MEBS et al., 2002; CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007).

Os componentes das peçonhas de serpentes incluem citotoxinas, cardiotoxinas, lectinas, e diversas enzimas, como fosfolipases A_2 (PLA₂s), metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, amino-transferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e β -glucosaminidases (TU, 1996). Cada uma destas toxinas causa severos traumas como: hemorragia, mionecrose, edema e degradam uma grande quantidade de substratos naturais como fibrinogênio e colágeno. Ademais, as toxinas hemorrágicas causam degradação de proteínas da matriz extracelular e alteração da coagulação sanguínea. A necrose muscular pode produzir uma perda irreversível do tecido e, em alguns casos, torna-se necessário amputar o membro atingido (IWANAGA; TAKAHASHI; SUZUKI, 1976; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WHITE, 2006; GUTIÉRREZ et al., 2007; WARRELL, 2007).

As fosfolipases A_2 (PLA₂s) são amplamente distribuídas na natureza sendo moléculas de elevado interesse médico-científico, devido ao seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e em envenenamentos ofídicos e de abelhas. Existem 5 tipos distintos de fosfolipases A_2 : as denominadas PLA₂s secretadas

(sPLA₂), as citosólicas (cPLA₂), as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) e as lisossomais. Estas enzimas são classificadas e agrupadas de acordo com a sua origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos e outras características bioquímicas adicionais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). As PLA₂s secretadas são enzimas com Mr ~ 15.000, cerca de 7 pontes dissulfeto, e apresentam uma histidina no sítio ativo, além de requererem a presença do íon Ca²⁺ para a catálise (SIX; DENNIS, 2000; MURAKAMI; KUDO, 2004; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Embora as peçonhas de serpentes contenham um grande número de proteínas ativas, em algumas espécies, as PLA₂s constituem a maioria dos componentes tóxicos e exibem uma variedade de efeitos farmacológicos através de mecanismos que podem ser dependentes e/ou independentes de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, convulsão, anticoagulação, efeito sobre plaquetas, indução de edema e danos em tecidos (SOARES; GIGLIO, 2003; KINI, 2003; 2005; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes compreendem uma série de enzimas dependentes de zinco de massa molecular variável, que são responsáveis pelo efeito hemorrágico induzido pelas serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (KAMIGUTI; ZUZEL; THEAKSTON, 1998). De acordo com seus domínios estruturais, estas metaloproteases foram classificadas em quatro grupos principais: P-I, enzimas que possuem somente o domínio metaloprotease; P-II possuem um domínio metaloprotease seguido por um domínio semelhante à desintegrina; P-III compreendem os domínios metaloprotease, desintegrina e rico em cisteína; e P-IV, apresentam todos os domínios anteriormente descritos e um adicional domínio semelhante à lectina tipo-C ligado por pontes dissulfeto (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

As serinoproteases são encontradas em microorganismos, plantas e diversos animais, sendo abundantes nas peçonhas de serpentes principalmente da família Viperidae. Elas apresentam diversas funções e podem estar envolvidas na digestão, ativação do sistema complemento, diferenciação celular e hemostasia. As serinoproteases sozinhas não são letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando

associadas com outras proteínas da peçonha. Estas enzimas afetam muitos passos da cascata de coagulação, muitas vezes não especificamente através da degradação proteolítica, mas seletivamente através da ativação ou inativação de fatores de coagulação envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

Os envenenamentos ofídicos são tratados exclusivamente com a administração de anticorpos policlonais (soroterapia), os quais ajudam a neutralizar as toxinas da peçonha (GUTIÉRREZ, 2002). No entanto, este tratamento não é totalmente efetivo, pois, em alguns casos, as pessoas que são mordidas vivem em locais muito afastados do lugar onde se pode administrar o soro antiofídico e quando chegam aos postos de saúde, a peçonha já destruiu grande parte dos tecidos e, portanto, o soro torna-se menos eficiente (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE 1991; CARDOSO et al., 1993; GUTIÉRREZ et al., 1998). Outro fator limitante relacionado à utilização da soroterapia tradicional é a possibilidade da manifestação de reações adversas uma vez que os anticorpos equinos representam corpos estranhos dentro do organismo da vítima. Além do mais, a soroterapia tradicional tem eficácia limitada na neutralização dos efeitos locais, o que faz com que o paciente não responda com êxito ao tratamento (ALAN; GOMEZ, 1998). Embora esta prática médica seja a única oficialmente utilizada, existem outras práticas como: a utilização das plantas que são administradas na forma de infusão, decocção, maceração, cataplasma e como vapores; estes métodos são utilizados em diferentes partes do mundo para o tratamento das mordidas de serpentes (DOMÍNGUEZ; ALCORN, 1985; CÁCERES et al., 1987; ZAMORA-MARTINEZ; DE PASCUAL POLA, 1992; DI STASI et al., 1994; OTERO et al., 2000).

1.2. Plantas antiofídicas

As plantas medicinais contêm substâncias bioativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas. Existe um grande número de espécies em todo o mundo, usadas desde tempos pré-históricos na medicina popular de diversos povos. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 65 a 80% da população

dos países subdesenvolvidos recorrem ao uso de plantas medicinais para o tratamento de seus males (AKELERE, 1993), sendo os únicos recursos medicamentosos disponíveis. É comum no Brasil, encontrarmos essas plantas sendo comercializadas em feiras livres das grandes cidades, bem como em quintais residenciais. Essas tradições medicinais despertam o interesse dos pesquisadores, já que as plantas constituem uma rica fonte de compostos naturais com uma grande variedade de atividades farmacológicas.

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente a elaboração de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002; FERNANDES, 2010).

As plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos bioativos com potencial de auxiliar diretamente no tratamento do envenenamento ofídico, ou indiretamente, na suplementação da soroterapia convencional. Mais de 700 plantas têm sido descritas em todo o mundo como sendo utilizadas pela medicina popular para os acidentes com serpentes, principalmente pela população rural e indígena. Esse tipo de tratamento é geralmente utilizado a fim de amenizar os danos locais (dor, edema e necrose) e deter a hemorragia provocada pela peçonha (MARTZ, 1992; MORS et al., 2000; OTERO et al., 2000; SOARES et al., 2005; 2009).

Os extratos vegetais são misturas de diversos componentes químicos, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, taninos, ligninas, que detêm a capacidade de inibir a peçonha, atuando diretamente como inibidores enzimáticos, inativadores químicos ou imunomoduladores, que interagem diretamente com macromoléculas alvo (MORS et al., 2000). Várias espécies de plantas antiofídicas têm sido estudadas com o intuito de

caracterizar substâncias biologicamente ativas capazes de neutralizar diversos efeitos locais e sistêmicos provocados pelas peçonhas animais (MORS et al., 2000).

Nas últimas décadas, diversos estudos demonstraram que a flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico que podem ser utilizadas no futuro como drogas ou como modelo para drogas de interesse médico-científico. Mors (1991) listou 578 espécies de plantas pertencentes a 94 famílias, ativas contra peçonhas de serpentes, enquanto que, Martz (1992) listou 11 espécies de plantas que também demonstravam atividade antiofídica. Em 2000, Otero e colaboradores descreveram uma lista de 74 plantas antiofídicas coletadas na Colômbia, na presença de “curandeiros”, com levantamento do nome popular, uso indicado, via de administração e localização. Na maioria dos casos as plantas são preparadas em infusão, decocção ou maceração e administradas por via oral. Em outras ocasiões são utilizadas diretamente sobre o local da mordida, podendo-se banhar o local com o extrato da planta ou vaporizando a região afetada, além da possível aplicação do extrato na forma de cataplasma, ou seja, compressas umedecidas sobre o local da mordida. Mors e colaboradores (2000) descreveram 104 plantas indicadas pela medicina popular com atividade contra peçonhas de serpentes e ainda as várias classes de compostos químicos relacionados com essa ação antiofídica.

Muitos outros trabalhos foram desenvolvidos, demonstrando os efeitos inibitórios de uma série de extratos brutos e com diversos componentes semi-puros e puros, sobre as atividades miotóxica, neurotóxica, hemorrágica, fosfolipásica e outras (MORS et al., 1989; MELO et al., 1994; BORGES et al., 2000; BIONDO et al., 2003; 2004; IZIDORO et al., 2003; NISHIJIMA et al., 2009; DA SILVA et al., 2008; TOYAMA et al., 2009). Os compostos fenólicos são importantes constituintes de plantas com atividades antiofídicas e entre estes compostos podemos destacar os taninos (MORS et al., 2000). Os taninos são polifenóis de origem vegetal, solúveis em água e apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis e precipitar proteínas em água. Esta capacidade dos taninos de se complexarem com proteínas é a base para suas propriedades biológicas e farmacológicas. São geralmente divididos em dois tipos: hidrolisáveis e condensados. No centro de uma molécula de um tanino hidrolisável

existe um carboidrato poliol (geralmente D-glicose). Os grupos hidroxila dos carboidratos encontram-se parcial ou totalmente esterificados com grupos fenólicos como o ácido gálico (nos galotaninos) ou ácido elágico (nos elagitaninos). Esses tipos de taninos são encontrados nas folhas e súber de muitas espécies de plantas, tais como romã, caju, caqui e manga (SINGLETON; KRATZER, 1973; SARKAR; HOWARTH 1976).

Dentre suas várias atividades biológicas, podemos citar: ação bactericida, fungicida, antiviral, inibição de enzimas como glicosiltransferases de *Streptococcus sp.*, inibição da peroxidação de lipídeos e sequestrador de radicais livres e ação antitumoral (SIMÕES et al., 2007). Em 1979, Okonogi e colaboradores, relataram a ação de taninos extraídos de caqui (*Diospyros kaki*) contra a peçonha de serpentes japonesas. O extrato aquoso das folhas de *Schizolobium parahyba*, uma planta nativa do Brasil, foi testado para analisar sua capacidade de inibir algumas atividades biológicas e enzimáticas induzidas pelas peçonhas de *Bothrops alternatus* e *B. moojeni*. Este extrato inibiu a letalidade, as atividades hemorrágica e hemolítica indireta, bem como a atividade coagulante induzida por ambas as peçonhas. Durante os testes observou-se a precipitação de proteínas sugerindo a presença de taninos, que são provavelmente os responsáveis pela inibição das atividades analisadas (VALE et al., 2008). O extrato etanólico da amêndoa da semente de manga (*Mangifera indica*) e seu principal composto fenólico (pentagaloil glicopirranose) apresentaram efeitos inibitórios sobre a ação das peçonhas das serpentes *Calloselasma rhodostoma* e *Naja naja kaouthia* (LEANPOLCHAREANCHAI et al., 2009).

A contínua busca e identificação de novos compostos que possam ser úteis como alternativas e/ou suplemento da soroterapia contra envenenamento por serpente é uma tarefa de grande importância (SOARES et al., 2005). O nosso grupo de pesquisa vem demonstrando cientificamente o potencial destas plantas contra peçonhas de serpentes e/ou toxinas, tais como, *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), *Cordia verbenacea* (TICLI et al., 2005), *Bauhinia forficata* (OLIVEIRA et al., 2005),

Pentaclethra macroloba (DA SILVA et al., 2005; 2007), *Schizolobium parahyba* (MENDES et al., 2008), *Eclipta alba* (DIOGO et al., 2009), *Stryphnodendron barbatiman* (DE PAULA et al., 2010), entre outras.

1.3. *Anacardium humile*

Muitas das plantas validadas cientificamente como antiofídicas são nativas do cerrado brasileiro. O cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira e apresenta uma rica diversidade vegetal, onde muitas espécies são utilizadas pela população local como ervas medicinais, por possuírem propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antitumorais, entre outras. O gênero *Anacardium* pertence à família Anacardiaceae, e vem sendo amplamente investigado pela comunidade científica nas últimas décadas por apresentar diferentes potencialidades farmacológicas. Nesse gênero destaca-se a espécie *Anacardium occidentale*, conhecida popularmente como cajueiro, usada na medicina tradicional, principalmente no Nordeste, por apresentar efeitos anti-inflamatório, antidiarréico, antidiabético, entre outros (LORENZI; ABREU MATOS, 2002). Na literatura científica, extratos vegetais dessa planta demonstraram atividades farmacológicas comprovadas como anti-inflamatória (MOTA; THOMAS; BARBOSA FILHO, 1985; OLAJIDE et al., 2005), antidiabética (EGWIM, 2005) e recentemente, sua ação antiofídica (USHANANDINI et al., 2009).

Outra espécie desse gênero pouco estudada é a *Anacardium humile*, popularmente conhecida como cajuí ou cajuzinho-do-cerrado. É uma planta arbustiva, nativa do Brasil com ocorrência majoritária nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo. Pode atingir de 30 a 80 cm e possui baixa capacidade de produção de frutos. *A. humile* é uma espécie muito utilizada contra inflamações gerais e no tratamento da diarreia pela população local (LORENZI; ABREU MATOS, 2002). Cientificamente já foram comprovadas suas ações antiúlcera (LUIZ-FERREIRA et al., 2008) e larvicida (PORTO et al., 2008). A espécie *A. humile* ainda é pouco estudada e até o momento não existem trabalhos referentes a compostos bioativos isolados. Por esta razão, existe a necessidade de se estudar essa planta do cerrado brasileiro, em busca de compostos ativos com potencial antiofídico.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antiofídico dos extratos vegetais e composto isolado da planta *Anacardium humile* abordando os seguintes aspectos:

1 - Avaliação da atividade inibitória dos extratos vegetais das entrecascas do caule *in natura* da planta *A. humile* sobre os efeitos tóxicos e farmacológicos (inibição sobre as atividades fosfolipásica, edematogênica, hemorrágica, miotóxica, e letalidade) induzidos pela peçonha das serpentes *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni*, *B. brazili*, *Lachesis muta* e *Crotalus d. terrificus* e miotoxinas isoladas.

2 - Estudo fitoquímico dos extratos das entrecascas do caule de *A. humile* por técnicas de isolamento (fracionamento cromatográfico) e identificação (técnicas espectroscópicas) do composto ácido gálico com atividade antimiotóxica.

3 - Estudos de interação molecular entre o ácido gálico de *A. humile* e as miotoxinas da peçonha de *B. jararacussu*, por técnicas de dicroísmo circular e simulação computacional.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peçonhas, toxinas e reagentes

As peçonhas de *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*, foram adquiridas da empresa Proteínas Bioativas (Serpentário Bioagents Ltda), Batatais-SP. A peçonha (10 mg) foi dissolvida em PBS (1 mL), centrifugada a 2000 *xg* por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi separado em alíquotas de 250 µL e armazenados a -20°C. As miotoxinas (BthTX-I e II) foram isoladas da peçonha de *B. jararacussu* como previamente descrito (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000) em cromatografia de troca-iônica em CM-Sepharose equilibrada em bicarbonato de amônio pH 8,0. Os padrões de ácido gálico, ácido clorogênico, rutina, quercetrina e ácido elágico foram adquiridos da Sigma Chem. Co., USA.

3.2. Animais

Para o estudo das atividades biológicas da peçonha e do extrato aquoso de *Anacardium humile* (EAAh) e do composto ativo isolado (ácido gálico) foram utilizados camundongos *Swiss* machos de 18 a 22 gramas. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da USP- Ribeirão Preto 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 N° 08.1.1369.53.8) (Anexo 1).

3.3. Material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada no cerrado de Araxá, no estado de Minas Gerais. O local de coleta (Brasil, 19°43'04,0", W 46°53'54,0") foi marcado através de um sistema global de medição de posição (GPS Garmin - modelo 79728002). As exsiccatas foram identificadas pela Dra. Inês Cordeiro, Instituto de Botânica (São Paulo) e depositadas no Herbário da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (HPMU 042), sob a responsabilidade da Prof^a Dra. Ana Maria S. Pereira. Após a coleta o material *in natura* foi separado, e as entrecascas do caule de *A. humile* foram

lavadas e preparadas separadamente. Para evitar degradação enzimática e por microrganismos o material foi seco em estufa a aproximadamente 50°C por 96 horas. Em seguida o material foi triturado em moinho de facas e devidamente armazenado. O extrato vegetal acondicionado segundo os procedimentos relatados acima foi submetido ao processo de extração em água quente por 24 horas. O extrato aquoso foi filtrado em gaze e em seguida em filtro de papel, liofilizado e armazenado a 4 °C.

3.4. Fracionamento cromatográfico

Visando o isolamento e a purificação de princípio ativo presente no extrato bruto de *A. humile*, foi realizada uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em condições apolar e polar (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). O extrato aquoso de *A. humile* (EAAh) foi submetido a fracionamento cromatográfico usando uma coluna analítica SupelcoTM LC18 (25 cm x 4,6 mm) em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo CLASS-LC10). Para a detecção de compostos apolares o eluente foi um gradiente de MeOH 40 → 80% (15 min), 80 → 100% (5 min), 100% (10 min), 100 → 40% (3 min), 40% (2 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 210 e 330 nm.

Em condições polares o sistema eluente foi um gradiente de MeOH/H₂O 10% → 66% (32 min), 66 → 10% (3 min), 10% (5 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 254 nm. Os padrões comerciais de ácido gálico (AG), ácido clorogênico, rutina, quercetrina e ácido elágico (Sigma) foram aplicados nas mesmas condições descritas anteriormente para o EAAh.

Para o isolamento do composto bioativo, 15 gramas do extrato EAAh foram dissolvidos até completa dissolução em 40 mL de água miliQ. Esta solução foi particionada com hexano (hex), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE), sucessivamente. Todas as frações foram secas para remoção do solvente (rotaevaporação, 35 °C) e a fração aquosa remanescente foi liofilizada. A fração liofilizada e de acetato de etila apresentou resultado positivo para inibição da PLA₂ de *B. jararacussu* (metodologia descrita no item 3.5.1). Para pesquisa do ácido gálico foi utilizada a fração de acetato de etila. Na sequência, 1 grama da fração de acetato de

etila foi dissolvida em metanol, imobilizada em ácido silícico e liofilizada. Este material foi aplicado em coluna cromatográfica (CC) de vidro (38 x 4,5 cm) contendo sílica-gel 60 (Merck, mesh size; 70 a 230). O extrato imobilizado foi adicionado ao topo da coluna e aplicado, sucessivamente, 200 mL nos seguintes sistemas: Hexano (F1), DCM (F2), Metanol em DCM [1, 2, 5, 10, 20, 30, 50% (F3-F9)] e Metanol (F10). Todas as frações foram secas para remoção do solvente (rotaevaporação, 35°C). As frações F5, F6 e F7 (5, 10 e 20% de metanol em DCM) foram liofilizadas e testadas para a atividade anti-PLA₂. A fração F5 apresentou maior atividade inibitória e foi submetida à CLAE para isolamento e caracterização das estruturas.

A fração F5 foi submetida a fracionamento cromatográfico usando uma coluna analítica SupelcosilTM LC18 (4,6 X 250 mm) em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo CLASS-LC10), o eluente foi um gradiente de MeOH/H₂O 10 → 66% (32 min), 66 → 10% (3 min), 10% (5 min), com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à comprimento 220 nm.

Em seguida, a fração F5 de *A. humile* (EAAh) foi submetida ao fracionamento cromatográfico usando uma coluna semi-preparativa SupelcosilTM LC18 (250 mm x 10 mm) em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo CLASS-LC10), na 1ª purificação foi injetado 1 mL da amostra sendo 3 injeções (3 mL), o eluente foi um gradiente de MeOH/H₂O 0 → 60% (100 min), com fluxo de 2 mL/min, coletando 4 mL/tubo e detecção no UV à comprimento 220 nm. Das frações obtidas, oito (F5-F12) foram reunidas e submetidas a uma 2ª purificação na mesma coluna onde foi injetado 1 mL da amostra sendo 4 injeções (4 mL) o eluente foi um gradiente de MeOH/H₂O 0 → 20% (100 min), com fluxo de 2 mL/min, coletando 4 mL/tubo e detecção no UV no comprimento 220 nm. As frações F10-F32 (2ª purificação semi-preparativa) F7 e F9 (frações da 1ª purificação semi-preparativa) e a amostra de AG foram submetidas a fracionamento cromatográfico usando uma coluna analítica SupelcosilTM LC18 (4,6 mm x 250 mm) em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo CLASS-LC10), foi injetado 20 µL da amostra com gradiente MeOH/H₂O 10 → 66% (32 min), 66 → 10% (3 min), 10% (5 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 220 nm.

3.5. Inibição das atividades enzimáticas e farmacológicas

3.5.1. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas (GUTIÉRREZ et al., 1988). O experimento consistiu na elaboração de um gel (CaCl_2 0,01 M; gema de ovo em PBS, pH 7,2 (1:30, m/v); eritrócitos em PBS (1:30, v/v); 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 o gel solidificar, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) para a aplicação das amostras (40 μL). As amostras com 10 μg de peçonhas brutas ou proteínas isoladas (CB, crotoxina) foram previamente incubadas com o extrato aquoso de *A. humile* por 30 min a 37°C, nas proporções 1:10 e 1:50 (m/m). As amostras de 10 μg da peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-II (Bothropstoxina-II isolada de *B. jararacussu*), também foram previamente incubadas com o ácido gálico (AG) solubilizado em DMSO-PBS por 30 min a 37°C, na proporção: 1:30 (m/m). Os controles positivos foram realizados utilizando a mesma quantidade (10 μg) de peçonhas brutas ou proteínas isoladas na ausência do EAAh ou AG. O controle negativo foi realizado com PBS. Também foi realizado o controle com EAAh e o AG na ausência da peçonha ou toxina isolada, bem como o controle do DMSO (dimetilsulfóxido). Todas as amostras foram testadas em triplicata (n=3). 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 fosfolipásica sendo os diâmetros medidos (cm) para a quantificação desta atividade.

3.5.2. Atividade miotóxica

A miotoxicidade foi induzida em grupos de cinco camundongos *Swiss* machos (18-22 g) através de injeção i.m. (intramuscular) no músculo gastrocnêmio direito de 50 μL contendo 10 μg de peçonha bruta ou de sua toxina isolada (BthTX-I) diluídos em solução salina tamponada em fosfato (PBS), previamente incubadas com extrato aquoso de *A. humile* (EAAh) por 30 min a 37°C em duas proporções 1:5 e 1:10 (m/m) ou com ácido gálico (AG) na proporção 1:100 (m/m). Os controles receberam somente

PBS, EAAh, AG, DMSO, peçonha bruta ou toxina isolada. Após 3 horas o sangue dos camundongos foi coletado através de um pequeno corte na extremidade da cauda em capilares heparinizados e imediatamente centrifugado a 480xg por período de 20 minutos. Depois de coletado o sangue, os animais foram eutanasiados no biotério em câmara de CO₂ na presença do pesquisador responsável. A atividade da enzima CK (creatina cinase) foi determinada através do Kit CK-UV cinético da Bioclin, Brasil. Realizou-se leituras a 340 nm nos intervalos de 0 e 3 min, e a atividade foi expressa em unidades/litro onde unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (SOARES et al., 2000a; b).

Para essa atividade, também foram realizados testes sem prévia incubação e tratamento pós-envenenamento, na tentativa de verificar real possibilidade de aplicação prática destes inibidores no tratamento ofídico. Ambos os testes seguiram a metodologia descrita acima, entretanto para o teste sem pré-incubação, soluções contendo 30 µg de *B. jararacussu* ou BthTX-I foram misturadas ao EAAh em duas proporções 1:10 e 1:30 (m/m) e injetadas imediatamente. Para o tratamento pós-envenenamento, soluções contendo 30 µg da peçonha ou toxina isolada foram injetadas e o tratamento com o EAAh nas proporções 1:10 e 1:30 (m/m) ocorreu após 15 e 30 minutos.

3.5.3. Atividade indutora de edema

Neste ensaio foram utilizados grupos de cinco camundongos *Swiss* machos (18-22 g). Os animais receberam 50 µL de soluções contendo 10 µg das peçonhas brutas ou toxina isolada (BthTX-I), dissolvidos em PBS, por injeções via i.d. (intradérmica) na região subplantar da pata direita. Os controles receberam somente PBS, EAAh, AG, DMSO, peçonha bruta ou toxina isolada. As peçonhas e a toxina foram pré-incubadas com extrato aquoso de *A. humile* (EAAh) em duas proporções, 1:10 e 1:50 (m/m) ou com AG na proporção 1:100 (m/m), por 30 min a 37°C. A primeira leitura das patas foi realizada antes da inoculação das amostras (tempo 0 min), a segunda após 30 minutos, a terceira após 1 hora e a última após 3 horas. O aumento da área na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão e expresso em mm

de edema induzido (SOARES et al., 2000a). Os valores de edema (mm) induzidos pelas toxinas ou de inibição desse efeito após a incubação com diferentes proporções do extrato ou do AG, foram calculados subtraindo-se os valores inicialmente aferidos antes da injeção das amostras mais os valores de aumento de volume após injeção de PBS dos valores obtidos para os animais tratados, considerando os respectivos tempos avaliados. Os valores de edema induzido somente pelas peçonhas ou toxinas foram considerados como 100% de edema. Depois da última leitura os animais foram eutanasiados no biotério em câmara de CO₂ na presença do pesquisador responsável.

3.5.4. Atividade hemorrágica

Esta atividade foi realizada segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984), utilizando grupos de cinco camundongos *Swiss* machos (18-22 g). Foram utilizados 50 µL das amostras contendo 20 µg de cada peçonha diluídos em PBS, pré-incubados com extrato aquoso de *A. humile* em duas proporções, 1:5 e 1:10 (m/m), por 30 min a 37°C que foram injetadas por via i.d. (intradérmica) no dorso de camundongos. Os controles receberam somente peçonha bruta, PBS ou extrato. Após 3 horas, os animais foram eutanasiados no biotério em câmara de CO₂ na presença do pesquisador responsável, as peles foram removidas e os halos hemorrágicos medidos em dois ângulos retos e expressos em centímetros. Define-se como dose mínima hemorrágica (DMH) a concentração mínima das peçonhas necessária para produzir um halo com cerca de 1 cm de diâmetro.

3.5.5. Atividade coagulante

A dose mínima coagulante (DMC), definida como sendo a quantidade de amostra capaz de coagular o plasma bovino citratado (proveniente do Matadouro Orange S/A, Sertãozinho-SP), num tempo de 60 segundos (GENÉ et al., 1989), foi avaliada para as peçonhas brutas de *B. jararacussu* (6 µg), *B. moojeni* (2 µg), *B. brazili* (5 µg) e *L. muta* (5 µg). Amostras contendo a peçonha dissolvida em PBS com extrato aquoso de *A. humile* em três proporções, 1:5, 1:10 e 1:50 (m/m), foram pré-incubadas por 30 min a 37°C e depois adicionadas a 200 µL de plasma mantido a 37°C. Os controles

receberam somente peçonha bruta, PBS ou extrato. 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 (Pharmacia Biotech).

3.5.6. Letalidade

A letalidade foi avaliada por 48 horas após a injeção intraperitoneal (i.p.; 100 μ L), das amostras dissolvidas em PBS, em seis camundongos *Swiss* machos (18-22 g), nas concentrações de 20 μ g para *C. d. terrificus* e 10 μ g para crotoxina nos grupos controles. Para os ensaios de inibição, as amostras contendo peçonha ou toxina isolada com EAAh na proporção de 1:50 (m/m) foram incubadas por 30 min a 37°C (BIONDO et al., 2003; 2004). Os controles receberam somente peçonha bruta, PBS ou extrato. Os resultados obtidos foram comparados com os controles. Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados com CO₂ e depois incinerados.

3.6. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional de próton (¹H) e carbono (¹³C) foram obtidos em um espectrômetro de *Avance Bruker 400*, operando a 9,4 T, observando ¹H em 400,13 MHz e ¹³C em 100,61 MHz. Todos os espectros de ¹H e ¹³C foram obtidos com o princípio ativo isolado de *A. humile* dissolvido em clorofórmio deuterado/dimetilsulfóxido hexadeuterado (CDCl₃/DMSO d₆) e os deslocamentos químicos (δ) foram dados em ppm relacionados com tetrametilsilano (TMS), como uma referência interna.

3.7. Análise de Espectro de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) das miotoxinas de *B. jararacussu* (BthTX-I e II) com o inibidor (AG), foram mensurados em um espectropolarímetro JASCO J-815 (JASCO Inc., Tóquio, Japão). As medidas foram feitas utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 mm e os seguintes parâmetros: velocidade de digitalização 100 nm/min; largura da banda 2 nm; resolução 0,5 nm e temperatura 20°C.

As amostras (2 mg de cada toxina e 50 mg de AG) foram dissolvidas em água

ultrapura, centrifugadas e suas concentrações foram verificadas em espectrofotômetro (NANODROP). Para as medidas com inibidores, foi utilizada uma proporção de 1 molécula de proteína para 8 moléculas de ligante. Cada espectro corresponde à média de 20 acumulações. Os dados foram coletados no intervalo de 185-260 nm. 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 CD foram analisados em termos de estrutura secundária utilizando o algoritmo CONTINLL (VAN STOKKUM et al., 1999) disponível no programa de pacotes para deconvolução de curvas de CD, CDPro (SREERAMA; WOODY, 2000). Para a deconvolução, foi utilizado o IBasis de número 9 (SREERAMA et al., 1999) que contém um set de 42 proteínas. A unidade utilizada para os espectros de CD foi a MRE (Média de resíduos de elipticidade/ graus cm² dmol⁻¹ resíduo⁻¹) que é uma das mais utilizadas. As coordenadas x e y dos espectros apresentados foram marcados num gráfico desenhado com o programa *Origin* versão 8.0. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcos R. Fontes da UNESP de Botucatu-SP.

3.8. Interação molecular computacional

A modelagem molecular envolve a previsão da conformação e orientação de uma molécula ligante (inibidor) dentro do sítio ativo do alvo molecular (proteína). O inibidor, ácido gálico (AG), foi desenhado usando o programa *ChemSketch v11.01*, enquanto que a toxina utilizada para este estudo foi a BthTX-I depositada no *Protein Data Bank* (PDB ID: 3HZD). Em seguida, com o auxílio do programa *DS-viewer v 5.0* as estruturas foram preparadas para a adição de hidrogênios e minimização de energia. Para investigar a orientação da ligação entre os inibidores e a toxina foi realizado o estudo de modelagem molecular usando o programa *GOLD v 4.1* (JONES et al., 1995; 1997). O raio de ligação entre o inibidor e o sítio ativo da toxina foi ajustado para 10 Å e as cadeias laterais da Lys49 e His48 permaneceram flexíveis para que pudessem se deslocar para a melhor interação com o inibidor. A função *Goldscore* realiza a pontuação das possíveis conformações do ligante com a toxina, sendo utilizada a conformação com o maior *Goldscore*, que para essa simulação específica foi

considerada como sendo *Best solution*. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich da FCFRP-USP.

3.9. Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD), e a análise estatística foi realizada pelo teste *t-Student* com níveis de significância dentro do intervalo de confiança $0,1 < p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Inibição das atividades enzimáticas e farmacológicas pelo EAAh

A atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Lachesis* foi inibida pelo extrato aquoso de *A. humile* (EAAh) nas diferentes proporções testadas (Figura 1A). Observou-se que o EAAh inibiu fortemente (~80%) a atividade fosfolipásica das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, e moderadamente (57%) a atividade da peçonha de *L. muta*. A atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *C. d. terrificus* e suas toxinas isoladas (CB e crotoxina) também foram inibidas (Figura 1B). O EAAh inibiu em 70-90% e 17-45% as atividades da peçonha de *C. d. terrificus* e da toxina CB, respectivamente. Enquanto que, a crotoxina foi inibida fortemente (cerca de 90%).

Figura 1. Inibição da atividade fosfolipásica de peçonhas dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* (A) e *Crotalus* e toxinas isoladas (B) pelo extrato aquoso de *A. humile* (EAAh), nas proporções 1:10 e 1:50 (m/m), após a incubação por 30 min a 37 °C. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

A miotoxicidade foi determinada pela dosagem da enzima creatina cinase (CK) no plasma de camundongos injetados com peçonha ou toxina isolada na ausência ou presença de EAAh. Observou-se que as peçonhas de *B. jararacussu* (2.571 U/L) e *L. muta* (2.700 U/L), e a BthTX-I (2.786 U/L) induziram alta miotoxicidade (Figura 2). O EAAh inibiu a miotoxicidade das peçonhas e toxina isolada de 50 a 84%, na proporção de 1:10. A peçonha de *B. neuwiedi* não teve seu efeito miotóxico inibido pelo EAAh na proporção de 1:5, porém, com a proporção 1:10, o efeito foi diminuído a aproximadamente 50% quando comparado aos animais que receberam apenas injeções com a peçonha. O EAAh inibiu fortemente a miotoxicidade da peçonha de *B. jararacussu* e de sua toxina isolada mesmo sem prévia incubação (Figura 3A). Esse extrato vegetal, também se mostrou eficaz no tratamento pós-envenenamento com a BthTX-I quando administrado 15 min (Figura 3B) e 30 min (Figura 3C) após a injeção da BthTX-I.

Figura 2. Inibição da atividade miotóxica de peçonhas dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* e da toxina BthTX-I pelo extrato aquoso de *A. humile* (EAAh), pré-incubado nas proporções 1:5 e 1:10 (m/m) por 30 min a 37 °C. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

Figura 3. Inibição da atividade miotóxica da peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-I pelo extrato aquoso de *A. humile* (EAAh), sem pré-incubação (**A**) e pós-envenenamento com 15 min (**B**) e 30 min (**C**) nas proporções 1:10 e 1:30 (m/m). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

O EAAh na proporção de 1:10 (m/m) inibiu satisfatoriamente a formação do edema local provocado pela maioria das peçonhas testadas no período de 1h (Figura 4). De maneira geral o extrato na proporção de 1:50 (m/m) pouco inibiu as peçonhas. O edema provocado pela peçonha de *B. moojeni* (Figura 4C) e *C. d. terrificus* (Figura 4B) foi inibido consideravelmente por ambas as proporções no mesmo período. Observou-se que o efeito edematogênico induzido pela peçonha de *L. muta* (Figura 4A), embora inibido pelo EAAh na 1ª hora, aumentou significativamente após 3 horas.

Figura 4. Inibição da atividade edematogênica das peçonhas do gênero *Bothrops* (A, B e C) *Crotalus* (B) e *Lachesis* (A) pelo extrato aquoso de *A. humile* (EAAh), pré-incubado nas proporções 1:10 e 1:50 (m/m) por 30 min a 37°C. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

A hemorragia produzida pelas peçonhas do gênero *Bothrops* e *Lachesis* foi inibida pelo extrato aquoso de *A. humile* (EAAh) nas diferentes proporções testadas (Figura 5). Observou-se que a atividade hemorrágica produzida pelas peçonhas de *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. brazili* foi fortemente inibida pelo EAAh (80-90%). A peçonha de *B. alternatus*, foi pouco inibida (~7%) pelo EAAh na proporção de 1:5 e fortemente inibida na proporção 1:10 (85%). O EAAh inibiu 60-78% da hemorragia causada pela peçonha de *L. muta*.

Figura 5. Inibição da atividade hemorrágica de peçonhas dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* pelo extrato aquoso de *A. humile* (EAAh), pré-incubado nas proporções 1:5 e 1:10 (m/m) por 30 min a 37 °C. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

O EAAh inibiu completamente a coagulação produzida pela dose mínima coagulante (DMC) das peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararacussu* (Tabela 1). Entretanto, a inibição da DMC de *B. brazili* e *L. muta* somente ocorreu na proporção 1:50 (m/m) de EAAh.

Tabela 1. Efeito do extrato aquoso bruto de *A. humile* (EAAh) sobre a atividade coagulante induzida por peçonhas de serpentes.

Amostras	Tempo de coagulação (min)
<i>B. jararacussu</i> (6 µg)	1,2
+ EAAh (1:5)	Não coagulou*
+ EAAh (1:10)	Não coagulou
+ EAAh (1:50)	Não coagulou
<i>B. moojeni</i> (2 µg)	1,4
+ EAAh (1:5)	Não coagulou
+ EAAh (1:10)	Não coagulou
+ EAAh (1:50)	Não coagulou
<i>B. brazili</i> (5 µg)	1,0
+ EAAh (1:5)	1,3
+ EAAh (1:10)	2,3
+ EAAh (1:50)	Não coagulou
<i>L. muta</i> (5 µg)	1,1
+ EAAh (1:5)	3,5
+ EAAh (1:10)	11,8
+ EAAh (1:50)	Não coagulou

*Observação realizada até 12 h. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

A peçonha de *C. d. terrificus* e sua toxina isolada, crotoxina, causaram 100% de letalidade nos grupos controles em 80 e 105 min, respectivamente (Tabela 2). Quando as soluções com peçonha ou com crotoxina foram misturadas com o EAAh na proporção 1:50 não observou-se a morte de nenhum dos animais.

Tabela 2. Efeito do extrato aquoso bruto de *A. humile* sobre a letalidade induzida por peçonha de *C. d. terrificus* e crotoxina.

Amostras (1:50 m/m)	Tempo (min)
Cdt (20 µg)	80
+ EAAh	Não ocorreram mortes*
Crotoxina (10 µg)	105
+ EAAh	Não ocorreram mortes*

*Observação realizada até 48 h. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

4.2. Fracionamento cromatográfico

O perfil cromatográfico do extrato aquoso de *Anacardium humile* (EAAh) foi analisado em duas condições diferentes, uma para detecção de substâncias apolares e outra para substâncias polares (Figura 6F). Observou-se que em condições apolares não foi possível a identificação de nenhuma fração definida quando comparada com os padrões comerciais utilizados nas mesmas condições experimentais (resultado não apresentado). No entanto, em condições polares, claramente detectou-se uma fração bem definida (Figura 6F) com tempo de retenção similar (6,49 min) ao padrão comercial de ácido gálico (Figura 6A). Nas figuras 6B, 6C, 6D e 6E podemos visualizar os tempos de retenções dos padrões: ácido clorogênico (15,21 min), rutina (27,91 min), quercetrina (28,91 min) e ácido elágico (30,81 min), respectivamente.

Figura 6. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada em condições polares sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H₂O 10-66% (32 min), 66-10% (3 min), 10% (5 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 254 nm. Com tempo de retenção de 6,4 min, o padrão comercial de ácido gálico **(A)**, de 15,2 min o ácido clorogênico **(B)**, de 27,9 min a rutina **(C)**, de 28,9 min a quercetrina **(D)**, de 30,8 min o ácido elágico **(E)**. Detecção do ácido gálico no extrato aquoso de *A. humile* **(F)**.

Após a verificação da suposta presença de ácido gálico no EAAh, este foi particionado em três solventes diferentes (hexano, DCM e acetato de etila) e testados para a inibição de PLA₂ de *B. jararacussu*, sendo que o extrato em acetato de etila apresentou melhor inibição e por isso foi submetido a um fracionamento em coluna de sílica gel 60 com quatro eluentes com diferentes polaridades obtendo-se 10 diferentes frações que foram liofilizadas e tiveram suas capacidades de inibir PLA₂ analisadas. Embora as frações F5, F6 e F7 tenham inibido a atividade enzimática da PLA₂ de *B. jararacussu*, a fração F5 apresentou inibição muito superior a F6 e F7. A fração F5 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para isolamento do ácido gálico (Figura 7).

Figura 7. Fluxograma esquematizando o fracionamento do EAAh, purificação e identificação do Ácido Gálico. O EAAh particionado em acetato de etila foi submetido a cromatografia em uma coluna de sílica gel 60 com quatro diferentes eluentes: hex, DCM, metanol em DCM e metanol. As dez frações resultantes foram testadas para inibição da PLA₂, as frações F5, F6 e F7 obtidas durante a eluição com metanol em DCM inibiram a PLA₂ de *B. jararacussu*, sendo a F5 com melhor inibição. A F5 foi submetida a uma purificação em CLAE para purificação do AG e confirmação de sua estrutura química através de RMN.

A Figura 8 mostra o perfil cromatográfico da fração F5 em CLAE analítica. É possível observar claramente a existência de frações com tempo de retenção similar (6,49 min) ao padrão comercial de ácido gálico.

Figura 8. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada com a fração F5 de *A. humile* em acetato de etila, sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H₂O 10-66% (32 min), 66-10% (3 min), 10% (5 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 220 nm.

A fração F5 de *A. humile* foi submetida à CLAE semi-preparativa em duas diferentes condições. Na primeira purificação (Figura 9) as frações de 5 a 12 foram reunidas, liofilizadas e injetadas na segunda purificação (Figura 10). Na segunda condição foram reunidas as frações de 10-20, 21-24, e 25-32 que foram submetidas CLAE analítica, assim como as frações F7 e F9 da primeira purificação. Na figura 11 é possível confirmar que o ácido gálico começa a ser eluído na fração 10 e termina na fração 32. Observa-se que há alguma substância que contamina a eluição do ácido gálico na fração 21-24 (Figura 11B) e na fração F9 (Figura 12B), portanto a fração 10-20 (Figura 11A), 25-32 (Figura 11C) e F7 (Figura 12A), que estão puras e com tempo de retenção próximo ao do ácido gálico comercial (Figura 12C), foram reunidas (fração FAG) para caracterização da estrutura.

Figura 9. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa, realizada com a fração F5 de *A. humile* em acetato de etila, sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H₂O 0-60% (100 min), com fluxo de 2 mL/min e detecção no UV à 220 nm.

Figura 10. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa, realizada com as frações reunidas (F5-F12) da primeira purificação de F5 de *A. humile* em acetato de etila, sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H₂O 0-20% (100 min), com fluxo de 2 mL/min e detecção no UV à 220 nm.

Figura 11. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica, realizada com as frações reunidas da segunda purificação de F5 de *A. humile* em acetato de etila, sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H₂O 10-66% (32 min), 66-10% (3 min), 10% (5 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 220 nm. **(A)** Fração pura (F10-F20) de AG; **(B)** Fração contaminada (F21-F24); **(C)** Fração pura (F25-F32) de AG.

Figura 12. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica, realizada com as frações reunidas da primeira purificação de F5 de *A. humile* em acetato de etila e ácido gálico comercial (AG), sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H₂O 10-66% (32 min), 66-10% (3 min), 10% (5 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 220 nm. **(A)** Fração pura (F7) de AG; **(B)** Fração contaminada (F9); **(C)** AG comercial (Sigma Chem Co.).

4.3. Elucidação Estrutural: Ressonância Magnética (RMN)

O espectro de RMN ^1H do princípio ativo isolado de *A. humile* (FAG) (Figura 13) mostrou apenas um intenso singlete (s) em δ 7,13, que é atribuído aos dois hidrogênios equivalentes (H-2 e H-6) do anel aromático. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 14) foram observados: um sinal em δ 108,89 relativo aos carbonos equivalentes C-2 e C-6; um sinal em δ 120,68 correspondente ao C-1, um sinal em δ 136,89 referente ao C-4, outro sinal em δ 144,29 referente aos outros dois carbonos equivalentes: C-3 e C-5; e um sinal em δ 167,88 característico de carbono carbonílico. Esses dados foram comparados aos da literatura (REIERSEN et al., 2003; SOUZA FILHO et al., 2006), identificando a substância como sendo o ácido gálico.

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H para a amostra FAG a 400 MHz diluída CDCl_3 /DMSO d_6 . Os espectros de RMN unidimensional de ^1H foram obtidos em um espectrofotômetro *Avance Bruker 400*. Acima é possível observar a estrutura química do ácido gálico (AG) com os prótons numerados e ao lado, a tabela com os valores dos deslocamentos químicos (δ) em ppm.

Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C para a amostra FAG a 400 MHz diluída $\text{CDCl}_3/\text{DMSO } d_6$. Os espectros de RMN unidimensional de ^{13}C foram obtidos em um espectrofotômetro *Avance Bruker 400*. Acima é possível observar a estrutura química do ácido gálico (AG) com os prótons numerados e ao lado, a tabela com os valores dos deslocamentos químicos (δ) em ppm.

4.4. Inibição das atividades fosfolipásica, miotóxica e edema pelo AG

Nos testes realizados com ácido gálico comercial (AG), foi possível verificar a inibição moderada (40-50%) da atividade fosfolipásica induzida por 10 µg da peçonha de *B. jararacussu* e sua miotoxina isolada (BthTX-II) na proporção 1:30 (m/m) (Figura 15).

Figura 15. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops jararacussu* (*B.jussu*) e BthTX-II pelo ácido gálico (AG) na proporção 1:30 (m/m), após a incubação por 30 min a 37°C. Os resultados foram expressos pela média ± SD (n=3).

A mitotoxicidade induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e sua toxina isolada BthTX-I, também foi fortemente inibida (~80%) na presença do ácido gálico (AG) na proporção 1:100 (m/m) (Figura 16).

Figura 16. Inibição da atividade mitotóxica da peçonha *B. jararacussu* e da toxina BthTX-I pelo ácido gálico (AG), pré-incubado na proporção 1:100 (m/m) por 30 min a 37°C. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

A Figura 17 mostra a formação do edema local (mm) verificada após a administração da peçonha de *B. jararacussu* e sua toxina isolada BthTX-I misturadas com o AG, na proporção de 1:100 (m/m). Quando comparados aos grupos controles, verificamos que nos grupos tratados com o AG o edema foi fortemente inibido (80-95%) no período de 3 horas.

Figura 17. Inibição da atividade edematogênica da peçonha de *B. jararacussu* e da toxina BthTX-I pelo ácido gálico (AG), pré-incubados na proporção 1:100 (m/m) por 30 min a 37°C. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

4.5. Análise de Espectros de Dicroísmo Circular

Os gráficos abaixo (Figura 18A e B) representam as análises dos espectros de dicroísmo circular das miotoxinas de *B. jararacussu* na ausência e presença do inibidor AG. Podemos observar que não houve alterações significativas no enovelamento das bothropstoxinas I e II na presença de AG, não demonstrando alterações na porcentagem dos diversos domínios que constituem suas estruturas secundárias

(Tabela 3). A ligação do inibidor com as miotoxinas não modificou a forma e intensidade dos espectros de dicroísmo circular.

Figura 18. Análise do espectro de dicroísmo circular (CD) das miotoxinas de *B. jararacussu* (A) BthTX-I e (B) BthTX-II, na ausência e na presença do inibidor AG. Os espectros de CD foram mensurados em um espectropolarímetro JASCO J-815. Para as medidas com inibidores, foi utilizada a proporção 1:8. Cada espectro corresponde à média de 20 acumulações. Os dados foram coletados no intervalo de 185-260 nm

Tabela 3. Porcentagem dos diversos domínios da estrutura secundária da BthTX-I e BthTX-II na presença e ausência do inibidor AG.

	α - hélice	Folha β	Curva β	Desordenada
BthTX-I	44,0%	5,7%	19,2%	31,0%
BthTX-I + AG	44,3%	6,5%	18,4%	30,8%
BthTX-II	57,0%	14,5%	12,0%	16,9%
BthTX-II + AG	57,1%	12,6%	13,3%	17,3%

4.6. Interação Molecular Computacional entre Inibidor (AG) e Toxina (BthTX-I)

O modelo molecular do complexo formado entre a toxina BthTX-I monomérica com o inibidor (AG) foi avaliado usando o programa *GOLD*. O complexo formado entre AG e BthTX-I (Figura 19) que apresentou um *Goldscore* de 34,4 foi considerado como sendo a melhor interação molecular para esse complexo.

O inibidor foi modelado dentro do sítio ativo da toxina, e embora o AG esteja flanqueado por vários resíduos de aminoácidos, entre as possíveis interações do inibidor com a toxina, destacaram-se as interações da His48 com OH-4 com uma distância de 3,18 Å e a da Lys49 com a carboxila (-COOH) com uma distância de 3,29 Å. Outras interações visualizadas foram: Lys60 e Gly32 com a carboxila do AG com distâncias de 3,45 Å e 2,99 Å, respectivamente, e da Asp27 com OH-3 (2,46 Å).

Figura 19. Interação molecular do ácido gálico (AG) com a BthTX-I. As interações eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos e o AG foram representadas em amarelo, enquanto que as representadas em preto são as ligações de hidrogênio. Os resíduos representados em rosa mostram a conformação original (toxina nativa sem o ligante) da Lys49 e da His48 que foram mantidas flexíveis e se deslocaram (representadas em verde) para uma melhor interação do inibidor com a toxina.

5. DISCUSSÃO

Embora a administração endovenosa de soro antiofídico seja ainda o único tratamento preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento das vítimas dos acidentes ofídicos, a soroterapia mostra-se ineficiente no combate ao dano tecidual local causado pelas toxinas presentes nas peçonhas das serpentes (CARDOSO et al., 2003; 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 a tradicional soroterapia, particularmente contra estes efeitos locais (SOARES et al., 2004b).

O mecanismo de ação das substâncias com propriedades antiofídicas ainda é desconhecido, porém pode-se sugerir que ocorram interações destes princípios ativos com proteínas específicas das peçonhas, como ligação a sítios catalíticos ou ligantes de substrato (SOARES et al., 2005; 2009).

As peçonhas das serpentes apresentam composições químicas diferentes, e consequentemente variam em potencialidade tóxica. As peçonhas de serpentes botrópicas são compostas principalmente por proteínas que agem no local do envenenamento, enquanto que as peçonhas crotálicas possuem em sua maioria proteínas que agem principalmente de forma sistêmica (FUNASA, 2001). Desta forma, estas proteínas de diferentes serpentes apresentam estrutura e função distintas, que interagem de forma diferente com o extrato aquoso de *A. humile* (EAAh) e com seu princípio ativo isolado, o ácido gálico (AG).

Nos últimos anos muitos trabalhos foram realizados a fim de verificar a eficiência dos extratos vegetais sobre a ação de PLA₂s da peçonha de serpentes (SOARES et al., 2004b; BIONDO et al., 2004; TICLI et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007; VALE et al., 2008; LEANPOLCHAREANCHAI et al., 2009; NAZATO et al., 2010).

No presente trabalho o EAAh mostrou-se eficiente contra as PLA₂s presentes nas peçonhas botrópica e crotálica, bem como contra a PLA₂ neurotóxica isoladas de *C. d. terrificus* (crotoxina), sugerindo a presença de sítios comuns em PLA₂s de ambos os

gêneros para a ligação de substâncias presentes no extrato. Resultados semelhantes foram descritos por Maiorano e colaboradores (2005), que avaliaram a inibição da atividade fosfolipásica produzida pelas peçonhas botrópica e crotálica pelo extrato de *Mikania glomerata*. A *M. glomerata*, assim como *Mandevilla velutina* e *Mandevilla illustris* neutralizam de 75 a 100% a atividade fosfolipásica das peçonhas ofídicas (BIONDO et al., 2003; 2004).

Borges e colaboradores (2000) descreveram a inibição desta atividade com extrato aquoso de *Casearia sylvestris*. O extrato mostrou-se altamente eficaz contra as PLA₂s da classe II presentes nas peçonhas de serpentes da família Viperidae. Em 2005 os efeitos inibitórios do extrato e de frações ricas em tanino da *Musa paradisíaca* foram avaliados experimentalmente. O extrato dessa espécie vegetal inibiu 100% a atividade PLA₂ das peçonhas de *C. d. terrificus* e *B. jararacussu*, bem como a crotoxina, na proporção de 1:1 (m/m) (BORGES et al., 2005). Diogo e colaboradores (2009) verificaram que o extrato de *Eclipta alba* e seu composto isolado, a wedelolactona, eram muito eficientes contra a peçonha de *C. d. terrificus*, sendo o extrato uma boa fonte de inibidores naturais contra as PLA₂s neurotóxicas.

A inibição da miotoxicidade foi avaliada por meio da quantificação dos níveis de CK plasmáticos dos animais envenenados experimentalmente. A creatina cinase é uma enzima do metabolismo energético muscular que em caso lesão celular é liberada e pode ser detectada no plasma como um marcador. A ação miotóxica de PLA₂s presentes em peçonhas de serpentes ocorre através da sua interação com a membrana sarcoplasmática o que acarreta uma desorganização dos componentes fosfolipídicos, permitindo a saída de moléculas intercelulares como a CK (GUTIÉRREZ et al., 1989).

O EAAh demonstrou ser um bom inibidor de miotoxinas presentes nas peçonhas de *Bothrops* e *Lachesis* nas diferentes proporções testadas. O extrato também inibiu a miotoxina isolada de *B. jararacussu*, BthTX-I, em diferentes condições, com ou sem pré-incubação e no tratamento pós-envenenamento. A presença de miotoxinas nas peçonhas do gênero *Bothrops* é responsável pela mionecrose local (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; SOARES et al., 2000b; 2004a). A administração do extrato pós-

envenenamento em diferentes intervalos de tempo foi realizada a fim de verificar a ação do EAAh em condições próximas à realidade do tratamento de vítimas de envenenamento ofídico, e os resultados se mostraram bem promissores para a neutralização do efeito miotóxico.

Muitos outros extratos de plantas já estudados como antiofídicas mostraram-se eficazes contra os efeitos miotóxicos destas toxinas. Biondo e colaboradores (2003) demonstraram que o extrato aquoso de *Mandevilla velutina* inibiu de 60 a 75% da peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-I, respectivamente. A wedelolactona isolada do extrato de *Eclipta alba* inibiu a miotoxicidade induzida pelas fosfolipases A_2 básicas isoladas das peçonhas de *C. d. terrificus* (CB) e *B. jararacussu* (BthTX-I e II) (DIOGO et al., 2009). Borges e colaboradores (2005) realizaram a análise macroscópica de músculos esqueléticos (gastrocnêmio) de camundongos injetados com peçonhas botrópicas que apresentaram intensa necrose local, enquanto que os animais que receberam peçonha previamente misturada com o extrato da *Musa paradisiaca* tinham músculos de aspecto normal.

O edema é uma inflamação aguda que se caracteriza pelo predomínio de fenômenos exsudativos, permitindo o acúmulo de líquido na região intersticial dos tecidos ou cavidades orgânicas (MONTENEGRO; FRANCO, 1999). A inflamação local é uma característica do envenenamento por serpentes da família Viperidae (DENNIS, 1994). O edema local induzido por peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* parece ser mediado por substâncias vasoativas, como histamina e serotonina, além de prostaglandinas e cininas (GUTIÉRREZ et al., 1986).

O EAAh na proporção de 1:10 (m/m) inibiu satisfatoriamente a formação do edema local provocado pela maioria das peçonhas testadas no período de 1 hora. Com o aumento da concentração do extrato (1:50) o mesmo não ocorreu. Estes resultados sugerem a presença de substâncias no EAAh que se ligam ou interagem de formas diferentes com os componentes da peçonha resultando em efeitos inibitórios em diferente graus ou mesmo contrários.

Neves e colaboradores (1993) investigaram a capacidade do triterpeno velutanol, princípio ativo de *Mandevilla velutina*, em inibir edema em camundongos concluindo

que este composto interfere na ação da PLA₂ da peçonha de *Naja naja*. O ácido elágico isolado de *Casearia sylvestris* também se mostrou um eficaz inibidor de edema produzido pela peçonha de *B. jararacussu* e sua toxina isolada BthTX-II (DA SILVA et al., 2008).

As PLA₂s presentes nas peçonhas de serpentes apresentam uma variedade de efeitos farmacológicos. Estas enzimas desencadeiam uma cascata de eventos inflamatórios caracterizados pelo aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema, captação de leucócitos dentro dos tecidos e dor (VALENTIN; LAMBEAU, 2000; KOH; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2006; BURKE; DENNIS, 2009a;b; CISNE DE PAULA et al., 2009). Neste estudo, comprovamos a eficácia do EAAh como um potente anti-inflamatório.

A hemorragia é a perda de sangue dos vasos e ocorre como consequência de inúmeros fatores extrínsecos como o trauma localizado, e, intrínsecos como a hipertensão arterial. Em condições normais, o extravasamento de sangue de um vaso é detido pela ação integrada da vasoconstrição, agregação plaquetária e coagulação sanguínea (MONTENEGRO; FRANCO, 1999). Muitas toxinas são capazes de induzir hemorragia local em acidentes ofídicos. Essas toxinas têm sido purificadas e caracterizadas como sendo essencialmente metaloproteases zinco-dependentes, e são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular, alterando a capilaridade dos vasos sanguíneos (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Neste estudo o EAAh mostrou-se muito eficaz na inibição das peçonhas botrópicas e de *L. muta*, o que corrobora com resultados anteriormente apresentados para extratos ricos em taninos como os da *Musa paradisiaca* e *Schizolobium parahyba*. Na proporção 1:10 (m/m) o extrato de *S. parahyba* inibiu 100% a hemorragia induzida por *B. alternatus* e *B. moojeni* (VALE et al., 2008), enquanto que o extrato de *M. paradisiaca* neutralizou significativamente a atividade hemorrágica induzida por *B. jararacussu* (BORGES et al., 2005).

Muitos componentes naturais anti-hemorrágicos têm sido isolados de plantas e soro de animais resistentes (FERREIRA et al., 1992; PÉREZ; SÁNCHEZ, 1999). Esses estudos sugerem que a atividade enzimática das metaloproteases é alterada pelos

extratos naturais através da captação do zinco ou cálcio dos sítios catalíticos, os quais as tornam inativas, ou ainda pela interação de grupamentos destes compostos naturais que podem estar interferindo na conformação estrutural das proteínas.

O EAAh inibiu completamente a atividade coagulante das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, impedindo a formação de coágulo no plasma nas diferentes proporções testadas. Estes resultados corroboram com estudos realizados com outras espécies de plantas como *Heliconia curtispata*, *Pleopeltis percussa*, *Brownea rosademonte*, *Bixa orellana*, *Trichomanes elegans*, *Struthanthus orbiculareis* e *Casearia sylvestris* que descreveram o efeito inibitório total ou parcial sobre a atividade coagulante de peçonhas das serpentes *B. asper*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. pirajai*, *B. neuwiedi* e *C. d. terrificus* (OTERO et al., 2000; BORGES et al., 2000; 2001; NUNES et al., 2004).

A inibição da atividade coagulante ocorreu, possivelmente, por interação de substâncias bioativas de *A. humile* com as serinoproteases, que são proteínas responsáveis pela ação coagulante das peçonhas. Estas interações provavelmente induzem alterações irreversíveis no sítio catalítico destas toxinas, que necessitam de conservação das interações químicas dos resíduos de aminoácidos para exercerem ações tóxicas (BORGES et al., 2001; GUIGUER et al., 2004).

No Brasil são notificados cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano no Brasil, e destes casos 90% ocorrem com as serpentes do gênero *Bothrops* (FUNASA, 2001). Entretanto, a maior letalidade ocorre nos acidentes crotálicos, e está relacionada, principalmente, à ação sistêmica dos componentes neurotóxicos e miótoxicos presentes na peçonha das serpentes do gênero *Crotalus* (PINHO; PEREIRA, 2001). O EAAh inibiu completamente a letalidade da peçonha de *C. d. terrificus* e sua principal neurotoxina isolada, a crotoxina, sugerindo que esse extrato vegetal inibe de forma significativa as neurotoxinas crotálicas. A inibição da letalidade tem sido observada para algumas plantas como a *Mandevilla illustris*, que inibiu parcialmente a ação da crotoxina, prolongando o tempo de vida de camundongos (BIONDO et al., 2004).

Após a confirmação da ação antiofídica do EAAh, realizou-se uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica em duas condições diferentes, a fim de

comparar o perfil cromatográfico do extrato com o de algumas substâncias comerciais, que poderiam estar presentes no EAAh. Em condições apolares não foi possível a identificação de qualquer fração definida quando comparada com os padrões comerciais nas mesmas condições de eluição. Em condições polares, claramente detectou-se uma fração bem definida com tempo de retenção similar ao padrão comercial de ácido gálico (AG).

Os extratos de plantas são formados por inúmeras substâncias orgânicas e inorgânicas com diferentes funções. Muitos trabalhos têm relatado a existência de plantas com ação antiofídica, ficando claro que entre os compostos presentes nos extratos vegetais existem biomoléculas capazes de neutralizar diversos efeitos locais e sistêmicos produzidos pelas peçonhas de serpentes. Até o momento nenhum composto antiofídico havia sido isolado do gênero *Anacardium*, embora um trabalho tenha descrito a ação antiofídica do extrato etanólico de *A. occidentale* (USHANANDINI et al., 2009).

Para a realização do fracionamento e purificação do AG a partir do EAAh, foi feita a partição do extrato em três diferentes solventes (hexano, DCM e acetato de etila). O solvente escolhido para obter o extrato vegetal deve ser o mais seletivo possível. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substância que se deseja extrair determina o solvente que deve ser utilizado. Solventes com características polares tendem a extrair substâncias polares como saponinas, alcalóides, taninos e heterosídeos em geral (SIMÕES et al., 2007).

O extrato de acetato de etila promoveu a inibição da PLA₂ (BthTX-II) de *B. jararacussu*, e por isso foi utilizado no fracionamento. A escolha pela utilização da sílica-gel para o fracionamento do extrato de acetato deve-se à natureza química da superfície da sílica, que é constituída por grupos silanóis expostos, que são sítios ativos que podem formar fortes ligações de hidrogênio, principalmente com grupos polares (ácidos carboxílicos, aminas e amidas). Consequentemente, na cromatografia de adsorção em sílica-gel a separação se estabelece em função da polaridade dos solutos e da fase móvel (eluente). Neste tipo de separação, compostos polares apresentam interações adsorptivas fortes e requerem eluentes polares. Exemplos de classes de

compostos que apresentam interações adsorptivas fortes são derivados de ácidos carboxílicos, amins e amidas, tais como: aminoácidos, guanidinas, purinas, nucleosídeos, alcalóides, amins terciárias, sais orgânicos, polióis, poliácidos, poliaminas, e polifenóis (taninos) (BELYAKOVA; VARVARIN, 1999).

Para isolamento do AG foram utilizados três eluentes com diferentes polaridades, das dez frações obtidas, apenas três (F5, F6 e F7) inibiram a PLA₂ de *B. jararacussu*, sendo que a maior inibição foi obtida com a F5. Ao fracionar F5 em CLAE semi-preparativa, obteve-se as frações F7 (1ª purificação) e F10-20, F25-32 (2ª purificação) puras. Estas foram reunidas e chamadas de fração FAG, utilizada para elucidação da estrutura por RMN. A coluna utilizada em CLAE foi a C-18 (fase reversa) que consiste em uma cadeia de 18 carbonos ligada à sílica da coluna, fazendo com que as substâncias apolares se liguem à coluna e substâncias polares saiam primeiro. O tempo em que cada substância sai da coluna pode também ser diferenciado pelo tipo de solvente utilizado na eluição (GRITTI; GUIOCHON, 2006). Nas CLAE semi-preparativas e analíticas realizadas, foram utilizados solventes bastante polares (água e metanol) em gradiente de eluição.

Para a elucidação estrutural da substância isolada, a fração FAG foi submetida à ressonância magnética nuclear (RMN) para a análise dos espectros unidimensional de ¹H e ¹³C. A espectroscopia de RMN possui aplicações em várias áreas da ciência, sendo a mais importante no estudo da estrutura de compostos naturais usando técnicas de uma dimensão (técnica utilizada para a RMN de AG, por tratar-se de um composto de simples elucidação estrutural) e de duas dimensões (para os compostos mais complicados). O princípio da espectroscopia de RMN é a medida da intensidade de absorção ou emissão das radiações eletromagnéticas (ppm) em cada frequência através uma faixa específica de frequências (SILVERSTEIN et al., 1994).

Os resultados da RMN de ¹H da fração FAG demonstraram os deslocamentos exercidos pelos hidrogênios da molécula. FAG mostrou apenas um intenso singleto em δ 7,13 que é atribuído aos dois hidrogênios equivalentes (H-2 e H-6) do anel aromático. Os deslocamentos químicos (δ) com valores de 6 a 9 ppm, revelam prótons de compostos fenólicos ligados ao anel aromático (SILVERSTEIN et al., 1994). Os

espectros obtidos na RMN de ^{13}C foram intensos singletos em δ 108,89 (C-2 e C-6); δ 120,68 (C-1); δ 136,89 (C-4); δ 144,29 (C-3 e C-5); δ 167,88 (C-1'). Todos os esses dados obtidos para RMN de ^1H e ^{13}C em comparação aos da literatura (ANDERSEN, 2003; SOUZA FILHO et al., 2006), levaram à identificação da fração FAG como sendo o ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$; PM = 170,12).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de substâncias que incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático com um hidrogênio substituído por uma hidroxila (SIMÕES et al., 2007). Os taninos pertencem a essa classe de compostos, que têm ampla distribuição e importantes funções no reino vegetal, e é comumente encontrado na família Anacardiaceae.

O AG, assim como os demais taninos, tem como principais atividades biológicas a ação bactericida, fungicida, antiviral, inibição de enzimas como glicosiltransferases de *Streptococcus sp.*, inibição da peroxidação de lipídeos e sequestrador de radicais livres e ação antitumoral (SIMÕES et al., 2007). Em 2009, pesquisadores tailandeses isolaram o ácido gálico e um derivado do ácido gálico (pentagaloil glucopirranose) do extrato etanólico de *Mangifera indica*, planta que pertence à mesma família que a *A. humile*, e realizaram alguns testes com estes compostos comprovando suas eficácias na neutralização das peçonhas das serpentes *Calloselasma rhodostoma* e *Naja naja kaouthia* (LEANPOLCHAREANCHAI et al., 2009). Após o isolamento e a confirmação estrutural do AG presente no extrato de *Anacardium humile*, realizou-se alguns testes enzimáticos e farmacológicos com o AG isolado e o comercial a fim de comprovar sua atividade antiofídica.

As PLA₂s presentes na peçonha de *B. jararacussu* e a BthTX-II (PLA₂ Asp49 isolada) apresentaram atividade hemolítica indireta em gel de agarose. As PLA₂s agem quebrando os fosfolipídios da gema, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Os ácidos graxos liberados diminuem o pH do meio, e, juntamente com os lisofosfolipídeos induzem a lise dos eritrócitos, permitindo a formação do halo de hemólise (GUTIÉRREZ et al., 1988; KETELHUT et al., 2003). O AG isolado de *A. humile* inibiu moderadamente

(40-50%) a formação do halo de hemólise induzido por 10 µg da peçonha de *B. jararacussu* e sua toxina isolada (BthTX-II) na proporção de 1:30 (m/m).

Os camundongos tratados com AG misturado com a peçonha de *B. jararacussu* ou a miotoxina BthTX-I, na proporção de 1:100 (m/m), inibiu fortemente (80-95%) o edema provocado pela PLA₂. Portanto, isto sugere que o AG seja a principal substância presente no EAAh com a capacidade de inibir a formação do edema provocado pelas peçonhas de serpentes. Alguns trabalhos mostraram que compostos fenólicos são capazes de reduzir não só a atividade enzimática das PLA₂s de peçonhas de serpentes, mas também a formação de edema (NEVES et al., 1993; TICLI et al., 2005; DA SILVA et al., 2008; DIOGO et al., 2009). Provavelmente a presença da hidroxila fenólica seja a responsável por inibir as PLA₂s de peçonhas de diferentes serpentes.

Outro ensaio biológico realizado com o AG foi a inibição da miotoxicidade. O estudo da atividade miotóxica foi realizado através da metodologia de dosagem de CK no plasma, que é um biomarcador de injúria muscular, neste caso específico, causado, principalmente, pelas PLA₂s (35 a 45% da peçonha) presentes na peçonha da serpente *B. jararacussu*. Nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* existem miotoxinas responsáveis pela mionecrose local (SOARES et al., 2000b).

O AG na proporção 1:100 (m/m), assim como o EAAh, inibiu cerca de 80% da miotoxicidade provocada pela peçonha e pela miotoxina (BthTX-I) isolada de *B. jararacussu*. Alguns compostos fenólicos isolados de plantas com potencial antiofídico revelaram-se bons inibidores antimiotóxicos. A wedelolactona e o ácido rosmarínico isolados dos extratos de *Eclipta alba* e *Cordia verbenacea*, respectivamente, inibiram a miotoxicidade induzida pelas fosfolipases A₂ (BthTX-I e II) isoladas da peçonha *B. jararacussu* (TICLI et al., 2005; DIOGO et al., 2009).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou duas flavonas do extrato de *Serjania erecta* (Isovitexina e vitexina) e o ácido aristolóquico do extrato de *Aristolochia sprucei*, todos com potencial antimiotóxico (FERNANDES, 2010; RODRÍGUEZ, 2010). Os resultados obtidos com os testes para inibição de miotoxicidade causada por peçonhas de serpentes tornam esse bioensaio o mais promissor para o extrato de *A. humile*, porque embora existam outros compostos secundários presentes no EAAh que

induzem a formação de edema, eles não provocam alterações nas membranas musculares, inibindo as miotoxinas da peçonha de *B. jararacussu* com a mesma capacidade do composto isolado (AG).

Para avaliar a possível interação molecular existente entre o AG e as miotoxinas (BthTX-I e II) foram realizados estudos de dicroísmo circular e simulação computacional.

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica particularmente útil para o estudo de moléculas quirais, tais como proteínas e carboidratos, que possuem unidades opticamente ativas. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração na luz incidente. O fenômeno do dicroísmo circular consiste da absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por essas moléculas quirais. Para proteínas, essa técnica tem sido bastante utilizada em estudos de estrutura secundária e enovelamento (SREERAMA et al., 2004).

Os resultados dos espectros de CD sugerem que não houve mudanças nas estruturas secundárias das miotoxinas BthTX-I e II na presença do inibidor AG. Não se observou nenhuma alteração significativa na porcentagem dos diversos domínios que constituem suas estruturas secundárias. A ligação do inibidor com as miotoxinas não modificou a forma e nem a intensidade dos espectros de dicroísmo circular. Resultados semelhantes foram observados nos testes realizados com o ácido rosmarínico (AR) isolado do extrato de *C. verbenacea*. A mistura desse composto fenólico com as bothropstoxinas I e II não causou nenhuma mudança significativa no enovelamento da estrutura secundária destas miotoxinas (TICLI et al., 2005). Diferentemente dos espectros observados para a interação do ácido aristolóquico isolado de *A. sprucei* com a BthTX-I, que demonstraram modificações nas estruturas secundárias desta miotoxina (RODRÍGUEZ, 2010). Iglesias e colaboradores (2005) estudaram o efeito do flavonóide morina sobre as PLA₂s isoladas de *Crotalus durissus cascavella*, os quais observaram que, a morina causa importantes modificações estruturais à PLA₂ quando analisado por dicroísmo circular.

Neste caso o AG seria uma boa alternativa para o tratamento dos efeitos locais do envenenamento ofídico, já que diferentemente da morina e do ácido aristolóquico, ele

interage especificamente com as miotoxinas sem modificar sua estrutura secundária, e provavelmente, não deveria causar modificações estruturais em outras proteínas intracelulares (desnaturação) essenciais ao organismo.

Os estudos de modelagem molecular entre toxinas-inibidores podem facilitar a compreensão das inibições das atividades farmacológicas e enzimáticas provocadas pelas peçonhas de serpentes (DA SILVA et al., 2008). Relembrando, as PLA₂s de peçonhas de serpentes são proteínas secretadas pertencentes aos grupos I e II, sendo que as da família Viperidae são usualmente do grupo II. O grupo IIA é subdividido em dois subgrupos: as Asp49 (BthTX-II) e as Lys49 (BthTX-I). As PLA₂ Lys49 têm o resíduo aspartato substituído por um resíduo de lisina na mesma posição e apresentam pouca ou nenhuma atividade catalítica, mas é biologicamente ativa (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; ARNI; WARD, 1996; SOARES et al., 2004a). A substituição do resíduo de aspartato pelo resíduo de lisina na posição 49 afeta drasticamente a ligação do cálcio às PLA₂s, prejudicando sua atividade catalítica. Apesar de inativas cataliticamente, as PLA₂s-símbles Lys49 demonstram atividade sobre membranas, pois contêm aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos na região C-terminal essenciais para sua atividade citotóxica (LOMONTE et al., 2003; CHIOATO; ARNI, 2003; AMBROSIO et al., 2005; COSTA et al., 2008; LOMONTE; ANGULO; MORENO, 2010).

Os resultados da modelagem revelam a possível orientação molecular do AG no canal hidrofóbico do sítio ativo da PLA₂-símbles Lys49-BthTX-I. Observamos que houve a interação de uma hidroxila do anel aromático do AG com o resíduo de His48 através de ligações de hidrogênio, e do grupo carboxílico com o resíduo de Lys49 por interações hidrofóbicas. Em 2005, Ticli e colaboradores observaram os mesmos tipos de interações entre o ácido rosmarínico e a BthTX-I.

Leanpolchareanchal e colaboradores (2009) realizaram estudos de modelagem molecular dos principais constituintes do extrato etanólico de *M. indica* (ácido gálico, metil galato e o pentagalolil glucopirranose) com as PLA₂s das serpentes *Calloselasma rhodostoma* e *Naja naja kaouthia*. Embora o estudo tenha sido realizado com as PLA₂s cataliticamente ativas (Asp49), foi possível visualizar interações semelhantes às do AG com a PLA₂-símbles Lys49-BthTX-I. O AG apresentou *Goldscore* de 37,55 e 35,52 para

as PLA₂s das serpentes *C. rhodostoma* e *N. n. kaouthia*, respectivamente. O ácido gálico (AG) isolado de *A. humile* apresentou *Goldscore* similar (de 34,40) quando na presença da BthTX-I isolada da peçonha da serpente *B. jararacussu*.

Para o estudo de modelagem molecular computacional são realizadas inúmeras (no mínimo dez) possíveis interações entre o inibidor e a PLA₂, e entre estas foi escolhida como sendo a melhor interação a de maior *Goldscore*. Estes resultados revelam que o melhor *Goldscore* para a interação entre o AG e as diferentes PLA₂s de serpentes ficou compreendido entre 30 e 40. Além disso, foi possível observar a interação entre os hidrogênios de algumas hidroxilas fenólicas do AG por meio de ligações de hidrogênio com os oxigênios do grupo carboxilato dos resíduos Asp49, Phe6, Gly30 e da Lys61 presentes na PLA₂ da serpente *C. rhodostoma*. Com a PLA₂ da serpente *N. n. kaouthia* foram visualizadas interações comuns por meio de ligações de hidrogênio das hidroxilas fenólicas do AG com os resíduos Tyr28, Gly30, Arg31, Gly32, Gly33, Cys45, His48, Asp49 e Tyr64 (LEANPOLCHAREANHALL et al., 2009).

O AG, isolado de *A. humile*, também interagiu por meio de ligações de hidrogênio com os resíduos de Gly32, Asp27 e His48, bem como através de interações eletrostáticas com os resíduos Lys49 e Lys60 presentes na PLA₂-símile Lys49-BthTX-I. Embora as PLA₂s usadas nas modelagens moleculares sejam diferentes, todas pertencem ao mesmo grupo de PLA₂s, grupo IIA, e por isso conservam o resíduo de Histidina na posição 48 (His48). Os inibidores de PLA₂s de peçonhas de serpentes, provavelmente ligam-se seletivamente aos resíduos do sítio catalítico ou a resíduos próximos deste, e modificam os resíduos conservados que são essenciais para o funcionamento destas enzimas hidrolíticas de lipídeos (SOARES; GIGLIO, 2003).

6. CONCLUSÕES

A natureza tem sido fonte de diversos produtos medicinais por milhares de anos, entre os quais as plantas constituem uma rica fonte de moléculas bioativas, como os flavonóides, taninos, terpenos e outros, com importantes atividades farmacológicas.

As proteínas de diferentes serpentes apresentam estrutura e função distintas, que interagem de forma diferente com o extrato aquoso de *Anacardium humile* (EAAh) e com seu princípio ativo isolado, o ácido gálico (AG).

Neste estudo foi avaliado o efeito do extrato aquoso das entrecascas de *A. humile* (EAAh) sobre as atividades farmacológicas e enzimáticas induzidas pelas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. EAAh mostrou-se eficiente contra as fosfolipases A₂ miotóxicas e neurotóxicas presentes nas peçonhas botrópicas e crotálicas, sugerindo a presença de sítios comuns nestas PLA₂s de ambos os gêneros para a ligação de substâncias presentes no extrato. O extrato também inibiu a miotoxina isolada de *B. jararacussu*, BthTX-I, em diferentes condições, com ou sem pré-incubação e no tratamento pós-envenenamento. O EAAh neutralizou 100% da letalidade provocada pela peçonha de *C. d. terrificus* e pela sua principal neurotoxina, a crotoxina, revelando-se um bom inibidor de neurotoxinas. O extrato também neutralizou totalmente a formação de coágulos induzidos pelas peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, sugerindo uma interação entre substâncias bioativas presentes no extrato com as serinoproteases, que são proteínas responsáveis pela ação coagulante das peçonhas.

O EAAh também inibiu a hemorragia provocada pelas peçonhas botrópicas e de *L. muta*, sugerindo que a atividade enzimática das metaloproteases é alterada pelo EAAh através da captação do zinco ou cálcio dos sítios catalíticos, que as tornam inativas, ou ainda pela interação de grupamentos deste composto natural que podem estar interferindo na conformação estrutural das proteínas.

O EAAh em baixas concentrações inibiu satisfatoriamente a formação do edema local provocado pela maioria das peçonhas testadas. Com o aumento da concentração

do extrato o mesmo não ocorreu, sugerindo a presença de substâncias no EAAh que induzem resposta inflamatória ou mesmo se ligam ou interagem diferentemente com os componentes da peçonha resultando em efeitos inibitórios em grau diferentes ou mesmo antagônico.

O AG foi isolado do extrato de acetato de etila de *A. humile* em duas etapas cromatográficas e sua estrutura determinada por RMN. Os resultados foram comparados aos dados já existentes na literatura, ficando claro que se tratava do AG. O AG mostrou-se um promissor inibidor das atividades PLA₂, miotóxica e indutora de edema induzidas pela peçonha da serpente *B. jararacussu* e sua miotoxina isolada (BthTX-I). Os estudos de interação molecular sugerem que o AG forma um complexo com a BthTX-I no sítio catalítico inibindo sua atividade, e as análises dos espectros de CD revelam que este inibidor não modifica a forma, nem a intensidade dos espectros das duas miotoxinas, BthTX-I e II.

Os resultados obtidos confirmam que o extrato de *A. humile* e seu princípio ativo isolado (AG) possuem propriedades antiofídicas, sugerindo a necessidade de estudos aprofundados que permitam a utilização segura do extrato e do AG como suplementação do soro antiofídico no tratamento de vítimas de acidentes com serpentes.

7. REFERÊNCIAS *

- ALAN, M.I.; GÓMEZ, A. Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (Herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal Plant "Sarsaparilla" (*Hemidesmus indicus* R. BR.). **Toxicon**, v. 36, p. 1423-1431, 1998.
- AKELERE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbalgram**, v. 28, p. 13-19, 1993.
- AMBROSIO, A.L.; NONATO, M.C.; DE ARAÚJO, H.S.; ARNI, R.; WARD, R.J.; OWNBY, C.L.; DE SOUZA, D.H.; GARRATT, R.C. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J.Biol. Chem.**, v. 280, p. 7326-7335, 2005.
- ANDERSEN, O. M. Anthocyanins acylated with gallic acid from chenille plant, *Acalypha hispida*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 867-871, 2003.
- 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.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ – Structural Review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.
- BELYAKOVA, L.A.; VARVARIN, A.M. Surface properties of silica gels modified with hydrophobic groups. **Colloids and Surfaces A: Physico. and Engin. Aspects**, v.154, p. 285-294.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)/NBR 6023, Rio de Janeiro, 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.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.
- 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. 127, p. 21-30, 2000.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHECHI, 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.; RASLAN, D.S.; PILÓ-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. Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 21-29, 2005.
- 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. p. 237- 242, 2009b.
- CÁCERES, A.; GIRÓN, L.M.; ALVARADO, S.R.; TORRES, M.F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **J. Ethnopharmacol.**, v. 20, p. 223-237, 1987.

- 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. **Braz. Q. J. Med.**, v. 86, p. 315–325, 1993.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, S.A.; HADDAD, V.J. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Ed. Sarvier, 2003.
- 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.
- CHIOATO, L.; WARD, R.J. Mapping structural determinantes of biological activities in snake venom phospholipase A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42, p. 869-883, 2003.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-1303, 1991.
- 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.
- COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.; NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; DE SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645-1656, 2008.

- DA SILVA, J.O.; COPPEDE, J.S.; FERNANDES, V.C.; SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; MAZZI, M.V.; 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, J.O.; FERNANDES, R.S.; TICLI, F.K.; OLIVEIRA, C.Z.; MAZZI, M.V.; FRANCO, J.J.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, p. 283-91, 2007.
- DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008.
- DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.
- DE PAULA, R.C.; SANCHES, E.F.; COSTA, T.R.; MARTINS, C.H.G.; PEREIRA, P.S.; LOURENÇO, M.V.; SOARES, A.M.; FULY, A.L. Antiophidian properties of plant extract against *Lachesis muta* venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.16, p. 311-323, 2010.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, p. 529- 540, 1994.
- DOMÍNGUEZ, X.A.; ALCORN, J.B. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans or Northeastern Mexico. **J. Ethnopharmacol.**, v. 13, p. 139-156, 1985.
- 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* (L.) Hassk genetically modified by *Agrobacterium rhizogenes*. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 104, p. 293-299, 2009.
- EGWIM, E. Hypoglycemic potencies of crude ethanolic extracts of cashew roots and unripe pawpaw fruits in guinea pigs and rats. **Herb. Pharmacother.**, v. 5, p. 27-34, 2005.

- FERNANDES, R.S. Avaliação da Atividade Antiofídica do Extrato de *Serjania erecta* Radlk *in natura* e *in vitro*: Isolamento e Caracterização Estrutural de Compostos Bioativos. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP**, 2010.
- FERREIRA, M.L.; MOURA DA SILVA, A.M.; FRANÇA, F.O.S.; CARDOSO, J.L.; MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlations with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, p. 1603-1608, 1992.
- FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- 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.
- GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Adsorption mechanism in reversed-phase liquid chromatography: Effect of the surface coverage of a monomeric C₁₈-silica stationary phase. **J. Chromatography**, v. 1115, p. 142-163, 2006.
- GUIGUER, E.L.; TICLI, F.K.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the activity of some snake venoms a peptide in the aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. (Apocynaceae). **J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 10, p. 497, 2004.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; CERDAS, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 85C, p. 171-175, 1986.
- 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.; 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. 735-745, 1989.
- 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.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Review. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.
- 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.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.
- GUTIÉRREZ, J.M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377-394, 2002.
- GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, D.G.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **Medicine**, v. 3, p. 727-731, 2006.
- 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.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de Plantas Superiores**. 1ª Ed, Ed. UFSCar, 2003.
- IWANAGA, S.; TAKAHASHI, H.; SUZUKI, T. Proteinase inhibitors from the venom of *Russell's viper*. **Methods Enzymol.**, v. 45, p. 874-881, 1976.
- IZIDORO, L.F.M.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES, R.S.; FERRO, E.V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacoutiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669-675, 2003.

- JANUÁRIO, 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.
- KAMIGUTI, A.S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: Interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 853-862, 1998.
- KETELHUT, D.F.J.; MELLO, M.H.; VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 85, p. 983-991, 2003.
- KINI, R.M. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.
- KINI, R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1147-1161, 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.
- LEANPOLCHAREANCHAI, J.; PITHAYANUKUL, P.; BAVOVADA, R.; SAPARPA KORN, P. Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai mango seed kernel extract against snake venoms. **Molecules**, v. 14, p. 1404-1422, 2009.
- 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.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from viperidae snake

- venoms: biomimetic activities and potential applications. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, p. 3224-3230, 2010.
- LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J. **Plantas medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.
- LUIZ-FERREIRA, A.; COLA-MIRANDA, M.; BARBASTEFANO, V.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R. Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agent? A scientific approach to the traditional knowledge. **Fitoterapia**, v. 79, p. 207-209, 2008.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.
- 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.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. Review. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 8, p. 743-56, 2007.
- MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, p. 1131-1142, 1992.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 7, p. 146-156, 2000.
- MEBS, D. **Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists**. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Germany, 2002.
- MELO, P.A.; NASCIMENTO, M.C.; MORS W.B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, p. 595-602, 1994.

- MENDES, M.M.; OLIVEIRA, C.F.; LOPES, D.S.; VALE, L.H.; ALCÂNTARA, T.M.; IZIDORO, L.F.M., HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytother. Res.**, v. 7, p. 859-66, 2008.
- MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 4^a Ed. Ed. Atheneu, São Paulo, 1999.
- MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.A.; DA SILVA, M.H.; MELO, P.A.; SUAREZ-KURTZ, G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**, v. 27, p. 1003-1009, 1989.
- MORS, W.B. Plants active against snake bite. **Economic and Medicinal Plant Research**, v. 5, p. 353-373. 1991.
- 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.
- MOTA, M.L.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J.M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 13, p. 289-300, 1985.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A₂. **Biol. Pharm. Bull**, v. 2, p. 1158 - 1164, 2004.
- NAZATO, V.S.; RUBEM-MAURO, L.; VIEIRA, N.A.; ROCHA-JUNIOR, D.S.; SILVA, M.G.; LOPES, P.S.; DAL-BELO, C.A.; COGO, J.C.; DOS SANTOS, M.G.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; OSHIMA-FRANCO, Y. *In vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. **Molecules**, v. 30, p. 5956-5970, 2010.
- NEVES, P.C.; NEVES, M.C.; CRUZ, A.B.; SANT'ANA, A.E.; 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. 213-309, 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*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 231, p. 309-319, 1984.
- NISHIJIMA, C.M.; RODRIGUES, C.M.; SILVA, M.A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**, v. 9, p. 1072-1080, 2009.
- NUÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSORIO, R.G.; FONNEGARA 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. Biol. Res.**, v. 37, p. 969-977, 2004.
- OKOGONI, T.; HATTORI, Z.; OGISO, A.; MITSUI, S. Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. **Toxicon**, v. 17, p. 524-527, 1979.
- OLAJIDE, O.A.; ADEROGBA, M.A.; ADEDAPO, A.D.; MAKINDE, J.M. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 139-142, 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.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 505-511, 2000.
- PÉREZ, J.C.; SÁNCHEZ, E.E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. **Toxicon**, v. 37, p. 703-728, 1999.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA I.D. Ofidismo. **Ass. Med. Brasil**, v. 47, p. 24-29, 2001.

- PORTO, K.R.; ROEL, A.R.; SILVA, M.M.; COELHO, R.M.; SCHELEDER, E.J.; JELLER, A.H. Larvicidal activity of *Anacardium humile* Saint. Hill oil on *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, p. 586-589, 2008.
- RODRIGUÉZ, I.I.G., Avaliação da atividade antiofídica de *Aristolochia sprucei*: Isolamento e caracterização estrutural de composto bioativo. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP**, 2010.
- SARKAR, S.K.; HOWARTH, R.E. Specificity of vanillin test for flavanols. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 317-320, 1976.
- SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5ª ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Ed: UFSC, 2007.
- SINGLETON, V.L.; KRATZER, F.H. Plant phenolics. In: National Academy of Sciences. 2ª ed. **Toxicants occurring naturally in foods**, p. 309-345, 1973.
- 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.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional 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-OLIVÉRRÉZ, C.R.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M.R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional 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 phospholipase 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.; JANUÁRIO 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.; JANUÁRIO, A.H.; PEREIRA, P.S. Medicinal Plant Extracts and Molecules as the Source of New Anti-Snake Venom Drugs. **Frontiers in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 309-346, 2009.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; SANTOS, R.A.; SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. Allelopathic Potential of *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 24, p. 649-656, 2006.
- 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.
- SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 318-351, 2004.
- 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.

- TICLI, F.K.; HAGE, L.I.; CAMBRAIA, R.S.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; STABÉLI, 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, D.O.; MARANGONI, S.; DIZ-FILHO, E.B.S.; OLIVEIRA, S.C.B.; TOYAMA, M.H. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Toxicon**, v. 53, p. 417-26, 2009.
- TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 391, p.37-62, 1996.
- VALE, L.H.; MENDES, M.M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 103, p. 104-107, 2008.
- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 59-70. 2000.
- USHANANDINI, S.; NAGARAJU, S.; NAYAKA, S.C.; KUMAR, K.H.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K.S. The anti-ophidian properties of *Anacardium occidentale* bark extract. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 31, p. 607-615, 2009.
- ZAMORA-MARTINEZ, M.C.; DE PASCUAL POLA, C.N. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. **J. Ethnopharmacol.**, v. 35, p. 229- 257, 1992.