UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da atividade antiofídica do extrato de *Serjania erecta* Radlk *in natura* e *in vitro*: isolamento e caracterização estrutural de compostos bioativos

Renata dos Santos Fernandes

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA

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 apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Renata dos Santos Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Versão corrigida da tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia. A versão original encontra-se disponível Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2011

LOMBADA

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

DOUTORADO

FCFRPUSP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Fernandes, Renata dos Santos

Avaliação da atividade antiofídica do extrato de *Serjania erecta* Radlk *in natura* e *in vitro*: isolamento e caracterização estrutural de compostos bioativos.
Ribeirão Preto, 2011.
84 p. :fig

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Soares, Andreimar Martins

1. Atividade antiofídica. 2. *Bothrops jararacussu*. 3. *Serjania erecta*. 4. Isovitexina. 5. Vitexina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata dos Santos Fernandes

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 apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Magali e Luciano, por me apoiarem e servirem de exemplo de vida.

À minha irmã, por estar sempre na torcida.

Aos seres que preenchem minha vida de alegria e amor incondicional.

Aos meus amigos, professores e colaboradores que compartilharam comigo mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luciano e Magali, por estarem sempre comigo com palavras verdadeiras e ações de apoio, amor infinito, colo e “puxões de orelha”.

À minha irmã pelo amor e companheirismo fraternal.

Ao Prof. Dr. Andreimar M. Soares (FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP) por sua orientação, infinita paciência, visão, poder de superação e grande determinação para enfrentar os problemas.

Ao Paulinho por sua amizade e por seus conhecimentos.

Aos companheiros e muito mais que colegas de bancada, amigos: Drª. Silvana Marcussi, Dr. Clayton Z. Oliveira, doutorandos Carolina Petri Bernardes, Danilo Lucas Menaldo, Lucas Blundi Oliveira, Norival Santos Filho, Johara Boldrini França e a mestranda Tássia Rafaella Costa (FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP) pela colaboração nos ensaios farmacológicos, paciência e troca de idéias.

À técnica de laboratório Sarazete Izidia Vaz Pereira (UNAERP, Ribeirão Preto-SP) por sua tão estimada amizade e pelo apoio nos procedimentos fitoquímicos e biotecnológicos.

Ao Dr. Nivaldo Boralle (UNESP, Araraquara-SP) pelos espectros de RMN.

Ao especialista em laboratório José Carlos Tomaz (FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP) pelas análises no HRESIMS.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, a Drª Lorane Izabel da Silva Hage e ao doutorando Vinícius Barreto (FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP) pelos estudos de modelagem molecular.

Ao Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes e ao doutorando Carlos A. H. Fernandes (UNESP, Botucatu-SP) pelas análises de dicroísmo circular.

Aos funcionários da Secretaria de pós-graduação da FCFRP-USP pela atenção e orientação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste estudo.

RESUMO

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**. 2011. 84f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

As peçonhas de serpentes são uma mistura complexa de enzimas e proteínas tóxicas. No Brasil, as serpentes dos gêneros *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos, os quais provocam dano tecidual local (como hemorragia, necrose e edema) e efeitos sistêmicos (como alterações na coagulação sanguínea). Envenenamentos por picadas de serpente são frequentemente tratados com a administração parenteral de soro antiofídico, visando a neutralização de toxinas. No entanto, apesar do sucesso da soroterapia, é importante a busca de inibidores capazes de neutralizar o dano tecidual local. Os extratos de plantas constituem uma fonte extremamente rica de compostos farmacologicamente ativos, e muitos extratos possuem atividade antiofídica. Neste estudo, o extrato metanólico das folhas de *Serjania erecta*, planta medicinal com propriedade anti-inflamatória foi submetido ao fracionamento cromatográfico, obtendo-se quatro frações principais que foram avaliadas por testes fitoquímicos, revelando a presença de saponinas, terpenos, flavonóides (SF3) e taninos (SF4). O isolamento e a caracterização de duas flavonas glicosiladas da fração rica em flavonóides (isovitexina e vitexina) também foram alcançados. Além disso, foi realizado o estabelecimento de culturas *in vitro* de *S. erecta* para assegurar, em um futuro próximo, a produção constante de metabólitos secundários, bem como a conservação desta espécie vegetal. Nos testes de inibição de atividade de peçonha de serpentes, a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *B. jararacussu* e *C. d. terrificus*, e toxinas isoladas (BthTX-II e crotoxina) foi inibida pelas amostras testadas, sendo que as frações SF3 e SF4 inibiram completamente a ação da toxina BthTX-II, enquanto que a crotoxina foi inibida com sucesso pela ação da fração SF4. O extrato metanólico de *S. erecta* e a fração SF3 foram capazes de prevenir a ação fibrinogenolítica da peçonha de *B. moojeni*. Já os extratos metanólicos *in natura* e dos calos, as frações SF3 e SF4, e as flavonas promoveram proteção parcial das cadeias do fibrinogênio quando incubados juntos com a peçonha de *B. jararacussu*. Nos ensaios sobre atividade coagulante, a vitexina e as frações SF3 e SF4 atuaram como potentes inibidores desta atividade induzida pela peçonha de *B. jararacussu.* O mesmo foi observado no ensaio sobre a inibição do edema induzido por BthTX-I. A atividade hemorrágica das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* foi inibida pela ação do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e de suas frações. Sendo assim, as frações SF3 e SF4, ricas em flavonóides e taninos, respectivamente, apresentam compostos capazes de inibir a ação de toxinas presentes nas peçonhas. Os estudos sobre modelagem molecular feito entre a miotoxina BthTX-I e os compostos isolados demonstraram que o complexo toxina-inibidor é estabilizado por pontes de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da região do sítio catalítico da toxina. Além disso, os espectros de

dicroísmo circular não revelaram mudanças significativas nas estruturas secundárias das miotoxinas BthTX-I e II quando quando na presença das flavonas (vitexina e isovitexina). Entre as flavonas tanto a vitexina como a isovitexina mostraram resultados semelhantes em quase todas as atividades testadas, porém na atividade anticoagulante induzida pela peçonha de *B. jararacussu*, a vitexina impediu a coagulação do plasma testado, sugerindo que a posição do açúcar pode ter influenciado a inibição da atividade. Estes resultados sugerem que parte da ação antiofídica do extrato metanólico de *S. erecta* ocorre devido a ação dos compostos isolados em conjunto com outras classes de compostos presentes nesta planta medicinal.

Palavras-chave: Atividade antiofídica, *Bothrops jararacussu*, Miotoxinas, *Serjania erecta*, Isovitexina, Vitexina.

ABSTRACT

Fernandes, R.S. **Evaluation of antiophidian activity of *Serjania erecta* extract Radlk *in natura* and *in vitro*: isolation and structural characterization of bioactive compounds.** 2011. 84f. Thesis (Doctoral) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Snake venoms are a complex mixture of enzymes and toxic proteins. In Brazil, *Bothrops* snakes are responsible for most accidents with venomous animals, which cause local tissue damage (hemorrhage, edema and necrosis) and systemic effects (blood clotting disorders). Snakebites are often treated with parenteral administration of antivenom, aimed at the neutralization of toxins. However, despite the success of serum therapy, it is important to search for inhibitors that can neutralize the local tissue damage. Plant extracts constitute a rich source of pharmacologically active compounds, and many extracts present antiophidian activity. In this study, the methanolic extract of leaves of *Serjania erecta*, a medicinal plant with anti-inflammatory properties, was subjected to chromatographic fractionation, resulting in four main fractions that were evaluated by phytochemical tests, revealing the presence of saponins, terpenes, flavonoids (SF3) and tannins (SF4). The isolation and characterization of two flavone glycosides of the flavonoid-rich fraction (isovitexin and vitexin) were also achieved. Moreover, the *in vitro* cultures of *Serjania erecta* also established to allow, in the near future, the continuous production of secondary metabolites, as well as the conservation of this plant species. The aim of this study was to evaluate the effect of methanolic extract of aerial parts of *S. erecta* and its fractions, isolated compounds and methanolic extract of callus against the enzymatic and pharmacological effects induced by snake venoms and isolated toxins. The phospholipase A_2 activity induced by snake venoms of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus*, and isolated toxins (BthTX-II and crotoxin) was inhibited by the samples tested, and the fractions SF3 and SF4 completely inhibited the toxin BthTX-II, whereas crotoxin was inhibited successfully by the action of fraction SF4. The methanolic extract of *S. erecta* and fraction SF3 were able to prevent the fibrinogenolytic action of *B. moojeni* venom. The methanolic extracts of callus and aerial parts of *S. erecta*, fractions SF3 and SF4, and flavones promoted partial protection of fibrinogen chains when incubated together with the *B. jararacussu* venom. Vitexin, SF3 and SF4 were potent inhibitors of the coagulant activity induced by *B. jararacussu* venom. BthTX-I edema-inducing activity was inhibited by vitexin, SF3 and SF4. The hemorrhagic activity of *B. jararacussu* and *B. neuwiedi* venoms were inhibited by the action of methanolic extract of aerial parts of *S. erecta* and its fractions. This extract is a promising source of natural inhibitors, as flavonoids and tannins, which act forming complexes with metal ions and proteins, inhibiting the action of serine proteases, metalloproteases and phospholipases A_2. The molecular modeling studies done between myotoxin BthTX-I and the compounds showed that the toxin-inhibitor complex is stabilized by hydrogen bonds with the side chains of amino acid residues in the region of the catalytic site of toxin. Moreover, the circular dichroism spectra revealed no significant changes in the secondary structures of

BthTX-I and II in the presence of flavones (vitexin and isovitexin). Vitexin and isovitexin showed similar results in almost all tested activities, but in the anticoagulant activity induced by *B. jararacussu* snake venom the vitexin prevented plasma coagulation, suggesting that the position of the sugar may have influenced the inhibition of this activity. These results suggest that part of the action antiophidic the methanol extracts of *S. erecta* occurs due the action of the compounds isolated in conjunction with other compounds present in this medicinal plant.

Keywords: Antiophidian Activity, *Serjania erecta*; *Bothrops jararacussu*, Isovitexin, Vitexin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Serjania erecta* 15

Figura 2. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e atividades realizadas 19

Figura 3. Cromatografia em camada delgada do extrato metanólico de *S. erecta* e as frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico em Sephadex LH20 26

Figura 4. (A) Sala de crescimento da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, (B) Cultura de calos de *Serjania erecta* 27

Figura 5. Cromatogramas obtido por CLAE em coluna Supelcosil™ LC18. (A) Extrato metanólico das folhas de *S. erecta*, (B) Extrato metanólico dos calos de *S. erecta* 28

Figura 6. (A) Cromatograma da fração SF3 obtido por CLAE em coluna semi-preparativa Supelcosil™ LC18 (250 mm x 10 mm), (B) Cromatograma da fração SF3 obtido por CLAE em coluna Supelcosil™ LC18 (250 mm x 4,6 mm) 29

Figura 7. Cromatogramas obtido por CLAE em coluna Supelcosil™ LC18. (A) Cromatograma do composto isolado SI, (B) Cromatograma do composto isolado SII, (C) Espectro no UV correspondente a SI, (D) Espectro no UV correspondente a SII 30

Figura 8. Cromatogramas obtido por CLAE em coluna Supelcosil™ LC18. (A) Cromatograma do padrão vitexina (Fluka®), (B) Cromatograma do composto

isolado SII de *S. erecta* 31

Figura 9. Espectro de RMN de 1H a 400 MHz para o flavonóide SI diluído em DMSO-d_6 33

Figura 10. Espectro de RMN de 13C a 100 MHz para o flavonóide SI diluído em DMSO-d_6 34

Figura 11. Perfil de fragmentação por ESI-MS em modo negativo de SI 35

Figura 12. Estrutura química do composto SI isolado de *S. erecta* 36

Figura 13. Espectro de RMN de 1H a 400 MHz para o flavonóide SII diluído em DMSO-d_6 37

Figura 14. Perfil de fragmentação por ESI-MS em modo negativo de SII 38

Figura 15. Estrutura química do composto SII isolado de *S. erecta* 39

Figura 16. Inibição da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-II 42

Figura 17. Inibição da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *C. d. terrificus* e crotoxina 43

Figura 18. Inibição da atividade fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni* 44

Figura 19. Inibição da atividade fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* 44

Figura 20. Inibição da atividade edematogênica induzida por BthTX-I 46

Figura 21. Inibição da atividade hemorrágica induzida por peçonhas de serpentes e o efeito dos extratos e das frações 47

Figura 22. Inibição da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e a BthTX-I 48

Figura 23. Efeito dos inibidores sobre a atividade miotóxica induzida pela BthTX-I sem incubação prévia e pós-envenenamento 49

Figura 24. Diagrama de Ribbons da interação entre BthTX-I e isovitexina 51

Figura 25. Diagrama de Ribbons da interação entre BthTX-I e vitexina 52

Figura 26. Análise dos espectros de dicroísmo circular das BthTX-I e II na presença dos inibidores SI e SII isolados de *S. erecta* 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Plantas medicinais da flora brasileira testadas contra peçonhas de serpentes brasileiras 7

Tabela 2. Dados de RMN de ^{1}H para os flavonóides SI e SII 39

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C para os flavonóides SI e SII 40

Tabela 4. Inibição da atividade coagulante da peçonha de *B. jararacussu* 45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético

δ: deslocamento químico

ANA: ácido α-naftalenoacético

BAP: 6-benzilaminopurina

BAW: n-butanol/ácido acético/água (4:1:5)

C: extrato metanólico da cultura de calos de *Serjania erecta*

Bjussu: peçonha de *Bothrops jararacussu*

Bmooj: peçonha de *Bothrops moojeni*

Bneuw: peçonha de *Bothrops neuwiedi*

BthTX-I: bothropstoxina-I isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

BthTX-II: bothropstoxina-II isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

Cdt: peçonha de *Crotalus durissus terrificus*

CK: creatina cinase

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO-d_6: dimetilsulfóxido deuterado

EFMeOH: extrato metanólico das folhas de *Serjania erecta*

EM: espectro de massa

ESI-MS: “electrospray ionization-mass spectrometry”

ESI-TOF: “electrospray ionization time-of-flight”

Fibri: fibrinogênio bovino

HMBC: “heteronuclear Multiple Bond Correlation”

HMQC: “heteronuclear Multiple Quantum Correlation”

HRESIMS: “high resolution electron spray ionization mass spectra”

J: constante de acoplamento

MS: meio Murashige e Skoog

Na-TFA: trifluoroacetato de sódio

NP-PEG: produtos Naturais-polietilenoglicol

PBS: tampão fosfato em salina

RMN ^{1}H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C: ressonância magnética nuclear de carbono

SI: isovitexina isolada do extrato de *Serjania erecta*

SII: vitexina isolada do extrato de *Serjania erecta*

TMS: tetrametilsilano

t_R: tempo de retenção

UV: ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT iii
LISTA DE FIGURAS v
LISTA DE TABELAS viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS ix

1. INTRODUÇÃO …….. 1
1.1. Acidentes Ofídicos 1
1.2. Plantas Medicinais com Atividade Antiofídica 3
1.3. Flavonóides com Atividade Antiofídica 11
1.4. *Serjania erecta* 13

2. OBJETIVO 16

3. MATERIAL E MÉTODOS 17
3.1. Análise Fitoquímica 17
3.1.1. Material Vegetal 17
3.1.2. Fracionamento Cromatográfico e Análise Química do Extrato 18
3.1.3. Caracterização Estrutural 20
3.2. Inibição das Atividades Enzimáticas, Tóxicas e Farmacológicas 21
3.2.1. Animais, Peçonhas e Toxinas 21
3.2.2. Inibição da Atividade Fosfolipásica 21
3.2.3. Inibição da Atividade Fibrinogenolítica 22
3.2.4. Inibição da Atividade Coagulante 22
3.2.5. Inibição da Atividade Indutora de Edema 22
3.2.6. Inibição da Atividade Hemorrágica 23
3.2.7. Inibição da Atividade Miotóxica 23

3.3. Estudos de Interação Molecular entre Inibidores e Miotoxinas 24
3.3.1. Análise Computacional 24
3.3.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular 25
3.4. Análise Estatística 25

4. RESULTADOS 26
4.1. Análise Fitoquímica 26
4.1.1. Material Vegetal 26
4.1.2. Fracionamento Cromatográfico e Obtenção de Compostos Isolados .. 28
4.1.3. Caracterização Estrutural dos Compostos Isolados 32
4.2. Inibição das Atividades Enzimáticas, Tóxicas e Farmacológicas 41
4.3. Estudos de Interação Molecular entre Inibidores e Miotoxinas 50

5. DISCUSSÃO 54
5.1. Análise Fitoquímica 54
5.2. Inibição das Atividades Enzimáticas, Tóxicas e Farmacológicas 57
5.3. Estudos de Interação Molecular entre Inibidores e Miotoxinas 62

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 66

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes Ofídicos

Os animais peçonhentos são aqueles capazes de produzir e inocular substâncias tóxicas, tais como serpentes, abelhas, aranhas, escorpiões e outros. As peçonhas de serpentes possuem inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais. São constituídas por uma variedade de toxinas as quais incluem: neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, proteases, desintegrinas e peptídeos, que atuam por diferentes mecanismos na paralisia, morte e digestão da presa (MEBS, 2001).

As serpentes estão distribuídas por quase todos os ambientes terrestres. Há aproximadamente 2900 espécies de serpente 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. No Brasil, encontramos representantes das famílias Viperidae e Elapidae, sendo que 32 serpentes pertencem ao gênero *Bothrops*, 29 ao gênero *Micrurus*, seis ao gênero *Crotalus* e duas ao gênero *Lachesis* (FUNASA, 2001).

Cerca de 20.000 acidentes ofídicos ocorrem por ano no Brasil, e destes casos 0,4% chegam ao óbito. A maioria dos acidentes ocorre em zonas rurais e estão relacionados com o aumento da atividade humana no campo e com fatores climáticos (PINHO; PEREIRA, 2001). No Brasil os casos de ofidismo são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (cerca de 87%), gênero *Crotalus* (cerca de 9%), gênero *Lachesis* (cerca de 3%) e gênero *Micrurus* (menos de 1%). O envenenamento por serpentes da família Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) causa distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea, induzem hemorragia, edema e necrose local, podendo, por vezes, ser neurotóxico. Enquanto que no envenenamento por serpentes da família Elapidae (gênero *Micrurus*) a ação

neurotóxica pode levar à insuficiência respiratória aguda, seguida de óbito (FUNASA, 2001).

No acidente botrópico a ação ocorre principalmente sobre os tecidos musculares e a coagulação do sangue, e entre os sintomas destacam-se: dor, edema e hemorragias (local da picada e mucosas), sendo que em casos onde surgem complicações podem ocorrer: bolhas, gangrena, choque e insuficiência renal aguda. No envenenamento crotálico, a peçonha afeta o sistema nervoso (ação neurotóxica), a coagulação e os músculos, e em casos graves pode ocorrer insuficiência renal aguda e morte. O ofidismo causado por serpentes do gênero *Lachesis* apresenta sintomas semelhantes ao acidente botrópico, acrescido de ação neurotóxica (FUNASA, 2001).

Muitos efeitos colaterais são atribuídos ao uso do soro antiofídico, que é feito inoculando-se pequenas e sucessivas doses da peçonha em cavalos. Quando alguém recebe o soro antiofídico está recebendo o plasma, geralmente provenientes de equinos e caprinos, repleto de anticorpos que auxiliarão o organismo do acidentado a se defender da ação da peçonha. Além disso, a identificação da serpente é importante na aplicação do soro, pois a especificidade do soro e a rapidez no atendimento são fatores que aumentam muito as chances de sucesso no tratamento. Há ainda, a difícil neutralização da lesão tecidual local no envenenamento provocado por serpentes do gênero *Bothrops*, enfatizando-se a necessidade de buscar alternativas complementares de tratamento. As peçonhas de serpentes botrópicas são compostas principalmente por proteínas que agem localmente durante o envenenamento, enquanto que as peçonhas de serpentes crotálicas possuem em sua maioria proteínas que agem prioritariamente de forma sistêmica (FUNASA, 2001; CARDOSO et al., 2003). Para algumas espécies de serpentes, o envenenamento usualmente causa dano tecidual local, incluindo edema, hemorragia e mionecrose, efeitos drásticos que são apenas parcialmente neutralizados pela soroterapia convencional. Em casos severos, tais efeitos podem levar a permanente perda de tecido, incapacidade e amputação. A mionecrose é causada por dano celular irreversível das fibras do músculo esquelético, bem como pela ação dos componentes da peçonha que afetam diretamente a integridade da

membrana plasmática. Além disso, a mionecrose pode ser um efeito secundário a isquemia provocada pela ação de metaloproteinases hemorrágicas contidas na peçonha. Por outro lado, a hemorragia causada pela ação proteolítica de metaloproteinases zinco-dependentes sobre os componentes da lâmina basal da microvasculatura, provoca a ruptura de células endoteliais (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

O envenenamento por acidente ofídico requer atendimento médico de emergência. Até o momento, o único tratamento validado cientificamente para este tipo de envenenamento é a soroterapia. Contudo, este tratamento apresenta algumas limitações: (i) restrito acesso ao soro antiofídico em áreas rurais de países em desenvolvimento, onde ocorre a maioria dos acidentes; (ii) variações significativas na composição da peçonha e reatividade antigênica devido à diversidade taxonômica e geográfica das serpentes, o que pode levar a sérias limitações clínicas durante a soroterapia; (iii) os pacientes podem apresentar reações adversas devido à infusão de proteínas de origem animal; e (iv) ineficiência da soroterapia na proteção contra o rápido dano tecidual causado pelos efeitos do envenenamento por serpente. Portanto, a continua busca e identificação de novos compostos que podem ser úteis como alternativa ou complemento da soroterapia por envenenamento por picada de serpente é uma tarefa de grande importância (SOARES et al., 2005). Em quase todas as regiões do mundo onde ocorrem acidentes ofídicos, numerosas espécies de plantas são usadas pela medicina popular para tratar os efeitos das picadas das serpentes, principalmente em regiões onde é difícil o acesso à terapia convencional com o soro antiofídico (MEBS, 2001).

1.2. Plantas Medicinais com Atividade Antiofídica

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos no mundo. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes

cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo ainda mantém a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. 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 farmacológia) e finalmente a operação 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). O uso dos recursos vegetais está presente na cultura popular que é transmitida a gerações no decorrer da existência humana. Este conhecimento tende a desaparecer, quando consideramos que vastas áreas do território nacional e principalmente do cerrado estão dando lugar a regiões de pastagem e monoculturas.

As últimas décadas têm presenciado um expressivo progresso científico com relação aos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, com o propósito de identificar novos compostos com propriedades terapêuticas. Muitas substâncias com atividades de interesse são com frequência encontradas em quantidades muito baixas nas plantas e ainda dependem de fatores tais como: variabilidade sazonal, dia e hora da coleta, etapa de crescimento, clima, composição do solo, ou partes da planta de onde os compostos ativos são extraídos. Algumas substâncias de valor para a indústria farmacêutica são obtidas diretamente de plantas em grandes quantidades e usadas na fabricação de muitos medicamentos. Contudo, a síntese química baseada em análogos de origem natural é necessária, somada a caracterização estrutural e farmacológica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos bioativos capazes de auxiliar diretamente no tratamento por envenenamento ofídico, ou indiretamente, como complemento da soroterapia convencional. O uso de extratos de plantas como antídoto contra peçonhas animais é uma antiga opção para muitas comunidades que carecem do rápido acesso à soroterapia. Além disso, o tempo transcorrido entre o acidente ofídico e o tratamento, diminui a habilidade do soro antiofídico de neutralizar os efeitos locais do envenenamento. Consequentemente, os extratos vegetais se tornam uma opção alternativa promissora como complemento do tratamento antisoro, e até mesmo única quando o tratamento convencional não é prontamente disponível (SOARES et al., 2005; 2009). Um número grande de plantas antiofídicas tem sido estudado na procura e caracterização de substâncias biologicamente ativas capazes de neutralizar diversos efeitos locais e sistêmicos provocados pelas peçonhas animais (MORS et al., 2000).

Há diversos estudos demonstrando 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 (Tabela 1). Mors e colaboradores (2000) citam 104 plantas indicadas pela medicina popular brasileira como antiofídicas e ainda as várias classes de compostos relacionados com ação antiofídica. Martz (1992) listou 11 espécies que se mostraram ativas contra a peçonha de serpente. Em um trabalho anterior, Mors (1991) listou 578 espécies de plantas ativas contra peçonha de serpentes, pertencentes a 94 famílias. Além disso, Otero e colaboradores (2000a, b, c) descreveram uma lista de 74 plantas coletadas na Colômbia, na presença de “curandeiros”, avaliando-se o 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 picada, 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 picada.

A flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico (MORS et al., 2000; SOARES et al., 2005; 2009). O nosso grupo

de trabalho vem demonstrando cientificamente o grande potencial terapêutico destas plantas contra peçonhas de serpentes, tais como, *Casearia sylvestris* (BORGES et al., 2000; 2001; CAVALCANTE et al., 2007), *Mandevilla velutina* e *M. illustris* (BIONDO et al., 2003; 2004), *Baccharis trimera* (JANUÁRIO et al., 2004), *Mikania glomerata* (MAIORANO et al., 2005), *Pentaclethra macroloba* (DA SILVA, et al., 2005; 2007), *Cordia verbenacea* (TICLI et al., 2005), *Bauhinia forficata* (OLIVEIRA et al., 2005), *Eclipta alba* (DIOGO et al., 2009), *Schizolobium parahyba* (MENDES et al., 2008; VALE et al., 2008), entre outras. Por esta razão há a necessidade de estudar espécies do cerrado brasileiro como a *Serjania erecta* na busca por compostos ativos com potencial antiofídico. Esta espécie é ainda pouco estudada e até o momento não existem estudos referentes à cultura de células e compostos isolados. Na literatura, encontram-se vários inibidores naturais já identificados, porém, não se tem muito conhecimento específico. O estudo da interação entre toxina-inibidor pode ajudar a elucidar os mecanismos de ação de algumas toxinas e permitir que se proponha terapia complementar que auxiliem o tratamento do envenenamento ofídico.

Tabela 1. Plantas medicinais da flora brasileira ou adaptadas* testadas contra peçonhas de serpentes brasileiras.

NOME POPULAR	PLANTA (FAMÍLIA)	SERPENTE	ATIVIDADE ANTIOFÍDICA	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIAS
Inhame-chinês	*Alocasia cucullata* (Araceae)	*B. atrox*	Anti-hemorrágica, pesquisa etnobotânica	Rizoma	MARTZ, 1992; OTERO et al., 2000a; b; c
Grápia	*Apuleia leiocarpa (Fabaceae)*	*B. jararaca*	Antiletalidade	Compostos (β-amirina, apuleína)	RUPPELT et al., 1991, PEREIRA et al., 1994
Carqueja	*Baccharis triptera, B. trimera* (Asteraceae)	*B. alternatus, B. moojeni, B. jararacussu, B. neuwiedi, B. pirajai*	Anti-hemorrágica, antiproteolítica, antifosfolipase	Folha	BERNARD et al., 2001; JANUÁRIO et al., 2004
Pata-de-vaca	*Bauhinia forficata* (Leguminosae)	*B. jararacussu, C. d. terrificus*	Anticoagulante, antifibrinogenolítica, antiedema	Partes aéreas	OLIVEIRA et al., 2005
Urucuzeiro	*Bixa orellana* (Bixaceae)	*B. atrox, Lachesis muta, C. d. terrificus, Micrurus mipartitus*	Antiletalidade, anti-hemolítica, antiedema, anticoagulante, antifibrinogenolítica	Folha	OTERO et al., 2000a; b; c; NUÑEZ et al., 2004a; b
Botica inteira, guiné do campo	*Bredemeyera floribunda* (Polygalaceae)	*B. jararaca*	Antiletalidade, pesquisa etnobotânica	Raíz	PEREIRA et al., 1996; DAROS et al., 1996; MORS et al., 2000;
Murici-cascudo, murici-vermelho	*Byrsonima crassa* (Malpighiaceae)	*B. jararaca*	Anti-hemorrágica	Folha, compostos (amentoflavona e quercetina)	NISHIJIMA et al., 2009
Calêndula, margarida	*Calendula officinalis* (Asteraceae)	*B. alternatus*	Antiedema, anti-hemorrágica, antimiotóxica, pesquisa etnobotânica,	Flor	MORS et al., 2000; MELO et al., 2003
Limãozinho	*Casearia marriquitensis* (Salicaceae)	*B. neuwiedi*	Anticoagulante	Folha	IZIDORO et al., 2003
Guaçatonga, lingua-de-Tiú	*Casearia sylvestris* (Salicaceae)	*B. jararaca*, *B. pirajai*, *B. jararacussu*, *B.*	Anti-hemorrágica, antifosfolipase pesquisa etnobotânica	Folha	BORGES et al., 2000; 2001; RASLAN et al., 2002; SOARES et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2007; DA SILVA et al., 2008

		moojeni, *C. d. terrificus*			
Limoeiro	*Citrus limon* (Rutaceae)	*B. atrox, L. muta*	Antiletalidade, antiedema, anticoagulante, antifibrinogenolítica	Fruto	OTERO et al., 2000a; b; c; NUÑEZ et al., 2004a, b
Cunambí, cunani	*Clibadium sylvestre* (Asteraceae)	*B. atrox*	Anti-hemorrágica, pesquisa etnobotânica	Planta inteira	OTERO et al., 2000a; b; c
Erva baleeira	*Cordia verbenacea* (Boraginaceae)	*B. jararacussu*	Antifosfolipase, antiedema, antimiotóxica	Folha, composto (ácido rosmarínico)	TICLI et al., 2005
	Curcuma sp. (Zingiberaceae)	*C. d. terrificus, B. jararaca, B. alternatus*	Antiletalidade, anti-hemorrágica, antiproteolítica, antineurotóxica, antiedema, antimiotóxica	Raízes, rizomas	CHERDCHU; KARLSSON, 1983; RATANABANANGKOON et al., 1993; MORS et al., 2000; MELO et al., 2003
Açafrão	*Curcuma longa* (Zingiberaceae),	*C. d. terrificus, B. jararaca, B. alternatus*	Anti-hemorrágica	Raíz, rizoma, composto (ar-tumerona)	FERREIRA et al., 1992; MORS et al., 2000; JACOME et al., 2002
Alcachofra	*Cynara scolymus* (Asteraceae)	*B. jararaca*	Antiletalidade		RUPPELT et al., 1991
Sambaibinha, lixinha, cipó-cabocho	*Davilla elliptica* (Dilleniaceae)	*B. jararaca*	Anti-hemorrágica	Folha, compostos (quercetina e miricetina)	NISHIJIMA et al., 2009
Baru, barueiro	*Dipteryx alata*	*B. jararacussu*, *C. d. terrificus*	Antimiotóxica	Casca, compostos fenólicos	NAZATO et al., 2010
	Dracontium croatii (Araceae)	*B. atrox*	Antiletalidade, antiedema, anticoagulante, antifibrinogenolítica	Rizoma	RIZZINI et al., 1988; OTERO et al., 2000a; b; c; NUÑEZ et al., 2004a
Erva-botão, agrião do brejo	*Eclipta prostata* ou *E. alba* (Asteraceae)	*B. jararaca, B. jararacussu, C. d. terrificus*	Antiletalidade, antimiotóxica, anti-hemorrágica, pesquisa etnobotânica	Partes aéreas, compostos (wedelolactona, dimetil-wedelolacton)	RIZZINI et al., 1988; MORS et al, 1989; MARTZ, 1992; MORS et al., 2000; PITHAYANUKUL et al., 2004; DIOGO et al., 2009
Apuí	*Ficus nymphaeifolia* (Moraceae)	*B. atrox*	Antiedema, anticoagulante, antifibrinogenolítica, anti-hemorrágica	Folha, ramo e caule	OTERO et al., 2000a; c; NUÑEZ et al., 2004a
Raiz-de-	*Harpalyce*	*B.*	Antimiotóxica,	Raíz,	NAKAGAWA et al.,

cobra	*brasiliana* (Fabaceae)	*jararacussu*	pesquisa etnobotânica	compostos (cabenegrinas A-I e A-II)	1982; MORS et al., 2000; DA SILVA et al., 2001
Arnica mineira	*Lychnophora pinaster* (Asteraceae)	*B. alternatus*	Antiedema, anti-hemorrágica, antimiotóxica	Folha	OTERO et al., 2000a; MELO et al., 2003
Jalapa, jalapa-do-campo	*Mandevilla illustris* (Apocynaceae)	*C. durissus terrificus*	Antifosfolipase, antiletalidade	Raíz, folha	BIONDO et al., 2004
Infalível ou batata-infalível	*Mandevilla velutina* (Apocynaceae)	*B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *C. durissus terrificus*	Antifosfolipase, antiedema	Rizoma	RIZZINI et al., 1988; NEVES et al, 1993; BIONDO et al., 2003
Boiá-caà	*Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae)	*B. jararaca*	Antifibrinolítica, pesquisa etnobotânica	Planta inteira	CASTRO et al., 1999; MORS et al., 2000
Guaco	*Mikania glomerata* (Asteraceae)	*B. jararaca, B. altenatus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu, C. d. terrificus*	Antiletalidade, anti-hemorrágica, antiedema, antifosfolipase, anticoagulante	Folha	RUPPELT et al., 1991; MORS et al., 2000; MAIORANO et al, 2005
Melãozinho, Melão de São Caetano	*Momordica charantia* (Cucurbitacea)	*B. atrox*	Antifosfolipase, anti-hemorrágica, pesquisa etnobotânica	Planta inteira	BERNARD et al., 2001; OTERO et al., 2000a; b; c
Amoreira	*Morus alba* (Moraceae)	*B. jararaca*	Antifosfolipase, antiproteolítica, anti-hialuronidase, antiedema, anti-hemorrágica, antimiotóxica, pesquisa etnobotânica	Caule, folha	MORS et al., 2000; BERNARD et al., 2001
Jabuticaba do mato, manapuçá	*Mouriri pusa* (Melastomataceae)	*B. jararaca*	Anti-hemorrágica	Folha	NISHIJIMA et al., 2009
Bananeira	*Musa sp.* (Musaceae)	*B. jararacussu, C. d. terrificus*	Antifosfolipase, antimiotóxica, pesquisa etnobotânica	Caule	RIZZINI et al., 1988; MORS et al., 2000; BORGES et al., 2005
Pracaxi	*Pentaclethra*	*B. atrox,*	Antiletalidade,	Casca	MORS et al., 2000; DA

	macroloba (Fabaceae)	*B. moojeni, B. jararacussu, B. alternatus, B. jararaca, B. neuwiedi, B. pirajai, L. muta*	anti-hemorrágica, antinucleotidase, antiproteolítica, pesquisa etnobotânica		SILVA et al., 2005; DA SILVA et al., 2007
Guiné	*Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae)	Serpentes brasileiras, *B. asper, B. atrox*	Antifosfolipase, anti-hemorrágica, pesquisa etnobotânica	Folha, ramo	RIZZINI et al., 1988; OTERO et al., 2000a; c; BERNARD et al., 2001
Capeba Pariparoba, aguaxima	*Piper umbellatum, Piper peltatum*	*B. asper*	Antifosfolipase, antimiotóxica	Ramo, composto (4-nerolidil-catecol)	NÚÑEZ et al., 2005
Guapuruvú	*Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae)	*B.alternatus B. moojeni, B. pauloensis, C. d. terrificus*	Anti-hemorrágica, antiproteolítica, antiletalidade	Folha	VALE et al., 2008; MENDES et al., 2008
Navalha de mico	*Scleria pterota (*Cyperaceae)	*B. jararacussu, B. moojeni, B. alternatus, B. neuwiedi*	Antifosfolipase, anticoagulante, anti-hemorrágica	Folha	SOARES et al., 2004
Arnica brasileira	*Solidago chilensis* (Asteraceae)	*B. alternatus*	Antiedema, anti-hemorrágica, antimiotóxica	Partes aéreas	MELO et al., 2003
Ipê rosa	*Tabebuia rose* (Bignoniaceae)	*B. atrox*	Anti-hemorrágica, antiletalidade, antiedema, anticoagulante	Caule	OTERO et al., 2000a; b; c; NUÑEZ et al., 2004a
Leiteiro de vaca, jasmim-cata-vento	*Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae)	*C. d. terrificus*	Antiletalidade, antimiotóxica	Raíz	BATINA et al, 2000; DE ALMEIDA et al., 2004; VERONESE et al, 2005

*: não pertencentes à flora brasileira, mas foram introduzidas por imigrantes ou colonizadores.
Tabela adaptada do artigo publicado por Soares e colaboradores (2005).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais *in natura* ou *in vitro* e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, ligninas, é de grande importância para o possível tratamento dos acidentes ofídicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Os compostos fenólicos são importantes constituintes de plantas com atividades antiofídicas e entre estes compostos destacam-se os flavonóides (MORS et al., 2000), além de apresentarem diversas atividades farmacológicas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Estes inibidores naturais podem ter papel importante na complementação da soroterapia tradicional, além de buscar novas drogas com menos reações adversas aos seres humanos, ou até mesmo o uso em animais domésticos ou de interesse comercial, uma vez que, para estes, o soro tradicional não é fornecido (SOARES et al., 2005).

1.3. Flavonóides com Atividade Antiofídica

Entre os compostos fenólicos de origem vegetal com propriedades antiofídicas destacam-se os flavonóides. Os flavonóides pertencem á classe de metabólitos secundários capazes de interagir com alvos moleculares (receptores e enzimas). De todos os metabólitos capazes de formar complexos, os flavonóides são provavelmente os mais versáteis. Estes compostos formam pontes de hidrogênio que se arranjam ao redor de esqueletos de carbono relativamente pequenos, sendo capazes de interagir com alvos moleculares. Possuem a capacidade de se ligarem a polímeros biológicos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Em 1993, Lindahl e Tagesson chegaram à conclusão de que a quercetina é um potente inibidor de PLA_2 pertencentes ao grupo II isolada da peçonha de *Vipera russelli*. Além disso, Lindahl e Tagesson (1997) descreveram o efeito inibitório de alguns flavonóides, particularmente a atividade da rutina sobre fosfolipases isoladas das peçonhas de *Vipera russelli* e *Crotalus atrox*. Uma PLA_2 isolada da peçonha de *Crotalus durissus cascavella* foi submetida a tratamento com a morina, um flavonóide, que induz severas modificações nos aminoácidos aromáticos desta enzima (IGLESIAS et al.,

2005). Girish e Kemparaju (2005) estudaram a inibição de uma hialuronidase isolada da peçonha de *Naja naja*, onde a quercetina inibiu completamente a atividade enzimática, enquanto que a flavona e o ácido tânico inibiram a atividade enzimática em 89 e 94%, repectivamente.

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre diferentes sistemas biológicos, na sua maioria de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides, que inclui subgrupos tais como os flavanóis, flavanonas, isoflavonóides, flavanas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, chalconas, entre outros (AOKI et al., 2000; YUNES; CALIXTO, 2001).

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C6-C3-C6. O esqueleto dos flavonóides é biosinteticamente derivado do fenilpropano (C6-C3) e três unidades de acetato (C6). Os flavonóides são formados pela combinação da via do chiquimato com a via do acetato (WINKEL-SHIRLEY, 2001; SIMÕES et al., 2002). Consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular, os flavonóides são encontrados em vegetais, legumes, frutas, chás de ervas, mel, entre outros produtos de consumo cotidiano. Apesar do termo flavonóide derivar do latim “flavus”, que significa amarelo, observa-se que os grupos flavonóis e flavonas são incolores e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (YUNES; CALIXTO, 2001; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Flavonóides possuem considerável importância farmacológica devido à suas propriedades terapêuticas multidirecionais como antioxidante, antifúngico, contraceptivo, antinflamatório, bactericida e na prevenção contra câncer e doenças cardíacas (YUNES; CALIXTO, 2001; NIJVELDT et al., 2001).

1.4. *Serjania erecta*

Muitas espécies do cerrado brasileiro são usadas como ervas medicinais por possuírem propriedades analgésica, antiácida, antibacteriana, antinflamatória, antitumoral, entre outras. No Brasil o uso de plantas medicinais é bastante difundido, especialmente em áreas rurais, no tratamento de muitas doenças. Muitos estudos direcionados para atividades farmacológicas estão sendo realizados. A rica flora do cerrado brasileiro é ainda pouco estudada quanto à avaliação da eficácia e avaliação dos efeitos terapêuticos de extratos brutos vegetais e de compostos isolados (NAPOLITANO et al., 2005). A flora do cerrado é de enorme riqueza, mas somente 1,5% de sua extensão é protegida por lei. Em vista disso, é preciso valorizar os recursos que ela oferece e que estão sob forte pressão de extinção, como as espécies medicinais (GUARIM NETO; MORAIS, 2003). O extrativismo constante de plantas medicinais em regiões endêmicas tem comprometido a perpetuação das populações naturais de espécies nativas e levando à extinção muitos grupos de plantas cuja atividade farmacológica já está comprovada, como também aquelas cujo estudo ainda são escassos ou inexistentes.

A família Sapindaceae é constituída por cerca de 200 gêneros e 2000 espécies, cujos representantes ocorrem na região tropical do mundo. Esta família está constituída por representantes que se apresentam com diferentes formas de vida, englobando desde trepadeiras, como em *Serjania* Miller, *Paullinia* Linné, até as altas árvores, como em *Talisia* Aublet e *Cupania* Linné. No Brasil, essa família tem como maior e mais representativa área de dispersão a região amazônica, de onde se distribui para todas as outras regiões, principalmente na região centro-oeste, nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e o Distrito Federal (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

Entre as espécies mais estudadas deste gênero destaca-se a *Serjania lethalis*, que é tradicionalmente indicada como antinflamatório, analgésico (uso externo) e piscicida (TEIXEIRA et al.,1984). O extrato etanólico de *S. lethalis* inibiu a produção de óxido nítrico (NO), um importante mediador inflamatório produzido por macrófagos. Contudo, quando ocorre uma produção exagerada de NO durante uma infecção, freqüentemente ocorre dano ao tecido endotelial, que pode levar a colapso vascular e

morte (NAPOLITANO et al., 2005). Ainda sobre esta espécie, Mesquita e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato etanólico das cascas das raízes da *S. lethalis* é ativo contra a forma promastigota de *Leishmania donovani*, inibindo seu crescimento em até 50% nas concentrações entre 0,1-10 µg/mL. Em outro estudo realizado por Lima e colaboradores (2006) foi demonstrado que o extrato etanólico de folhas e caules de *S. lethalis* possui ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

Outra espécie estudada é a *S. salzmanniana* que apresenta saponinas com atividade moluscicida contra a *Biomphalaria Alexandrina*, um vetor da *Schistosoma mansoni* no Vale do Nilo. Estas saponinas também demonstraram atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (EKABO; FARNSWORTH, 1996). Di Stasi e colaboradores (1988) concluíram que o extrato H_2O/MeOH 50% da espécie *S. communis* possui atividade analgésica quando administrado por via oral em ratos. A *S. glabrata*, cujo extrato metanólico apresentou atividade antioxidante contra a oxidação do β-caroteno, apresenta baixa toxicidade no Teste com *Artemia salina* (DAVID et al., 2007).

A espécie *Serjania erecta* Radlk (Figura 1), conhecida popularmente como retrato de teiú e cipó cinco folhas, pertence á família das Sapindáceas. Endêmica do cerrado trata-se de uma planta arbustiva de até dois metros de altura, caule arqueado-deflexo, folhas compostas com folíolos largos ovais, inflorescência apical com flores de cor branca, fruto cordado e arredondado. A folha macerada é utilizada como regulador menstrual, cicatrizante e antisséptico. A partir das folhas são preparados chás que auxiliam no tratamento de úlceras e a raiz é usada para o combate à hipertensão (FENNER et al., 2006). Em estudo realizado por Broggini (2010), verificou-se sua ação como agente preventivo ou inibidor na perda de memória. Neste mesmo estudo foi realizada a detecção de metabólitos secundários de interesse farmacológico, como saponinas, flavonóides e taninos. Os extratos metanólico e clorofórmico das folhas de *S. erecta* apresentaram atividade gastroprotetora em modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto em modelos animais *in vivo*, além disso, no perfil fitoquímico do extrato metanólico foram encontrados: terpenos, saponinas, flavonóides e taninos (ARRUDA et al., 2009). Em outro estudo, o extrato hidroalcoólico de *S. erecta*

apresentou atividade antinflamatória tópica e capacidade de diminuição de edema (GOMIG et al., 2009).

Figura 1. *Serjania erecta* (coleção de plantas da Unidade de Biotecnologia da UNAERP). Fonte: Renata S. Fernandes, 2007.

2. OBJETIVO

Avaliação do potencial antiofídico dos extratos metanólicos e possíveis compostos isolados a partir da planta *in natura* e cultura de calos de *Serjania erecta*.

Específicos:

1- Obtenção e manutenção de culturas *in vitro* de *Serjania erecta*.

2- Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e identificação dos possíveis compostos bioativos isolados a partir de técnicas espectroscópicas.

3- Avaliação da atividade inibitória dos extratos vegetais (planta *in natura* e cultura de calos), das frações e dos compostos isolados obtidos a partir de fracionamentos cromatográficos, sobre os efeitos tóxicos e farmacológicos (inibição das atividades fosfolipásica, edematogênica, hemorrágica, miotóxica e fibrinogenolítica) induzidos pelas peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, e de toxinas isoladas (BthTX-I, BthTX-II e crotoxina).

4- Estudos estruturais de interação molecular entre miotoxinas (PLA_2) e inibidores por meio de simulação molecular computacional e dicroísmo circular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise Fitoquímica

3.1.1. Material Vegetal

A primeira coleta do vegetal foi realizada em Altinópolis (São Paulo) e a segunda coleta em Sacramento (Minas Gerais). As exsicatas 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-835), sob a responsabilidade da Profa Dra. Ana Maria S. Pereira.

Segmentos foliares obtidos de *S. erecta* cultivada na "Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP" foram selecionados como explantes. Os explantes foram submetidos à assepsia superficial que inclui: água corrente por 24 h, tratamento com benomyl 1% (p/v) por 60 min sob agitação e hipoclorito de sódio 0,5 % (p/v) por 30 min sob agitação.

O preparo dos meios de cultura em todos os experimentos consistiu na dissolução dos sais básicos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em água destilada e deionizada seguida da adição de reguladores de crescimento selecionados para as culturas visando a proliferação celular. O pH foi ajustado em 6,0 ± 0,1 com solução de NaOH 1M. Para obter um meio de cultura semi-sólido foi adicionado Phytagel® (0,3 %). Culturas estáticas foram desenvolvidas em frascos de vidro contendo 12 mL de meio de cultura e vedados. A autoclavagem foi realizada sob pressão de 1,0 $Kgf.cm^{-2}$ e temperatura de 121℃ durante 15 min. Para a indução de calos, os explantes foram cultivados em meio MS suplementado com 2,5 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP + 30 g/L de sacarose e 3,0 g/L de Phytagel®. Os calos obtidos foram subcultivados em intervalos de 30 dias mantidos em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D + 1,0 mg/L de cinetina + 30 g/L de sacarose e 3,0 g/L de Phytagel® (TORRES; CALDAS, 1990). A cultura de calos foi mantida em sala de crescimento com condições definidas

favoráveis a friabilidade e a biossíntese das micromoléculas alvo, tais como: reguladores de crescimento, fotoperíodo de 16 horas com lâmpadas fluorescentes de 85 W (GE), temperatura (25 ± 2℃) e 55-60% de umida de relativa. Após o processo de esterilização e secagem, as culturas *in vitro* de *Serjania erecta* foram liofilizadas, trituradas e submetidas a processo de extração com solvente orgânico para obtenção do extrato metanólico.

3.1.2. Fracionamento Cromatográfico e Análise Química do Extrato

Após a coleta da planta foi realizado o processo de extração de compostos biologicamente ativos. O material *in natura* (folha) foi submetido a processo de secagem e trituração, enquanto que, a cultura de calos de *Serjania erecta* foi liofilizada e triturada. A obtenção dos extratos brutos foi realizada a partir da extração com metanol (MeOH) por um período de 48 horas. Os extratos brutos obtidos foram submetidos a procedimentos cromatográficos visando o isolamento e a purificação dos compostos biologicamente ativos presentes (HOSTETTMANN et al., 2003). Inicialmente, os extratos brutos foram avaliados por CCD (cromatografia em camada delgada) usando cromatoplaca de sílica gel (Sigma-Aldrich®), sistema eluente: BAW (n-butanol/ácido acético/água; 4:1:5) e NP-PEG (para visualização de flavonóides) como revelador. Na figura 2 está esquematizado o fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta*.

O extrato metanólico das folhas (5,0 g) foi fracionado em uma coluna cromatográfica (ϕ x h = 107 cm x 2,8 cm), a fase estacionária utilizada foi Sephadex LH20 (200 g) e a fase móvel para a eluição dos componentes da amostra foi o metanol. As frações obtidas foram separadas de acordo com o perfil químico observado em cromatoplaca e se esperava a obtenção de quatro frações de acordo com procedimento anterior realizado por Broggini (2010), sendo que a terceira fração, rica em flavonóides foi submetida a fracionamento cromatográfico para o isolamento dos compostos ativos, uma vez que em estudos preliminares esta fração mostrou ação inibitória sobre a peçonha de serpentes. Este fracionamento foi repetido por mais três vezes.

A fração rica em flavonóides foi submetida a fracionamento cromatográfico usando uma coluna preparativa Supelco™ LC18 (250 mm x 10 mm, Supelco®), partícula 5 µm; e foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diiodo (modelo CLASS-LC10) e com volume de injeção de 500 µL, sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H_2O 10% → 52% (70 min) e 10% (73 min) com fluxo de 2 mL/min e detecção no UV à 340 nm. Os extratos e as frações obtidos foram avaliados de forma analítica por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diiodo (modelo SPD- M10A *vp*) e injetor automático modelo (SIL-10AD *vp*), com volume de injeção de 20 µL; coluna Supelcosil™ LC18 (25 cm x 4,6 mm, Supelco®), partícula 5 µm; sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H_2O (0,1% ácido acético) 10% → 66% (32 min) e 10% (35 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 340 nm. Para esta análise também foi utilizado o padrão da flavona vitexina (Fluka®).

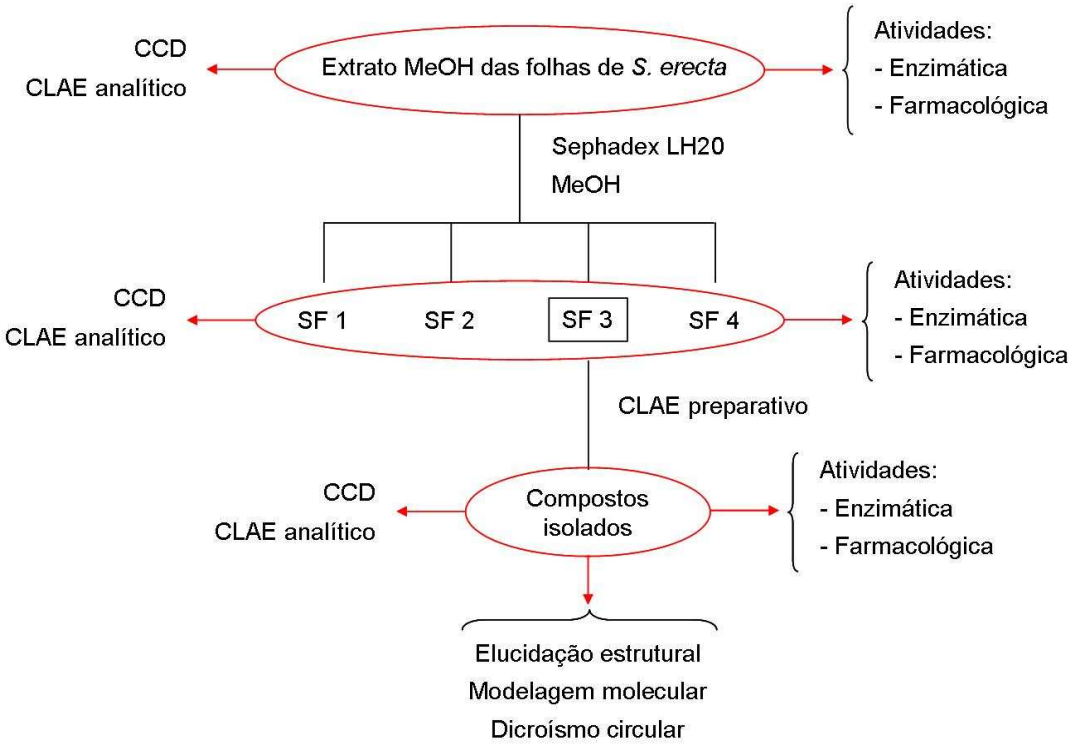


Figura 2. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e atividades realizadas.

3.1.3. Caracterização Estrutural

Para identificação dos compostos biologicamente ativos isolados foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear. Os espectros de RMN foram obtidos no equipamento Varian Inova 500, operando a 400 MHz e a 100 MHz, na freqüência do hidrogênio e do carbono-13, respectivamente. O solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foi o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6, Isotec – INC). Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm), sendo que tetrametil silano (TMS) foi utilizado como padrão interno. Os espectros obtidos foram realizados no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP) em Araraquara-SP e o processamento dos mesmos foi feito utilizando-se o programa *SpinWorks* 3.0.

O espectrômetro de massa (EM) usado foi o equipamento ultrOTOFQ-ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics) de alta resolução necessitando de calibração interna antes de realizar as análises. Para calibração interna foi usada uma solução de NaTFA (trifluoroacetato de sódio) a 10 mg/mL. As mostras foram dissolvidas em H_2O/MeOH (1:9, v/v). O modo de detecção foi negativo para as amostras (70 eV). Os espectros obtidos foram realizados na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.

3.2. Inibição das Atividades Enzimáticas, Tóxicas e Farmacológicas

3.2.1. Animais, Peçonhas e Toxinas

As peçonhas das serpentes (*B. jararacussu*, *B.* moojeni, *B. neuwiedi* e *C. d. terrificus*) foram adquiridas do Serpentário Proteínas Bioativas (Batatais – SP). As toxinas bothropstoxina-I (BthTX-I) e bothropstoxina-II (BthTX-II) foram isoladas da peçonha de *B. jararacussu* como descrito previamente (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000), sendo que a toxina crotoxina foi isolada da peçonha de *C. d. terrificus* como descrito previamente (SOARES et al., 2001). Camundongos machos *Swiss* (18-22 g) foram obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os experimentos relatados neste estudo foram realizados após aprovação pelo Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (Certificado n º 07.1.202.53.1 aprovado em reunião da CEUA em 10.10.07).

3.2.2. Inibição da Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi testada pelo método de hemólise radial indireta, realizado em placas (GUTIÉRREZ et al., 1988). O experimento consiste na elaboração de um gel ($CaCl_2$ 0,01 M; gema de ovo 1:30 v/v PBS, pH 7,2; eritrócitos-PBS (1:3-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 45-50ºC. Após o gel solidificar, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) para a aplicação das amostras (40 µL). As amostras consistiram de peçonhas brutas (*B. jararacussu* e *C. d. terrificus*) ou PLA_2s isoladas (BthTX-II e crotoxina) previamente incubadas com os diferentes extratos e frações, por 30 min a 37ºC, em diferentes proporções. Os géis contendo as amostras foram colocados em estufa a 37ºC por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel é um indicativo de atividade e foram medidos (cm) para a quantificação da atividade fosfolipásica, expressa em porcentagem e

ensaiadas em triplicata. A atividade total de cada peçonha ou PLA_2 foi considerada como 100%.

3.2.3. Inibição da Atividade Fibrinogenolítica

Foi determinado segundo a técnica descrita por Edgar e Prentice (1973) com algumas modificações de acordo com Rodrigues e colaboradores (2000). Para este ensaio foram realizadas incubações prévias das frações com as peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, e toxinas isoladas, na proporção de 1:10 e 1:30 (m:m, peçonha:fração), por período de 30min a 37ºC. As amostras foram posteriormente incubadas por 2 horas a 37ºC com a solução de fibrinogênio bovino (Sigma Chem. Co.USA). A reação foi finalizada com a adição de tampão azul desnaturante seguida por fervura a 100ºC por 4 min, sendo as amostras aplicadas no gel de eletroforese.

3.2.4. Inibição da Atividade Coagulante

A dose coagulante mínima (MCD) é definida como a quantidade de peçonha de *B. jararacussu* capaz de coagular 0,2 mL de plasma bovino em um intervalo de tempo igual a 60 segundos ou 1 minutos (GENÉ et al, 1989;. BIONDO et al, 2003). Resumidamente, alíquotas de 0,2 mL de plasma (n=3) foram incubadas com 20 µg da peçonha previamente incubada com os extratos e compostos isolados (30 min a 37ºC, 1:30, m/m). Os controles incluíram plasma com PBS acrescido de cálcio, extratos/frações/compostos isolados sozinhos e peçonha bruta (*B. jararacussu*). A atividade coagulante foi expressa pela média do tempo de coagulação (em minutos).

3.2.5. Inibição da Atividade Indutora de Edema

Neste ensaio, os animais (n=5) receberam injeções por via i.d. (intradérmica) na região subplantar da pata direita, 50 µL de soluções contendo 10 µg de toxina isolada (BthTX-I), dissolvidos em PBS, em grupos de cinco camundongos *Swiss* machos. A toxina foi pré-incubada com extratos e frações de *S. erecta* na proporção de 1:30 (m/m,

peçonha:fração), por 30 min a 37ºC. A primeira leitura das patas foi realizada antes da inoculação das amostras (tempo 0 min). Na sequência, foram realizadas as mensurações das patas após a injeção, nos intervalos de 30, 60 e 180 min após a injeção (de cada valor obtido foi subtraído o valor inicialmente aferido no tempo 0). O aumento da área na pata dos camundongos foi ser medido com um paquímetro de baixa pressão e expresso em mm de edema induzido (SOARES et al., 2000a).

3.2.6. Inibição da Atividade Hemorrágica

Esta atividade foi realizada segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984). Foram utilizadas 50 µL das amostras contendo 10 µg das peçonhas (*B. jararacussu* e *B. neuwiedi*), diluídas em PBS, que foram injetadas por via intradérmica (i.d.) na pele do dorso de camundongos pesando entre 18-22 g (n=5). Após 3 horas, os animais foram eutanasiados a partir da inalação de CO_2, as peles foram removidas e os halos hemorrágicos medidos em dois ângulos retos e expressos em cm. Definiu-se como dose mínima hemorrágica (DMH) a mínima concentração das peçonhas necessária para produzir um halo com cerca de 10 mm de diâmetro. As amostras contendo as peçonhas e os extratos vegetais e suas respectivas frações foram incubadas em diferentes proporções por 30 minutos a 37ºC. Uma vez sacrificados os animais foram reencaminhamento ao Biotério Central para incineração.

3.2.7. Inibição da Atividade Miotóxica

A miotoxicidade foi induzida em grupos de cinco camundongos *Swiss* machos (18-22 g) através de injeção i.m. (intramuscular) no músculo grastocnemius direito contendo 10 µg de peçonha bruta (*B. jararacussu*) ou toxina isolada (BthTX-I), diluídos em solução salina tamponada em fosfato (PBS). Os controles receberam somente PBS e os extratos. As frações que mostraram melhor desempenho antiofídico sob as atividades anticoagulante e fibrinogenolítica foram escolhidas para este teste. Após a injeção o sangue dos camundongos foi coletado em capilares heparinizados e

imediatamente centrifugado a 480 *xg* por período de 20 minutos. A atividade da enzima CK (creatina cinase) foi determinada através da utilização do Kit CK-UV cinético da Bioclin, Brasil. Este procedimento consiste na incubação de 4 μL do plasma com 1,0 mL de reativo dissolvido em água destilada por 3 min a 37℃ e leitura em um espectrofotômetro à 340 nm. A atividade creatina cinase é expressa em U/L, constituindo a fosforilação de um nanomol de creatina por minuto a 37℃ (SOARES et al., 2000a; b). Além do ensaio realizado com incubação prévia, foi realizado para esta atividade o ensaio sem incubação prévia e com injeção i.m. de inibidor 10 minutos após a injeção i.m. da toxina. Para este ensaio foram escolhidas as frações SF3 e SF4 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta*.

3.3. Estudos de Interação Molecular entre Inibidores e Miotoxinas

3.3.1. Análise Computacional

A modelagem molecular envolve a previsão da conformação e orientação estrutural de uma molécula ligante (inibidor) dentro do sítio ativo do alvo molecular (proteína). Os inibidores SI e SII, compostos isolados da fração SF3, foram desenhados 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 v5.0* 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 v4.1* (JONES et al., 1995; 1997). O raio de ligação entre o inibidor e o sítio ativo da toxina foi ajustado para 11 Å. A função Goldscore realiza a pontuação das possíveis conformações do ligante com a toxina. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Tomich da FCFRP-USP.

3.3.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Neste experimento as amostras foram dissolvidas em água ultrapura, centrifugadas e suas concentrações foram verificadas em espectrofotômetro – Nanodrop. Todas as amostras medidas no CD apresentavam a concentração de 250 μg/mL em volume de 200 μL. Para as medidas com SI e SII, foi utilizada uma proporção de oito moléculas de inibidores para uma molécula de toxina (Lys49-BthTX-I e Asp49-BthTX-II). As medidas foram feitas utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 mm dentro dos parâmetros citados a seguir: scanning speed 100 nm/min; band width 2nm; step resolution 0,5 nm, temperature 20℃. Cada espectro corresponde à média de 12 acumulações. Os dados foram coletados dentro do intervalo de 185-260nm. Todas as amostras foram analisadas na presença de fluxo de N_2 para que O_2 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 CONTIN (PROVENCHER; GLÖCKNER, 1981) disponível no programa de pacotes para deconvolução de curvas de CD, CDPro (SREERAMA; WOODY, 2000). A unidade utlizada para os espectros de CD foi a MRE (*Mean Residue Ellipticity/ degrees* $cm^2 dmol^{-1} residue^{-1}$), uma das mais utilizadas. Os espectros obtidos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Fontes no Departamento de Física e Biofísica no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu-SP.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatísticamente, sendo expressos os resultados pela média ± desvio padrão. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste *t*-Student com valor $p<0,05$ e $p<0,01$ considerado como significante.

4. RESULTADOS

4.1. Análise Fitoquímica

4.1.1. Material Vegetal

Inicialmente o extrato metanólico de *S. erecta* e as frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico em Sephadex LH20 foram avaliados por CCD (Figura 3), com BAW como fase móvel e NP-PEG como revelador para visualização de flavonóides.

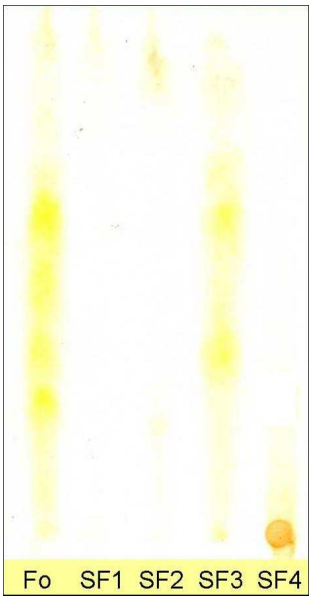


Figura 3. Cromatografia em camada delgada do extrato metanólico de *S. erecta* e as frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico em Sephadex LH20. Fase móvel: BAW, e revelador: NP-PEG. As amostras eluem desde o ponto de aplicação (parte inferior da placa) até 1 cm da borda superior da placa cromatográfica.

A figura 4B ilustra os calos obtidos durante o experimento, que se apresentaram friáveis e com uma coloração branca-acastanhada. Para a manutenção destas culturas era realizada a transferência dos calos para meios novos a cada 40 dias ou quando se

fazia necessário. O perfil cromatográfico comparativo do extrato metanólico dos calos e do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* analisados por CLAE foi apresentado na figura 5. Nesta análise foi possível observar que a cultura de calos de *S. erecta* parece ser fonte promissora de compostos biologicamente ativos, uma vez que indicou a presença de compostos fenólicos similares aos compostos presentes no extrato *in natura*.

A

B

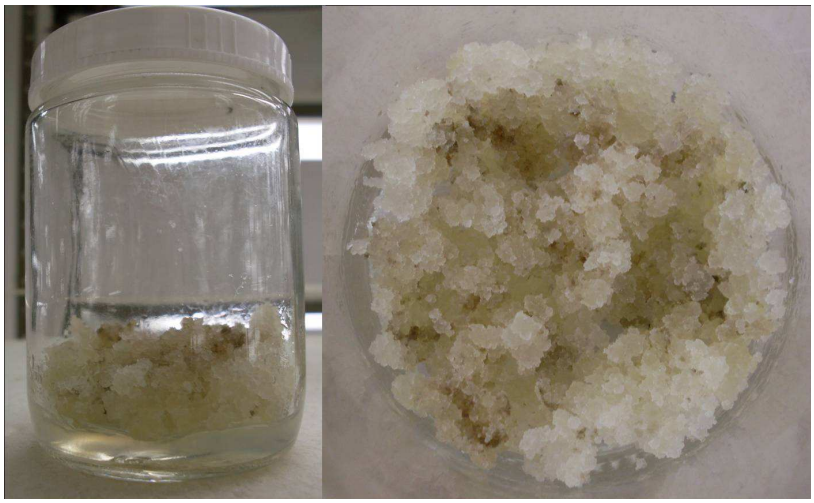


Figura 4. (A) Sala de crescimento da Unidade de Biotecnologia da UNAERP. Condições ambientais: fotoperíodo de 16 horas com lâmpadas fluorescentes de 85 W (GE), temperatura (25 ± 2℃) e 55-60% de umidade relativa , (B) Cultura de calos de *Serjania erecta*. Calos mantidos em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D + 1,0 mg/L de

cinetina + 30 g/L de sacarose e 3,0 g/L de Phytagel®. Fonte: Renata S. Fernandes, 2009.

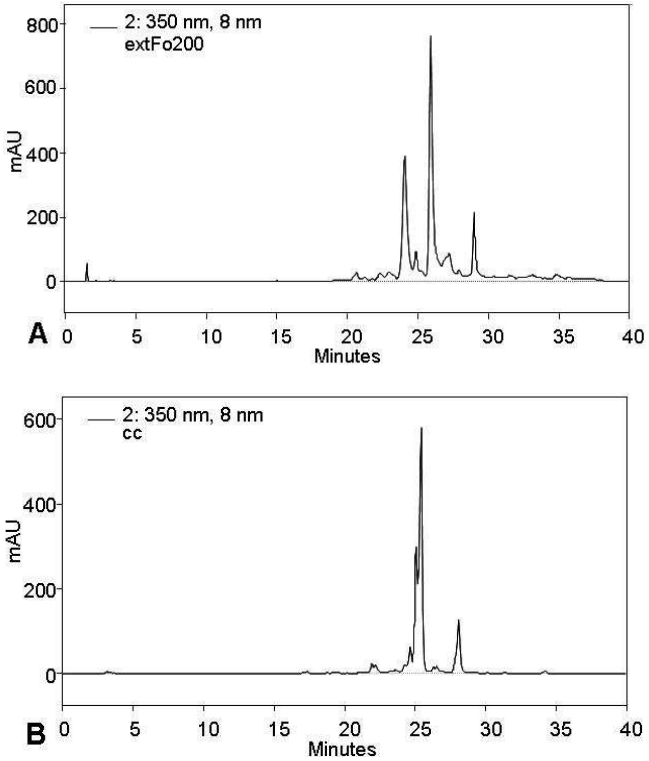


Figura 5. Cromatogramas obtido por CLAE em coluna Supelcosil^{TM} LC18 (250 mm x 4,6 mm), sistema eluente em gradiente de MeOH/H_2O (0,1% ácido acético) 10% $\rightarrow$ 66% (32 min) e 10% (40 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 350 nm. (A) Extrato metanólico das folhas de *S. erecta*, (B) Extrato metanólico dos calos de *S. erecta*.

4.1.2. Fracionamento Cromatográfico e Obtenção de Compostos Isolados

O extrato metanólico das folhas foi fracionado em uma coluna de Sephadex LH 20, onde foi utilizado como eluente o metanol. Deste fracionamento foram obtidas quatro frações, que foram chamadas de SF1, SF2, SF3 e SF4. A fração SF3 (m = 1,860 g), rica em flavonóides, mostrou-se ativa nos testes biológicos realizados e foi submetida a fracionamento cromatográfico usando uma coluna semi-preparativa (Figura 6A). Esta mesma fração também foi submetida à análise no CLAE analítico (Figura 6B), onde foram obtidos dois compostos isolados designados como SI (m = 100 mg) e SII (m

= 76 mg). Os compostos obtidos foram avaliados de forma analítica em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diiodo e detecção no UV à 340 nm. Nesta análise foi possível observar dois compostos isolados (Figuras 7A e 7B) com os seguintes tempos de retenção (t_R): 26,18 (SI) e 24,18 (SII) minutos. O espectro no UV de SI apresentou máximos de absorção em 269 e 343 nm (Figura 7C), enquanto que o espectro no UV de SII apresentou máximos de absorção em 267 e 341 nm (Figura 7D).

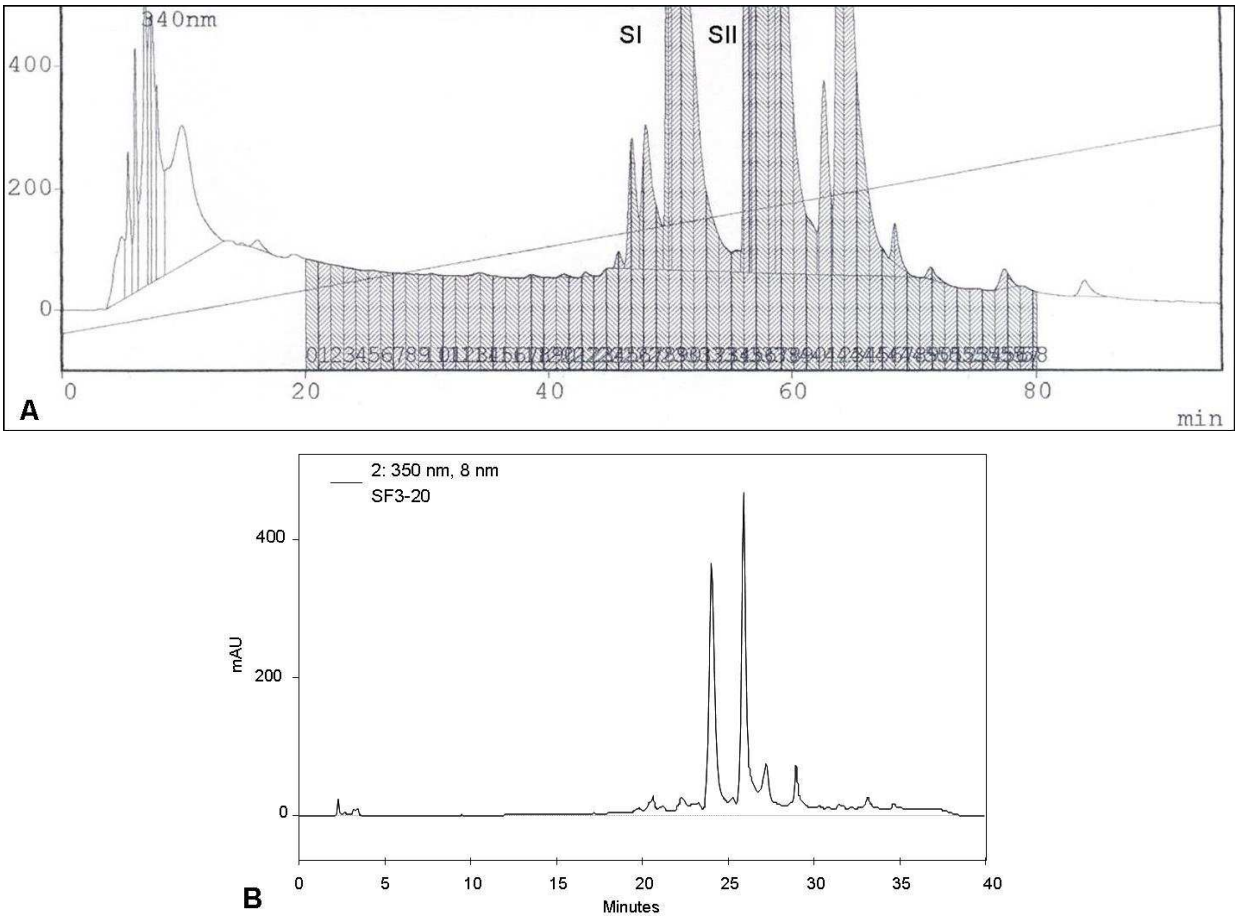


Figura 6. (A) Cromatograma da fração SF3 obtido por CLAE em coluna semi-preparativa Supelcosil^{TM} LC18 (250 mm x 10 mm), com volume de injeção de 500 μL, sendo o sistema eluente, um gradiente de MeOH/H_2O 10% → 52% (70 min) e 10% (73 min) com fluxo de 2 mL/min e detecção no UV à 340 nm, (B) Cromatograma da fração SF3 obtido por CLAE em coluna Supelcosil^{TM} LC18 (250 mm x 4,6 mm), com volume de injeção de 20 μL, sistema eluente em gradiente de MeOH/H_2O (0,1% ácido acético) 10% → 66% (32 min) e 10% (35 min)

com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 350 nm.

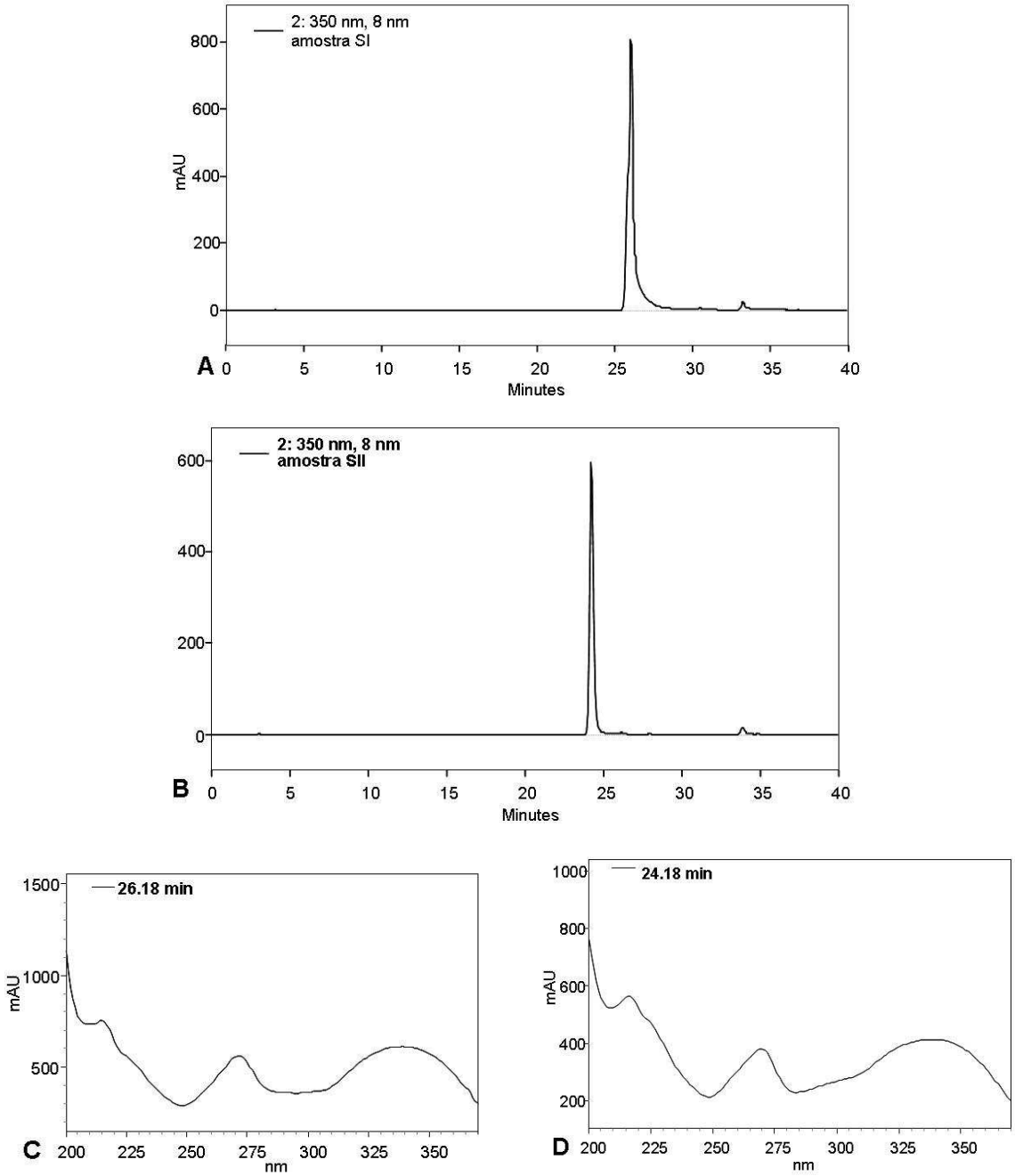


Figura 7. Cromatogramas obtido por CLAE em coluna Supelcosil^{TM} LC18 (250 mm x 4,6 mm), sistema eluente em gradiente de MeOH/H_2O (0,1% ácido acético) 10% $\rightarrow$ 66% (32 min) e 10% (35 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 340 nm. (A) Cromatograma

do composto isolado SI, (B) Cromatograma do composto isolado SII, (C) Espectro no UV correspondente a SI, (D) Espectro no UV correspondente a SII.

Para verificar a identidade da flavona SII, também foi realizada uma análise cromatográfica de forma analítica em um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diiodo e detecção no UV à 340 nm. Nesta análise foi utilizado o padrão comercial da flavona vitexina. A vitexina apresentou t_R = 24,09 min (Figura 8A) min e o espectro no UV apresentou máximos de absorção em 267 e 341, enquanto que o composto SII apresentou t_R = 24,18 min e máximos de absorção no UV em 267 e 341 nm.

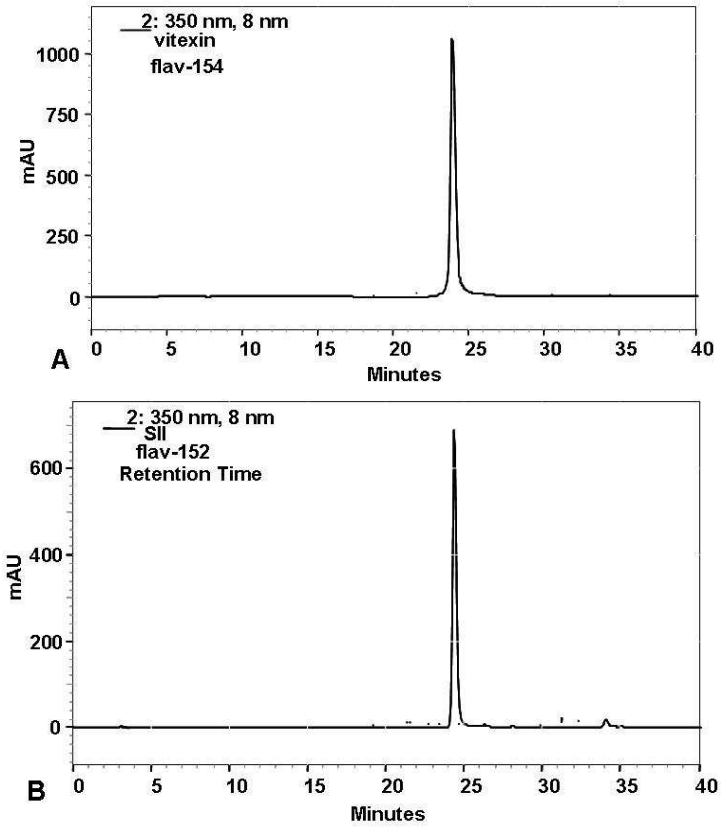


Figura 8. Cromatogramas obtido por CLAE em coluna Supelcosil™ LC18 (250 mm x 4,6 mm), sistema eluente em gradiente de MeOH/H_2O (0,1% ácido acético) 10% → 66% (32 min) e 10% (35 min) com fluxo de 1 mL/min e detecção no UV à 340 nm. (A) Cromatograma do padrão vitexina (Fluka®), (B) Cromatograma do composto isolado SII de *S. erecta*.

4.1.3. Caracterização Estrutural dos Compostos Isolados

- **Elucidação de SI**

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 9, Tabela 2) de SI apresentou sinais na região aromática, confirmando o esqueleto de um flavonóide com um dubleto em 7.67 ppm referentes aos hidrogênios em H2' e H6', e outro dubleto em 6,74 ppm referentes aos hidrogênios em H3'e H5', evidenciando que o anel B do núcleo flavonoídico é mono-oxigenado e para-di-substituído. Na caracterização do anel A, verifica-se um único singleto em 5,73 ppm referente ao H8. O singleto em 6,3 ppm caracteriza uma flavona pela presença de um singleto entre 6,30 e 7,00 referente ao hidrogênio olefínico H3. Em 4,5 ppm observa-se um dubleto pertencente a H1", referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar em ligação C-C com a flavona. Em 13,5 ppm há um singleto referente ao hidrogênio do grupo –OH na posição 5 da aglicona, quelado à carbonila em 4 (HARBORNE, 1996).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 10, Tabela 3) apresentou 19 sinais sendo que 6 sinais são referentes ao açúcar, que pôde ser identificado como a β-D-glicose, com deslocamentos químicos entre 60,3 ppm e 80,5 ppm. O sinal em 179,04 ppm refere-se à carbonila (C4) de uma flavona. O sinal em 100,45 ppm refere-se ao C3, enquanto que os sinais em 109,66 ppm (C6) e 96,37 (C8) mostram que a unidade β-glicosídica deve estar ligada à posição 6 do anel A (AGRAWAL, 1989; PENG et al., 2005).

O espectro de massa de SI revelou o pico do íon molecular em *m/z* 431 (Figura 11) e outros dois picos em *m/z* 311 e *m/z* 283 atribuído à cisão da ligação com a unidade glicosídica, e a perda de um hidrogênio em rearranjo (LI et al., 2009). A estrutura proposta para o composto SI é isovitexina ou apigenina-6-C-β-D-glicopiranosídeo (Figura 11).

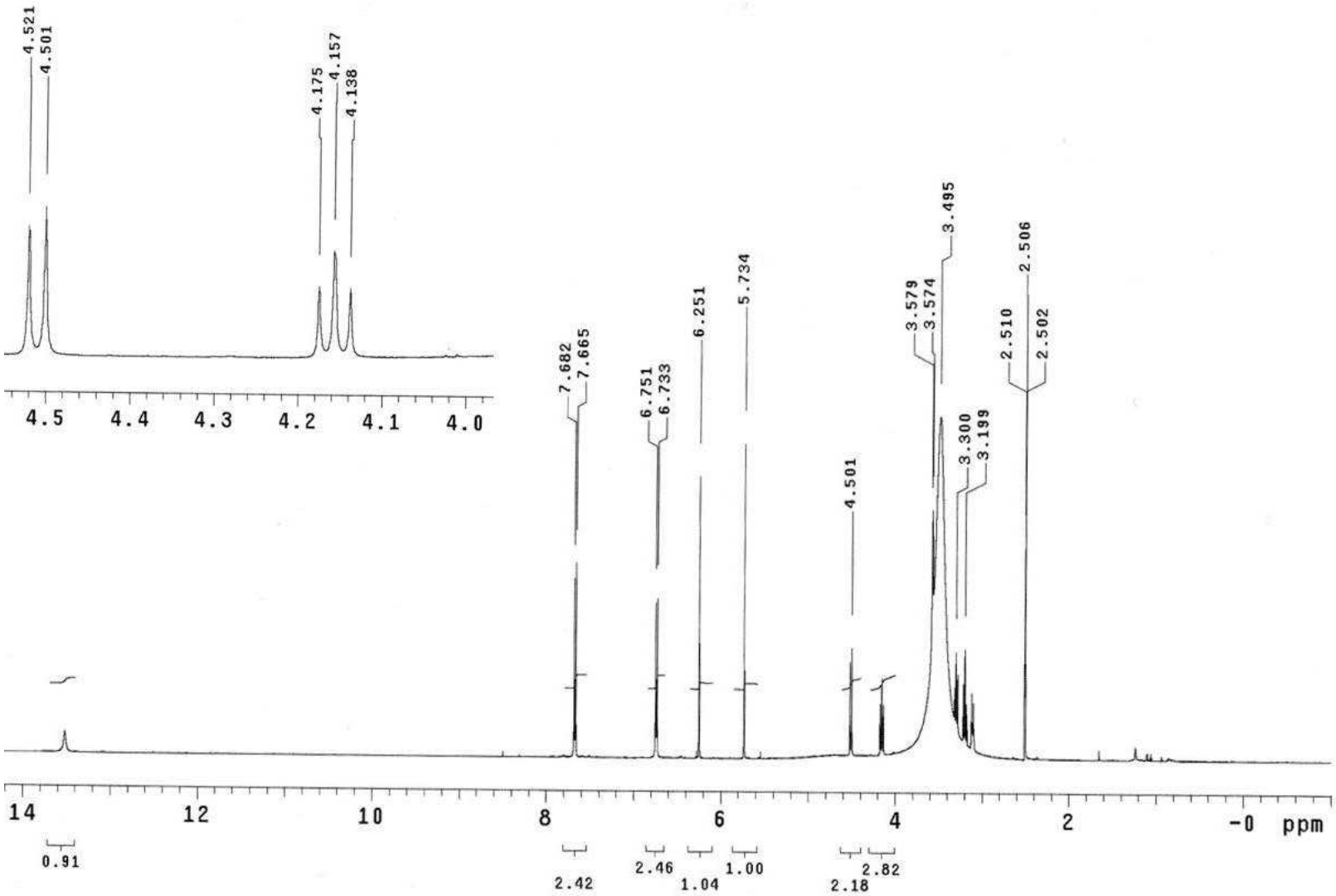


Figura 9. Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz para o flavonóide SI diluído em DMSO-d_6,

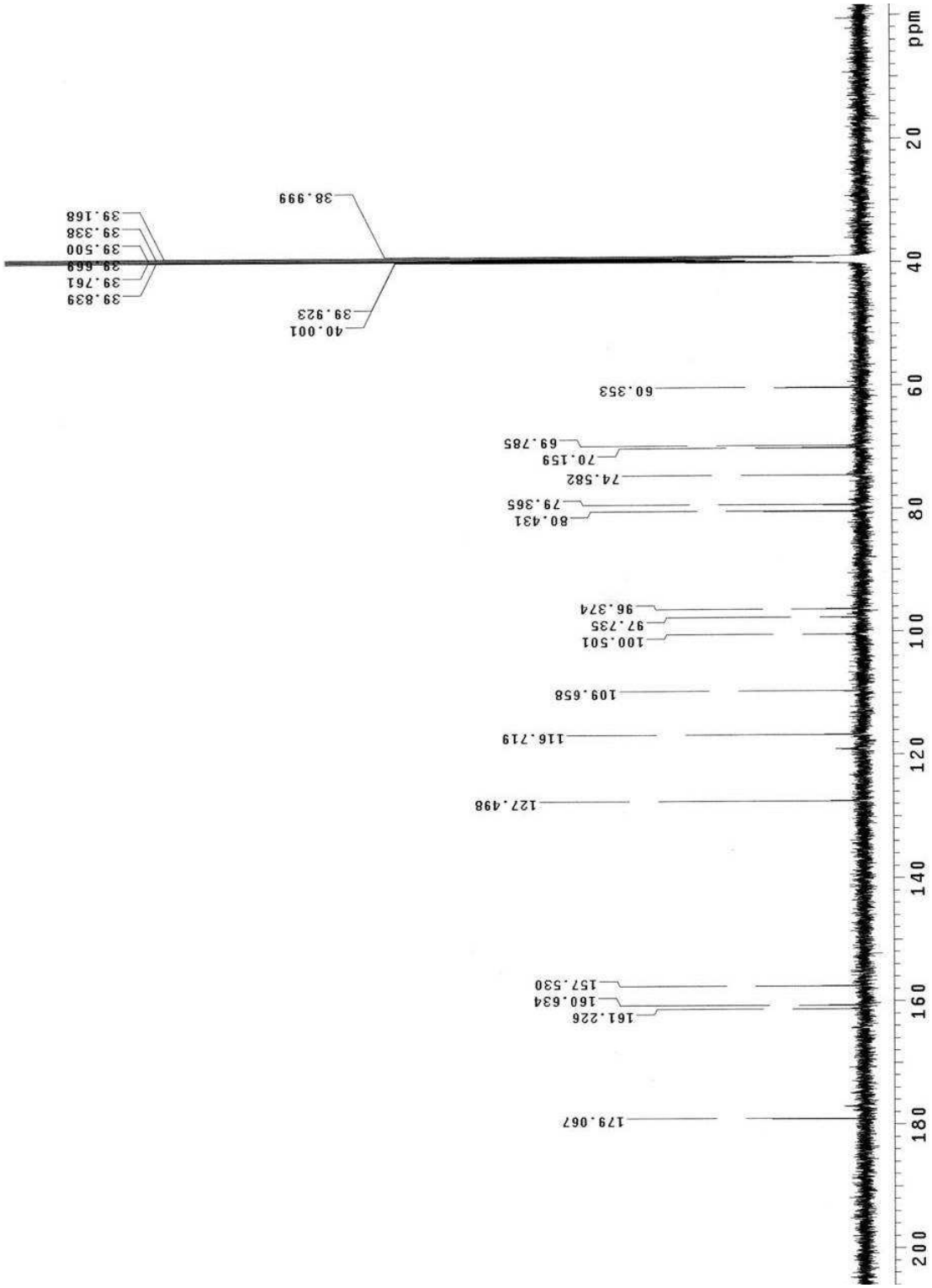


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz para o flavonóide SI diluído em DMSO-d_6,

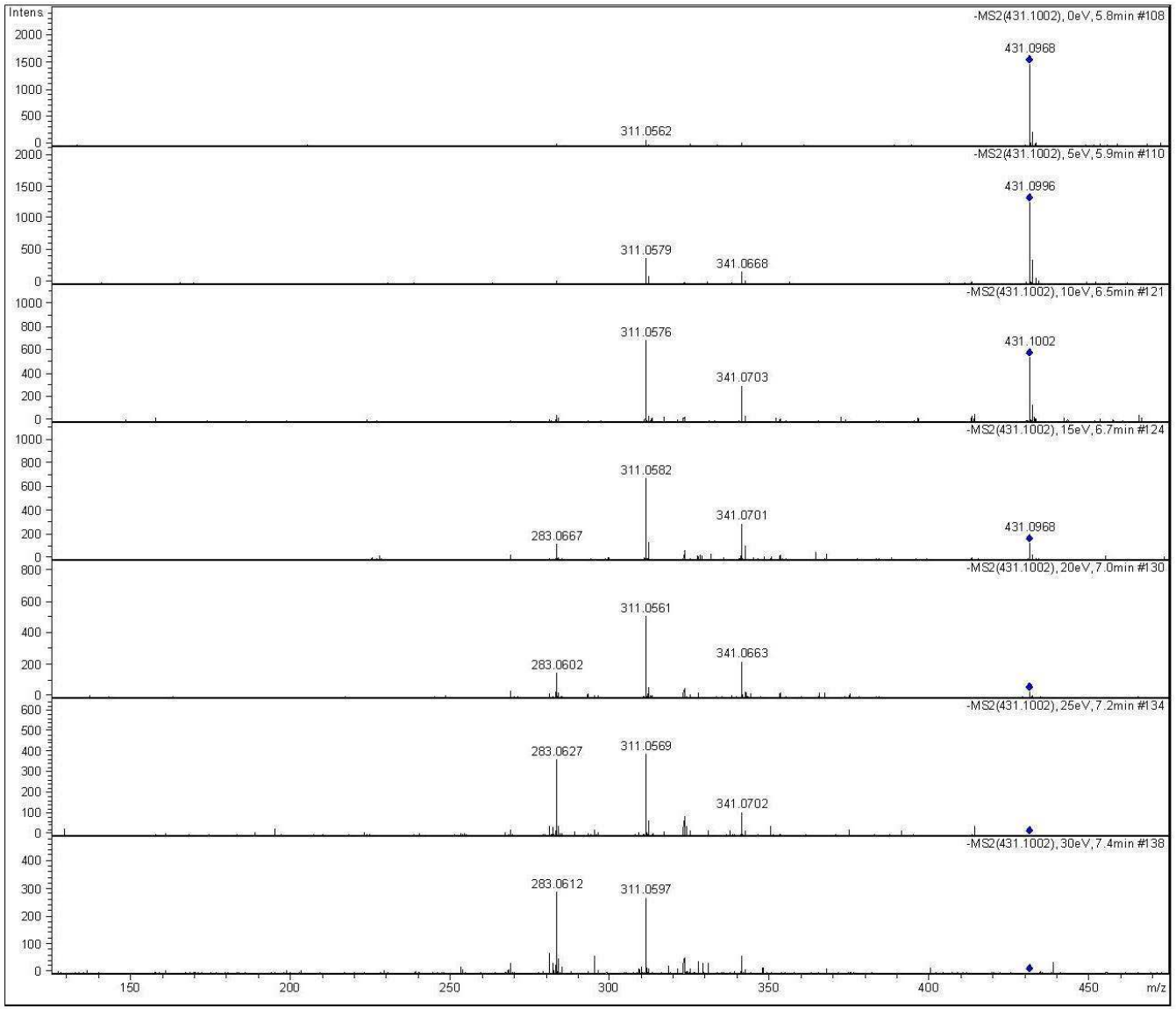


Figura 11. Perfil de fragmentação por ESI-MS em modo negativo de SI.

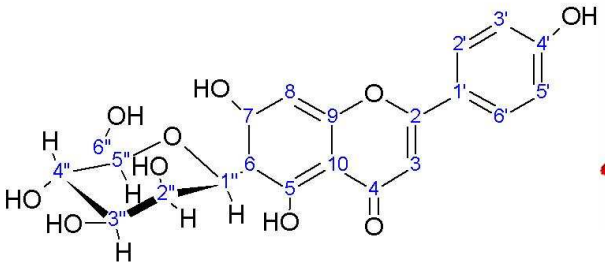


Figura 12. Estrutura química do composto SI (isovitexina) isolado de *S. erecta*.

- **Elucidação de SII**

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 13, Tabela 2) de SII apresentou sinais na região aromática, confirmando o esqueleto de um flavonóide com um dubleto em 7,8 ppm (*J* = 7,86 Hz) referentes aos hidrogênios em H2' e H6', e outro dubleto em 6,80 ppm referentes aos hidrogênios em H3'e H5', evidenciando que o anel B do núcleo flavonoídico é mono-oxigenado e para-di-substituído. Na caracterização do anel A, verifica-se um único singleto em 5,63 ppm referente ao H6. O singleto em 6,37 ppm caracteriza uma flavona pela presença de um singleto entre 6,30 e 7,00 referente ao hidrogênio olefínico H3. Em 13,03 ppm há um singleto referente ao hidrogênio do grupo –OH na posição 5 da aglicona, quelado à carbonila em 4. Em 4,71 ppm observa-se um dubleto pertencente a H1", referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar em ligação C-C com a flavona (HARBORNE, 1996).

O espectro de RMN de ^{13}C de SII apresentou poucos sinais, que podem ser apreciados na Tabela 3. Porém pelos dados coletados a partir da elucidação estrutural de SI em conjunto com os dados obtidos pelo espectro de RMN de ^{1}H de SII e pelo espectro de massa de SII, foi possível realizar sua elucidação estrutural. O espectro de massa de SII revelou o pico do íon molecular em *m/z* 431 (Figura 14) e outros dois picos em *m/z* 311 e *m/z* 283 atribuído à cisão da ligação com a unidade glicosídica, e a perda de um hidrogênio em rearranjo (LI et al., 2009). A estrutura proposta para o composto SII é vitexina ou apigenina-8-C-β-D-glicopiranosídeo (Figura 15).

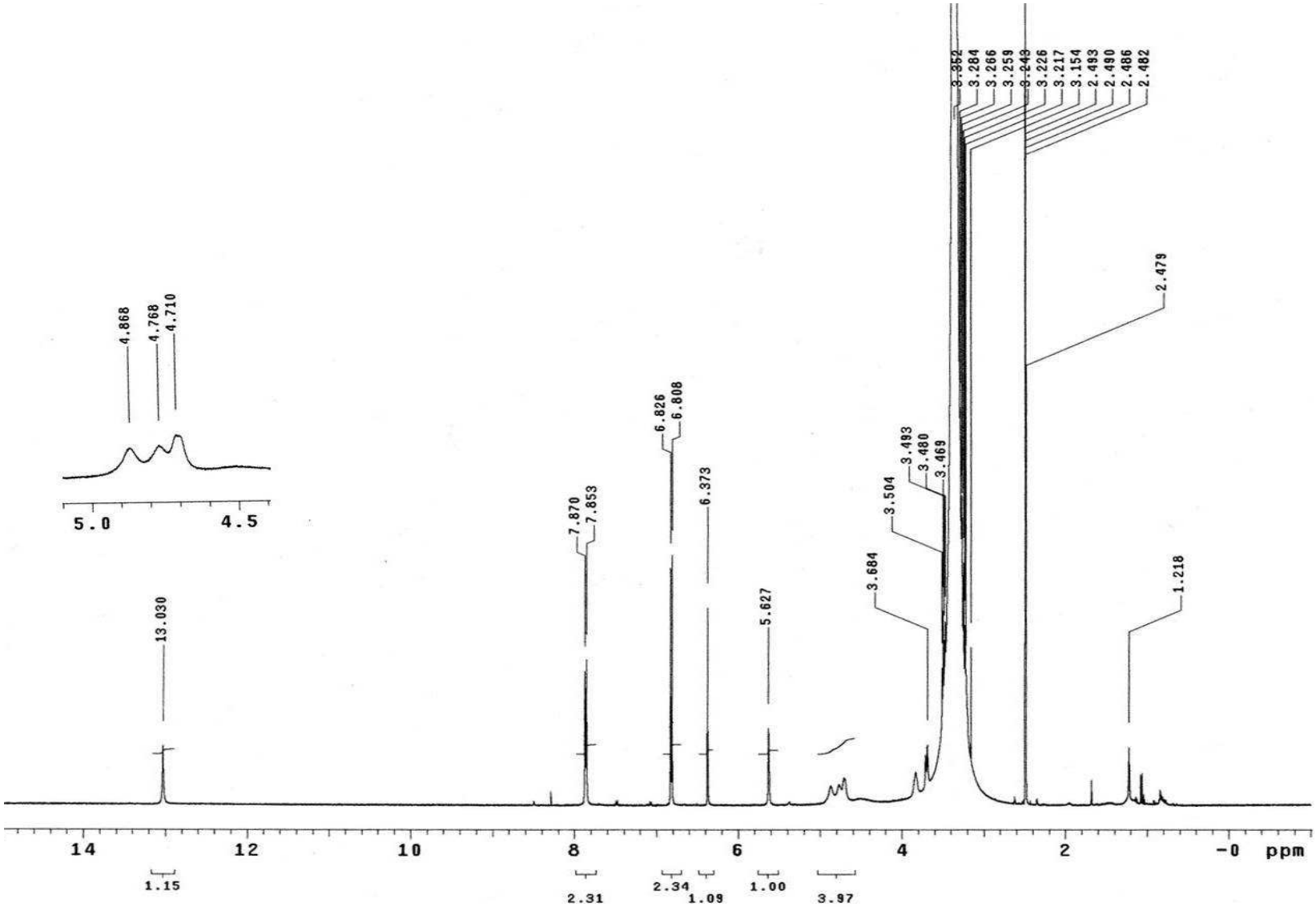


Figura 13. Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz para o flavonóide SII diluído em DMSO-d_6,

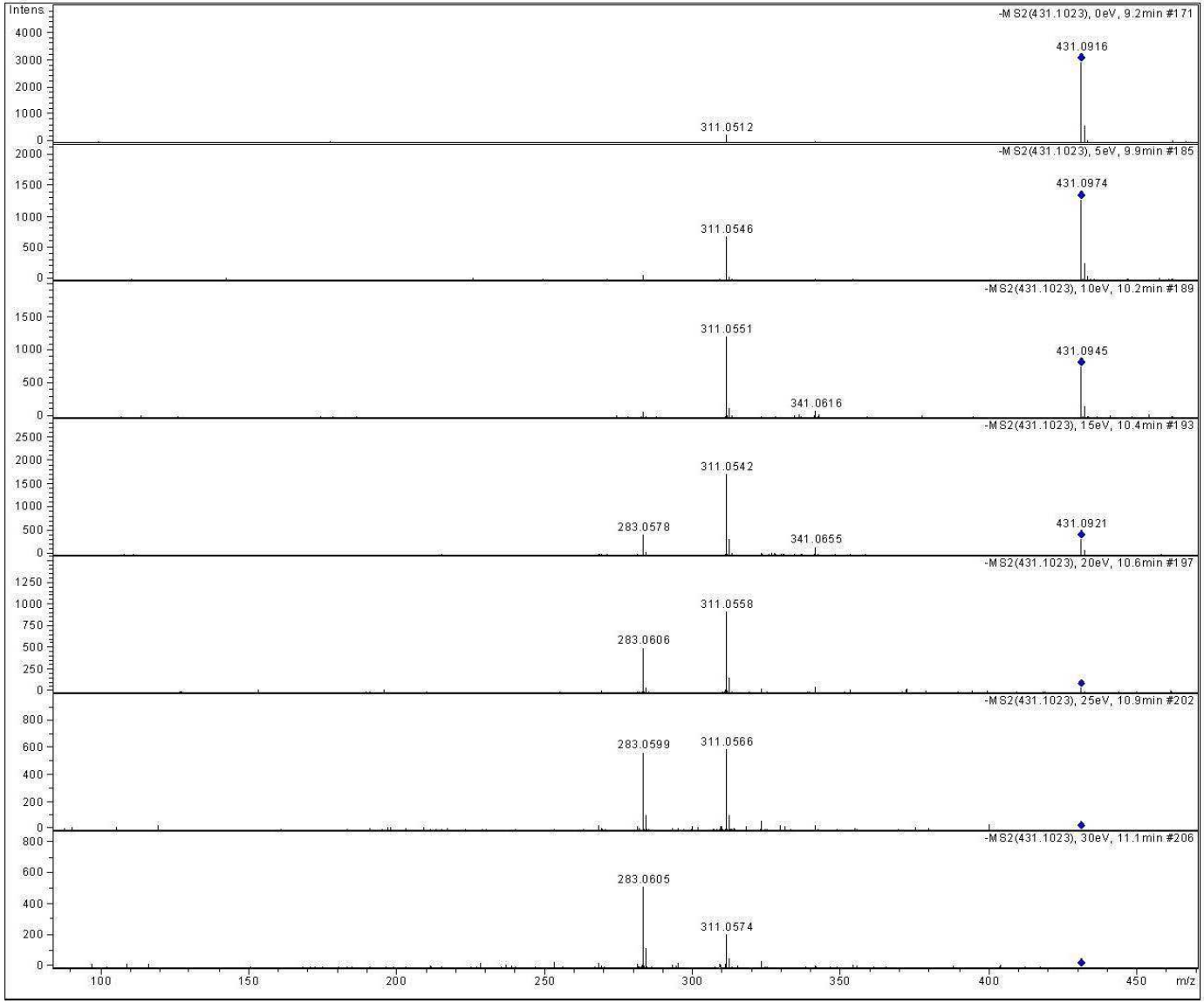


Figura 14. Perfil de fragmentação por ESI-MS em modo negativo de SII.

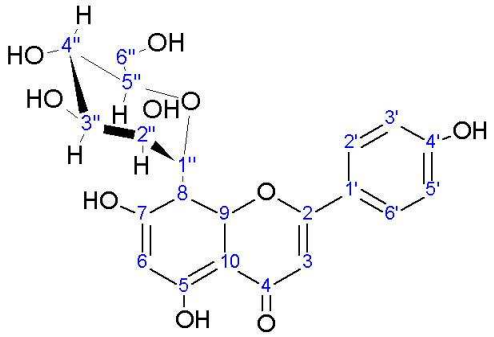


Figura 15. Estrutura química do composto SII (vitexina) isolado de *S. erecta*.

Tabela 2. Dados de RMN de ^{1}H para os flavonóides SI e SII (integral, multiplicidade, *J*), DMSO-d$_{6}$, 400 MHz.

H	Literatura isovitexina * (6-C-β-glicosídeo)	SI (isovitexina)	Literatura vitexina * (8-C-β-glicosídeo)	SII (vitexina)
3	6,77 (1H, *s*)	6,25 (1H, *s*)	6,76 (1H, *s*)	6,37(1H, *s*)
6	-	-	6,26 (1H, *s*)	5,63 (1H, *s*)
8	6,51 (1H, *s*)	5,73 (1H, *s*)	-	-
2’	7,91 (2H, *d*, 8,8)	7,67 (2H, *d*, 8,)	8,01 (2H, *d*, 8,7)	7,86 (2H, *d*, 8)
3’	6,91 (2H, *d*, 8,8)	6,74 (2H, *d*, 8)	6,87 (2H, *d*, 8,7)	6,82 (2H, *d*, 8)
4’	-	-	-	-
5’	6,91 (2H, *d*, 8,8)	6,74 (2H, *d*, 8)	6,87 (2H, *d*, 8,7)	6,82 (2H, *d*, 8)
6’	7,91 (2H, *d*, 8,8)	7,67 (2H, *d*, 8)	8,01 (2H, *d*, 8,7)	7,86 (2H, *d*, 8)
OH/5	13,12 (1H, *s*)	13,5 (1H, *s*)	13,15 (1H, *s*)	13,03 (1H, *s*)
1’’	4,57 (1H, *d*, 9,9)	4,50 (1H, *d*, 9)	4,67 (1H, *d*, 9,8)	4,71 (1H, *d*, 9)

*: KRAFCZYK e GLOMB, 2008; -: sinal não observado; δ: deslocamento químico (ppm); J: constante de acoplamento (Hz)

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C para os flavonóides SI e SII (δ em ppm, multiplicidade), DMSO-d_6, 100 MHz.

C	Literatura isovitexina * (6-C-β-glicosídeo)	SI (isovitexina)	Literatura vitexina * (8-C-β-glicosídeo)	SII (vitexina)
2	163,8 *s*	164,0	164,0 *s*	-
3	102,9 *d*	100,45	102,6 *d*	101,37
4	181,9 *s*	179,04	181,9 *s*	-
5	156,9 *s*	161,23	155,8 *s*	-
6	108,8 *s*	109,66	98,9 *d*	-
7	163,8 *s*	160,63	162,5 *s*	-
8	94,2 *d*	96,37	104,2 *s*	-
9	161,3 *s*	157,53	160,6 *s*	160,20
10	103,5 *s*	97,73	104,2 *s*	-
1’	121,2 *s*	119,0	121,8 *s*	-
2’	128,4 *d*	127,5	128,5 *d*	128,10
3’	116,3 *d*	116,72	116,0 *d*	115,74
4’	160,6 *s*	161,2	160,9 *s*	-
5’	116,3 *d*	116,72	116,0 *d*	115,74
6’	128,4 *d*	127,5	128,5 *d*	128,10
1’’	79 *d*	79,36	78.8 *d*	-
2’’	73,4 *d*	74,58	73.9 *d*	-
3’’	70,7 *d*	69,78	71,4 *d*	79,13
4’’	70,7 *d*	70,16	70,8 *d*	-
5’’	81,3 *d*	80,43	81,9 *d*	81,43
6’’	61,6 *t*	60,35	61,5 *t*	-

*: KRAFCZYK e GLOMB, 2008; -: sinal não observado; δ: deslocamento químico

4.2. Atividades Enzimáticas, Tóxicas e Farmacológicas

Os extratos e as frações apresentaram atividade inibitória sobre as peçonhas brutas de *B. jararacussu* (Figura 16A) e *C. d. terrificus* (Figura 17A), além das toxinas isoladas BthTX-II (Figura 16B) e crotoxina (Figura 17B). Além destes testes, também foram realizados testes com os compostos isolados SI (isovitexina) e SII (vitexina), nos quais foram avaliados a inibição da ação fosfolipásica da peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-II (Figura 16C), bem como da peçonha de *C. d. terrificus* e crotoxina (Figura 17C).

Para avaliar a inibição da ação fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni* na presença do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e de suas frações, foi feito uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 18), na qual foi observada uma proteção das cadeias do fibrinogênio em maior proporção pelo extrato metanólico e pela fração SF3. O mesmo ensaio foi realizado com a peçonha de *B. jararacussu*, no qual foi avaliado o efeito inibitório dos extratos metanólicos de *S. erecta* (*in natura* e calos), das frações e dos compostos isolados (Figura 19).

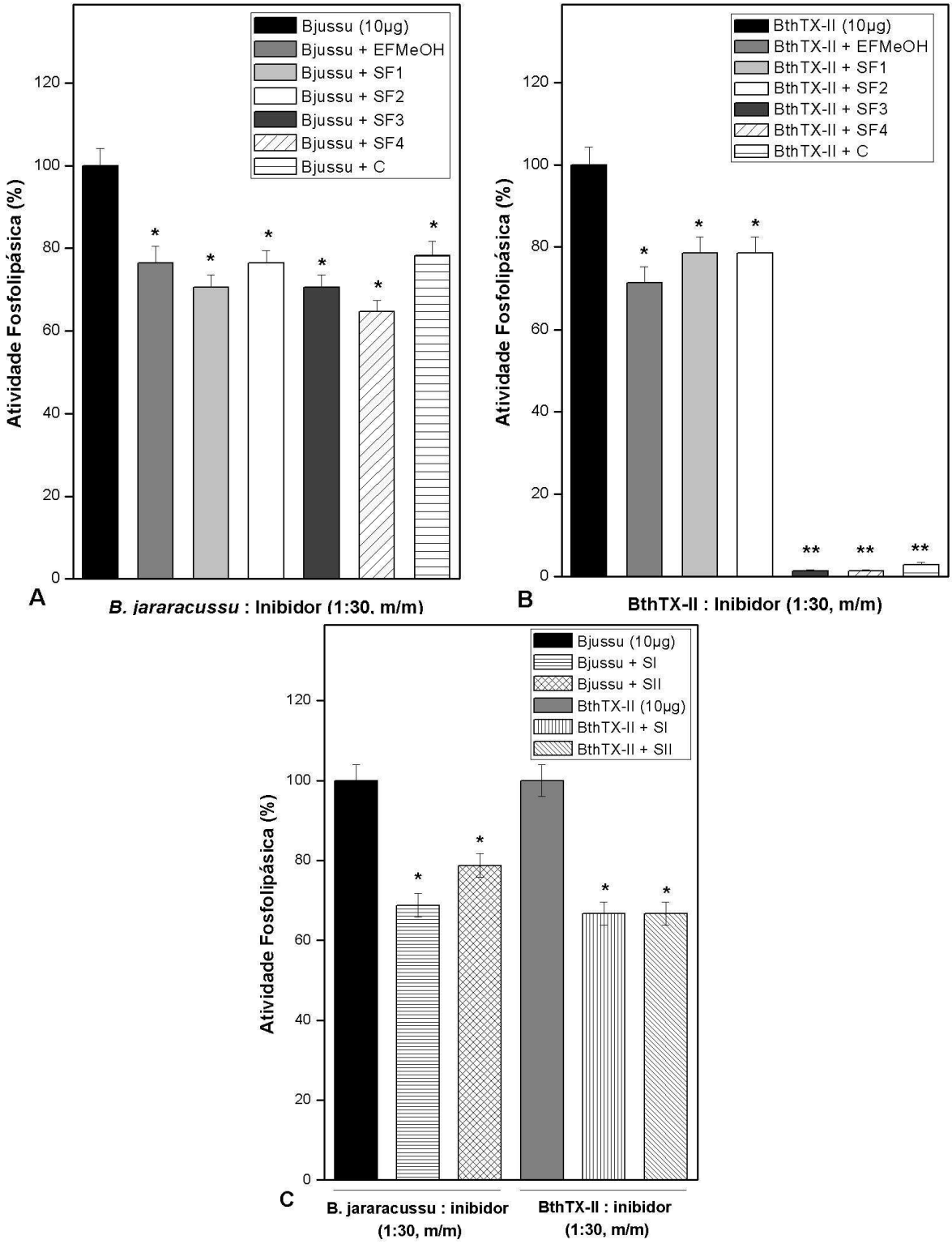


Figura 16. Inibição da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-II. (A) Efeito dos inibidores sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* (10 µg), (B) Efeito dos inibidores sobre a atividade fosfolipásica induzida pela BthTX-II (10 µg), (C) Efeito das flavonas SI e SII sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-II. Cada experimento foi expresso pela média ± desvio padrão (n=3). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando comparados com o controle.

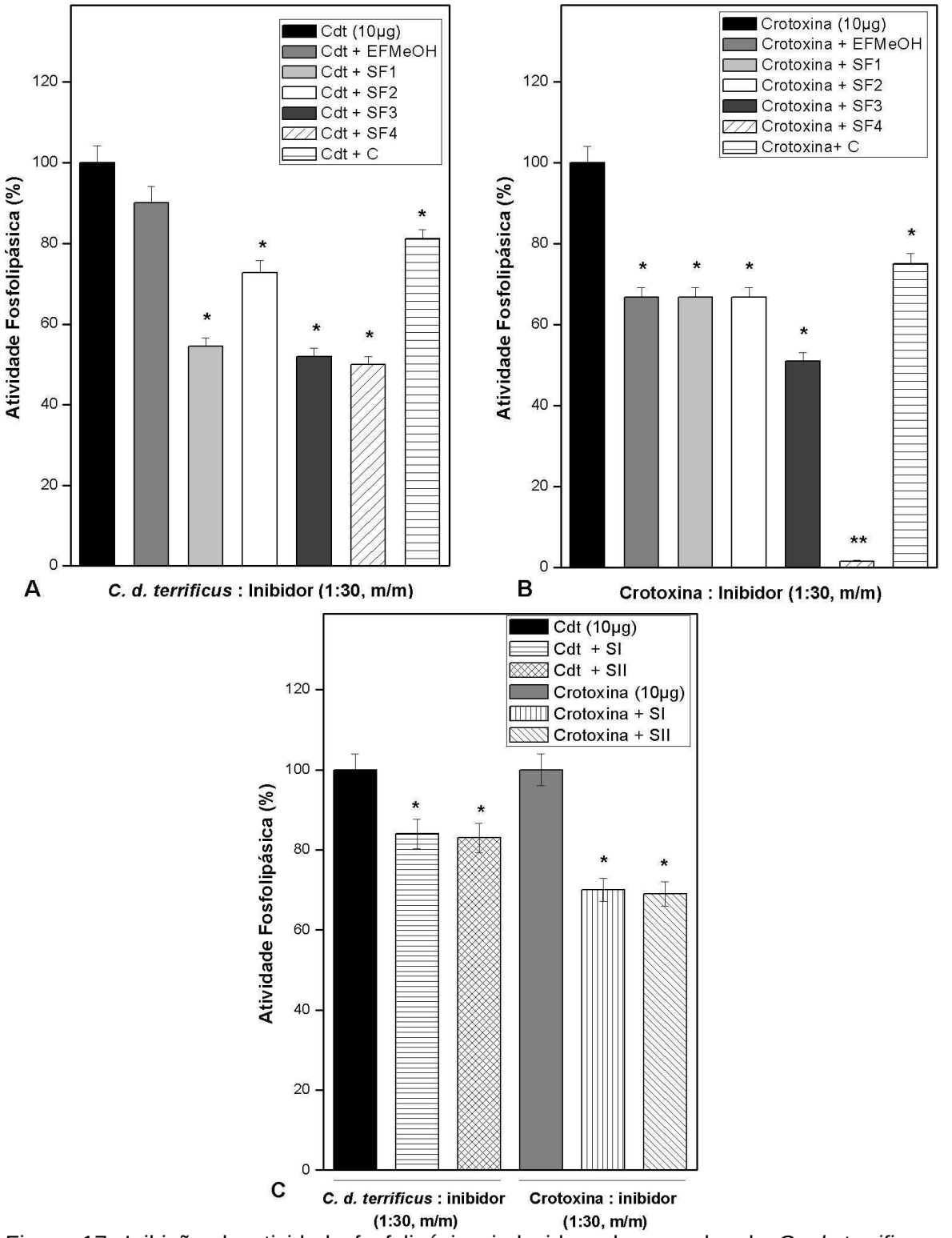


Figura 17. Inibição da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *C. d .terrificus* e crotoxina. (A) Efeito dos inibidores sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *C. d. terrificus* (10 µg), (B) Efeito dos inibidores sobre a atividade fosfolipásica induzida pela crotoxina (10 µg), (C) Efeito das flavonas SI e SII sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *C. d. terrificus* e crotoxina. Cada experimento foi expresso pela média ± desvio padrão (n=3). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando comparados com o controle.

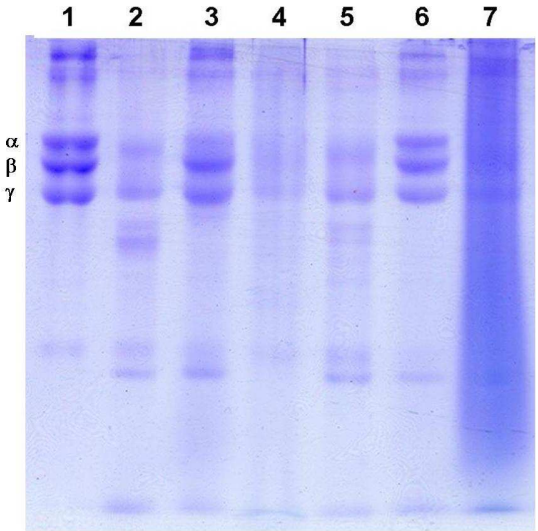


Figura 18. Inibição da atividade fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni*. SDS-PAGE da atividade proteolítica da peçonha de *B. moojeni* (10 µg) sobre 40 µg fibrinogênio (fibri) e o efeito do extrato e das frações, previamente incubados na proporção 1:30 (m/m) por 30 min a 37ºC. 1- Fibri, 2- Bmooje + fibri, 3- Bmooje + fibri + EFMeOH, 4- Bmooje + fibri + SF1, 5- Bmooje + fibri + SF2, 6- Bmooje + fibri + SF3, 7- Bmooje + fibri + SF4.

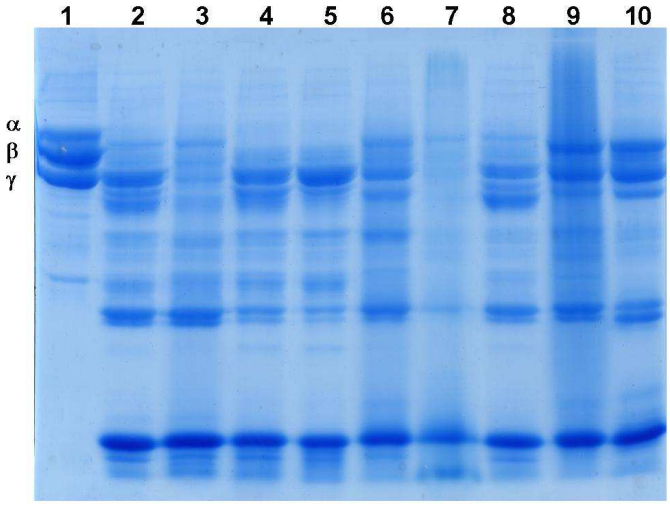


Figura 19. Inibição da atividade fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *B. jararacussu*. SDS-PAGE da atividade proteolítica da peçonha de *B. jararacussu* (10 µg) sobre 40 µg fibrinogênio (fibri) e o efeito dos extratos, das frações e dos compostos isolados, previamente incubados na proporção 1:30 (m/m) por 30 min a 37ºC. 1- Fibri, 2- Bjussu + fibri, 3- Bjussu + fibri + SF3, 4- Bjussu + fibri + SI, 5- Bjussu + fibri + SII, 6- Bjussu + fibri + EFMeOH, 7- Bjussu + fibri + SF1, 8- Bjussu + fibri + SF2, 9- Bjussu + fibri + SF4, 10- Bjussu + fibri + C.

O extrato metanólico de *S. erecta* e suas frações foram capazes de retardar o tempo de coagulação de plasma citratado após a adição da peçonha com o inibidor na proporção 1:30 (m/m), no entanto frações SF3 e SF4 foram consideravelmente mais eficientes na inibição da atividade coagulante da peçonha de *B. jararacussu* (Tabela 4), bem como a flavona vitexina (SII), composto isolado da fração SF3.

No ensaio da atividade edematogênica todos os extratos testados demonstraram capacidade inibitória sobre o edema induzido pela toxina BthTX-I (Figura 20A) durante o intervalo de tempo monitorado. Os compostos isolados, SI e SII, também demonstraram capacidade inibitória sobre a atividade edematogênica induzida pela BthTX-I (Figura 20B).

As atividades hemorrágicas das peçonhas de *B. jararacussu* (Figura 21A) e *B. neuwiedi* (Figura 21B) foram inibidas pela ação do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e de suas frações. Os resultados obtidos sugerem a presença de compostos capazes de inibir a atividade de proteínas hemorrágicas presentes nestas peçonhas.

Tabela 4. Inibição da atividade coagulante da peçonha de *B. jararacussu* (20 µg) pelo estrato metanólico de *S. erecta*, frações e compostos isolados.

Amostras	Tempo de coagulação (min)[#]	Amostras	Tempo de coagulação (min)[#]
B. jararacussu	1min 20s ± 0.03	PBS + Ca^{+2}	5min 15s ± 0.03
B. jararacussu + EFMeOH	1min 30s ± 0.02	EFMeOH	2min 43s ± 0.04
B. jararacussu + SF1	1min 50s ± 0.03*	SF1	1min 42s ± 0.02
B. jararacussu + SF2	1min 36s ± 0.03	SF2	2min 30s ± 0.02
B. jararacussu + SF3	>50min**	SF3	>50min
B. jararacussu + SF4	>50min**	SF4	>50min
B. jararacussu + C	1min 27s ± 0.03	C	2min 33s ± 0.03
B. jararacussu + SI	1min 31s ± 0.02	SI	5min 17s ± 0.04
B. jararacussu + SII	>50min	SII	>50min

[#]Todos os experimentos foram expressos pela média ± desvio padrão (n = 3). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando comparados com o controle.

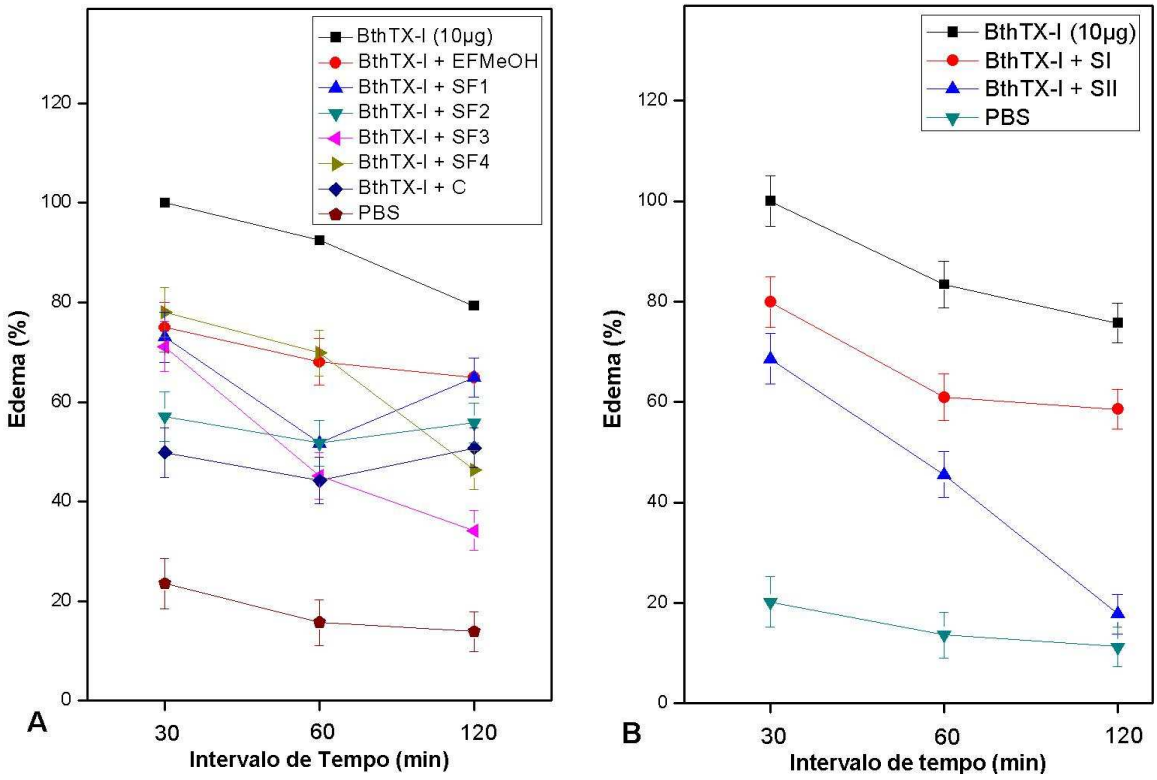


Figura 20. Atividade edematogênica induzida por BthTX-I (10 µg) e o efeito dos extratos, das frações e dos compostos isolados, previamente incubados na proporção 1:30 (m/m) por 30 min a 37ºC. (A) Efeito dos extratos e das frações, (B) Efeito dos compostos isolados. Cada experimento foi expresso pela média ± desvio padrão (n=5).

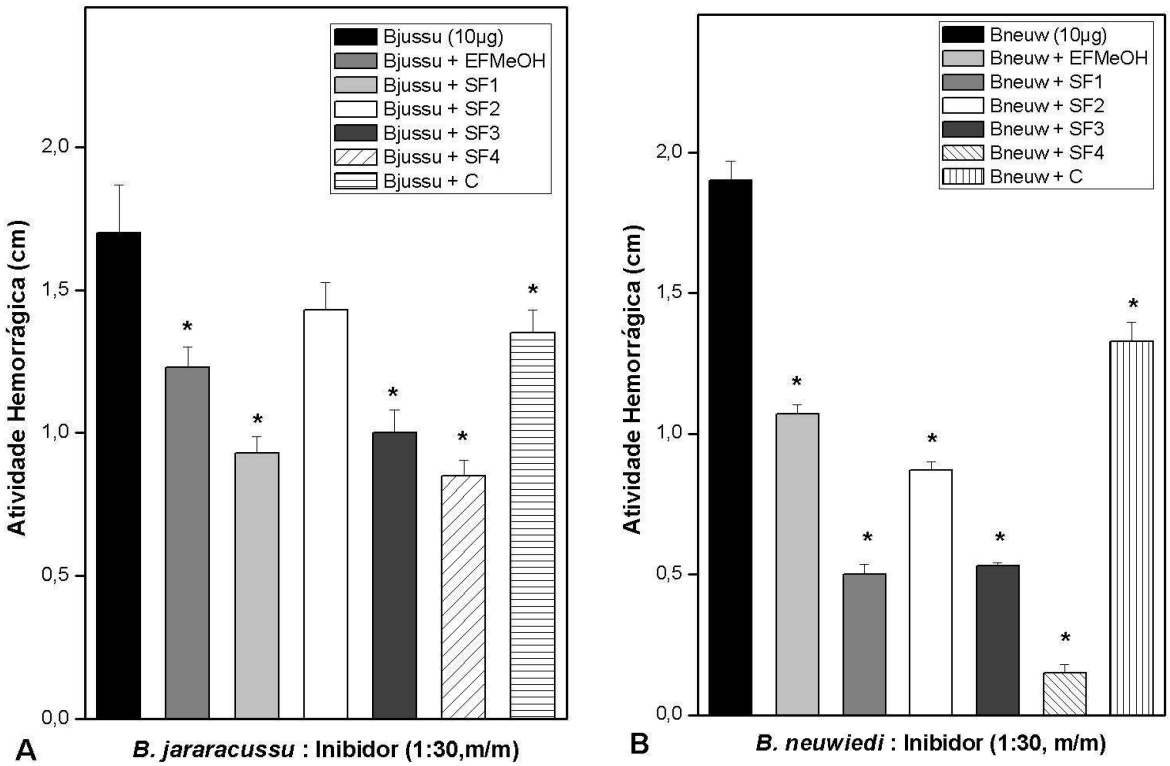


Figura 21. Inibição da atividade hemorrágica induzida por peçonhas de serpentes e o efeito dos extratos e das frações, previamente incubados na proporção 1:30 (m/m) por 30 min a 37ºC. (A) Efeito dos inibidores sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* (10 µg), (B) Efeito dos inibidores sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. neuwiedi* (10 µg). Cada experimento foi expresso pela média ± desvio padrão (n=5). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando comparados com o controle.

A atividade miotóxica induzida pela ação da peçonha de *B. jararacussu* (Figura 22A) e pela BthTX-I (Figura 22B) foi inibida pela ação dos extratos de *S. erecta* e das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico. Os compostos isolados, SI e SII, também demonstraram capacidade inibitória sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha e pela toxina (Figura 22C). As frações puras foram administradas nos animais e as dosagens de CK resultaram em níveis baixos.

Além do ensaio realizado com incubação prévia, foi realizado para esta atividade o ensaio sem incubação prévia e com injeção de inibidor 10 minutos após a injeção i.m. da toxina (Figura 23).

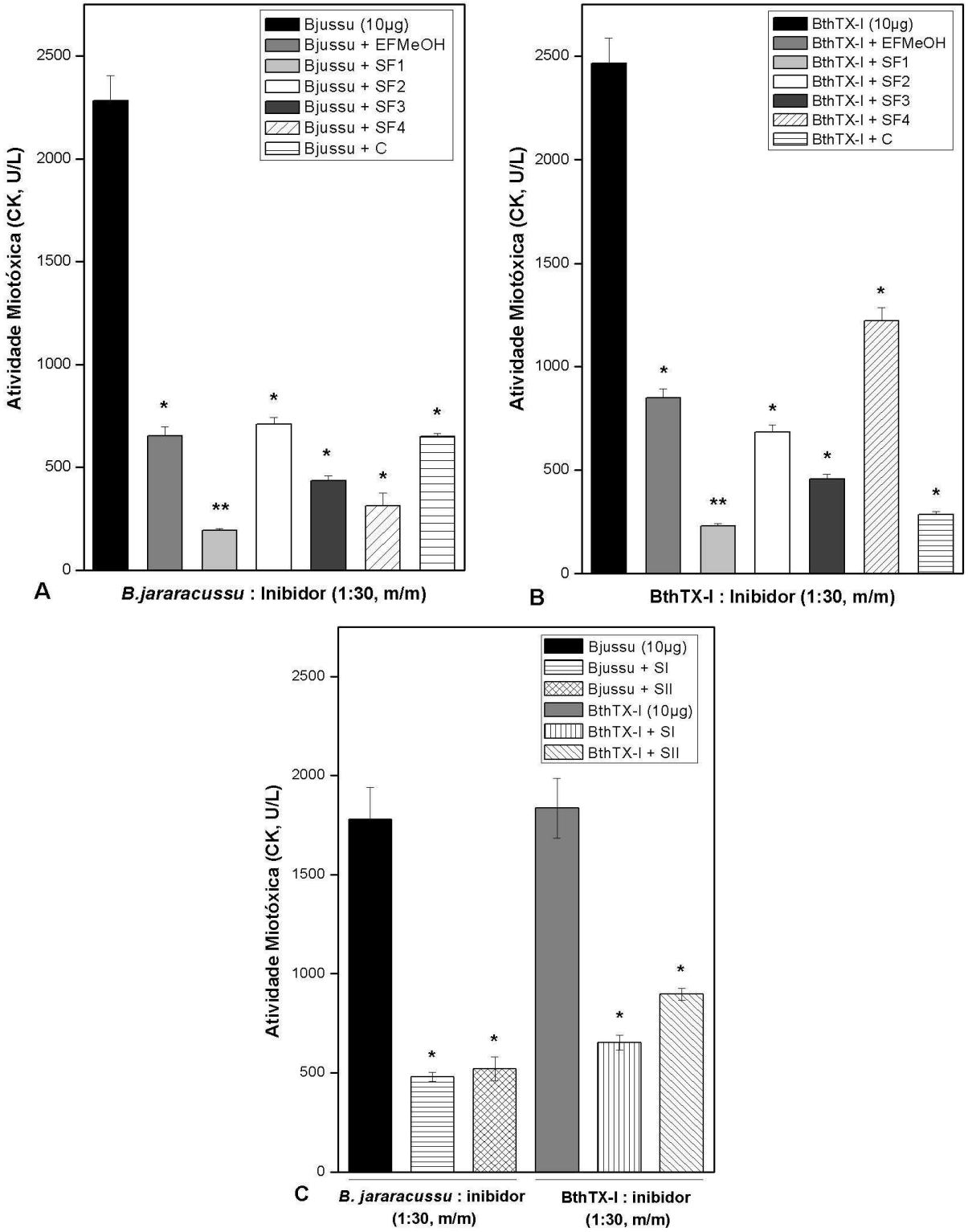


Figura 22. Inibição da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e a BthTX-I. (A) Efeito dos inibidores sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* (10 µg), (B) Efeito dos inibidores sobre a atividade miotóxica induzida pela BthTX-I (10 µg), (C) Efeito dos compostos isolados sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e BthTX-I. Cada experimento foi expresso pela média ± desvio padrão (n=5). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando comparados com o controle.

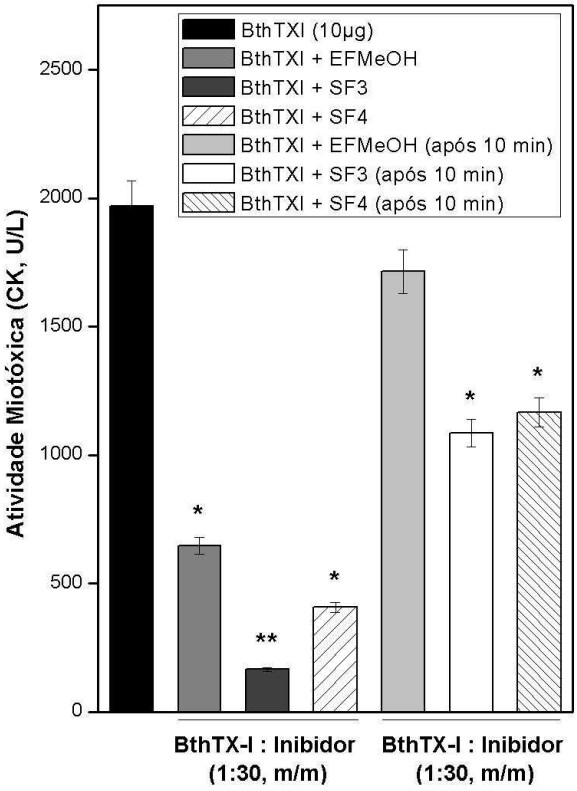


Figura 23. Efeito dos inibidores sobre a atividade miotóxica induzida pela BthTX-I (10 µg) na proporção 1:30 (m/m) sem incubação prévia e pós-envenenamento (após 10 minutos). Cada experimento foi expresso pela média ± desvio padrão (n=5). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando comparados com o controle.

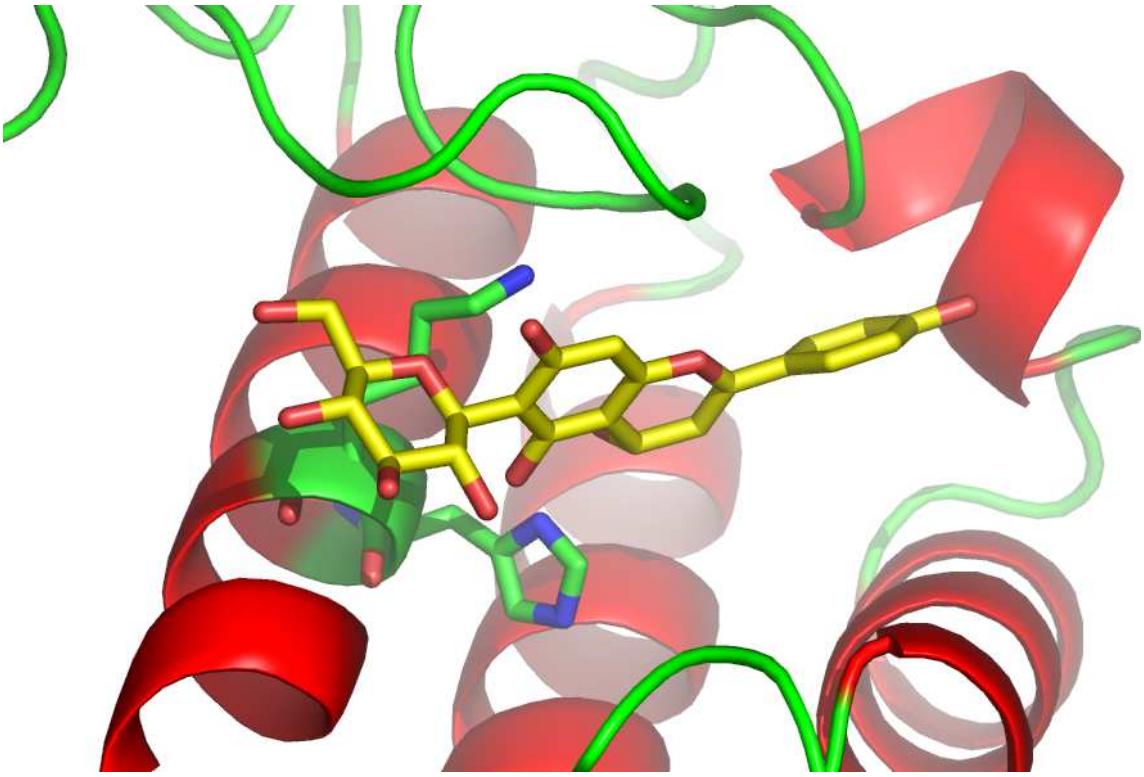
4.3. Estudos de Interação Molecular entre Inibidores e Miotoxinas

Os modelos moleculares dos complexos formados entre a miotoxina BthTX-I monomérica com os inibidores (SI e SII) foram avaliados usando o programa GOLD. Os inibidores foram modelados dentro do sítio ativo da toxina e foram observadas algumas possíveis interações entre os resíduos His48 e Lys49. O complexo formado entre SI e BthTX-I apresentou um *Goldscore* de 47,84. Enquanto que o complexo formado entre SII e BthTX-I apresentou um *Goldscore* 49,51.

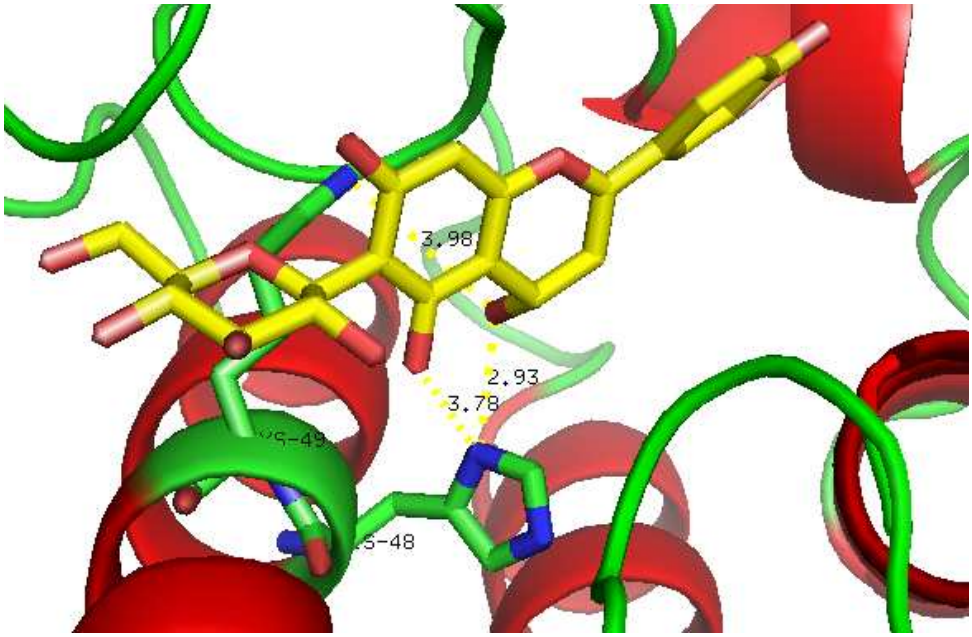
No caso do inibidor SI, a His48 pode interagir com a carbonila com uma distância de 2,93 Å ou com OH-5 com uma distância de 3,78 Å, e o resíduo Lys49 pode interagir com a carbonila com uma distância de 3,98 Å (Figura 24).

Entre as possíveis interações entre o inibidor SII e a toxina destacaram-se a interação da His48 com OH-7 com uma distância de 3,52 Å ou da Lys49 com OH-7 com uma distância de 2,84 Å (Figura 25).

Possíveis mudanças na estrutura secundária das miotoxinas foram avaliadas a partir dos espectros obtidos por CD e a comparação destes com o complexo formado entre a toxina alvo e o inibidor. O resultado dos complexos formados entre SI-BthTX-I e SII-BthTX-I (Figura 26A), não revelam mudanças significativas na estrutura secundária desta toxina. O mesmo pode ser observado na avaliação dos espectros obtidos por CD dos complexos formados entre SI-BthTX-II e SII- BthTX-II (Figura 26B).

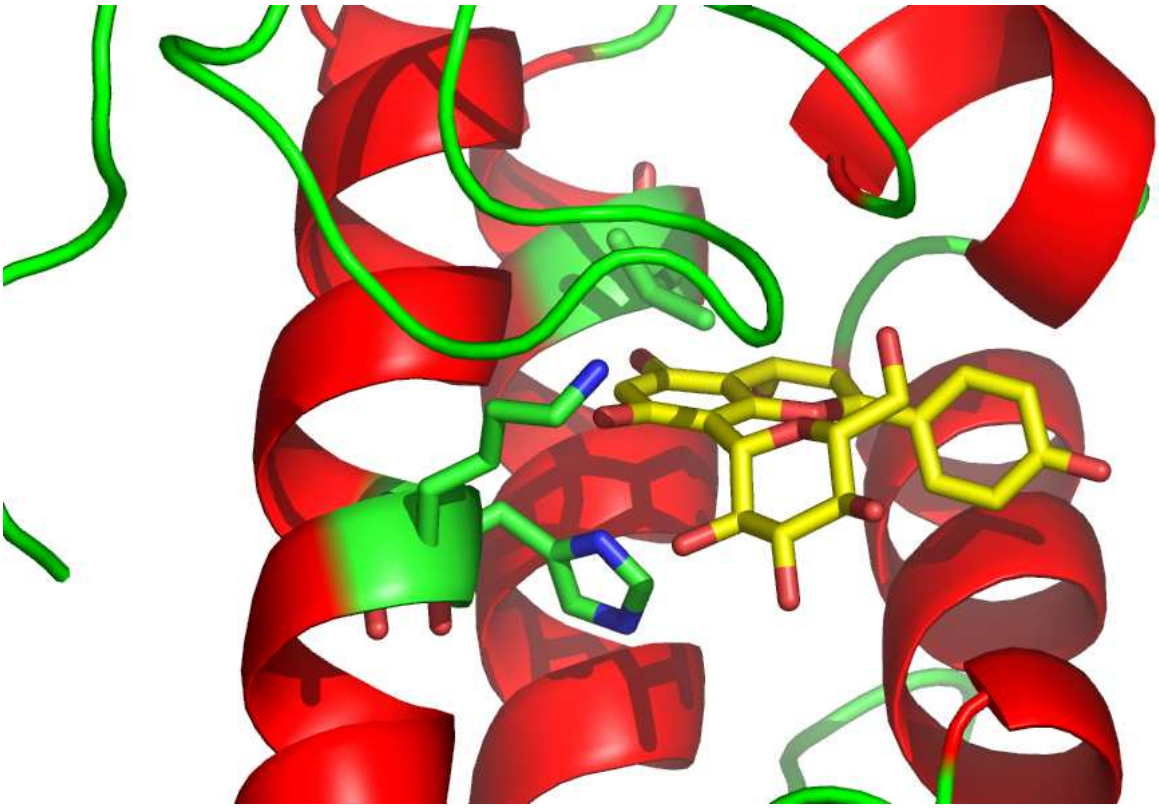


A

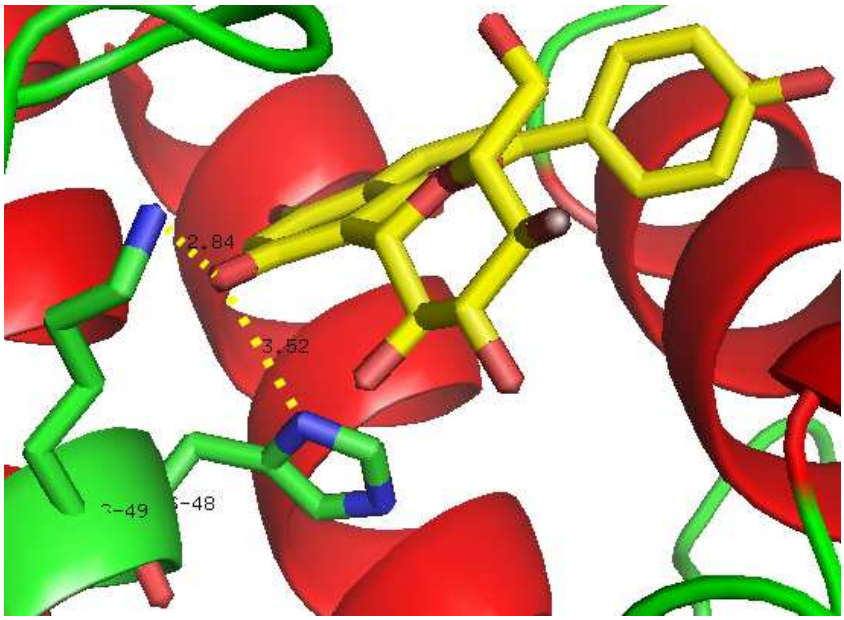


B

Figura 24. Diagrama de Ribbons da interação entre BthTX-I e isovitexina (SI). (A) Melhor solução de “docking” fornecida pelo programa Gold, (B) Distância (em Å) das interações formadas entre os resíduos presentes no sítio ativo (His48 e Lys-49) e o inibidor.



A



B

Figura 25. Diagrama de Ribbons da interação entre BthTX-I e vitexina (SII). (A) Melhor solução de “docking” fornecida pelo programa Gold, (B) Distância (em Å) das interações formadas entre os resíduos presentes no sítio ativo (His48 e Lys-49) e o inibidor.

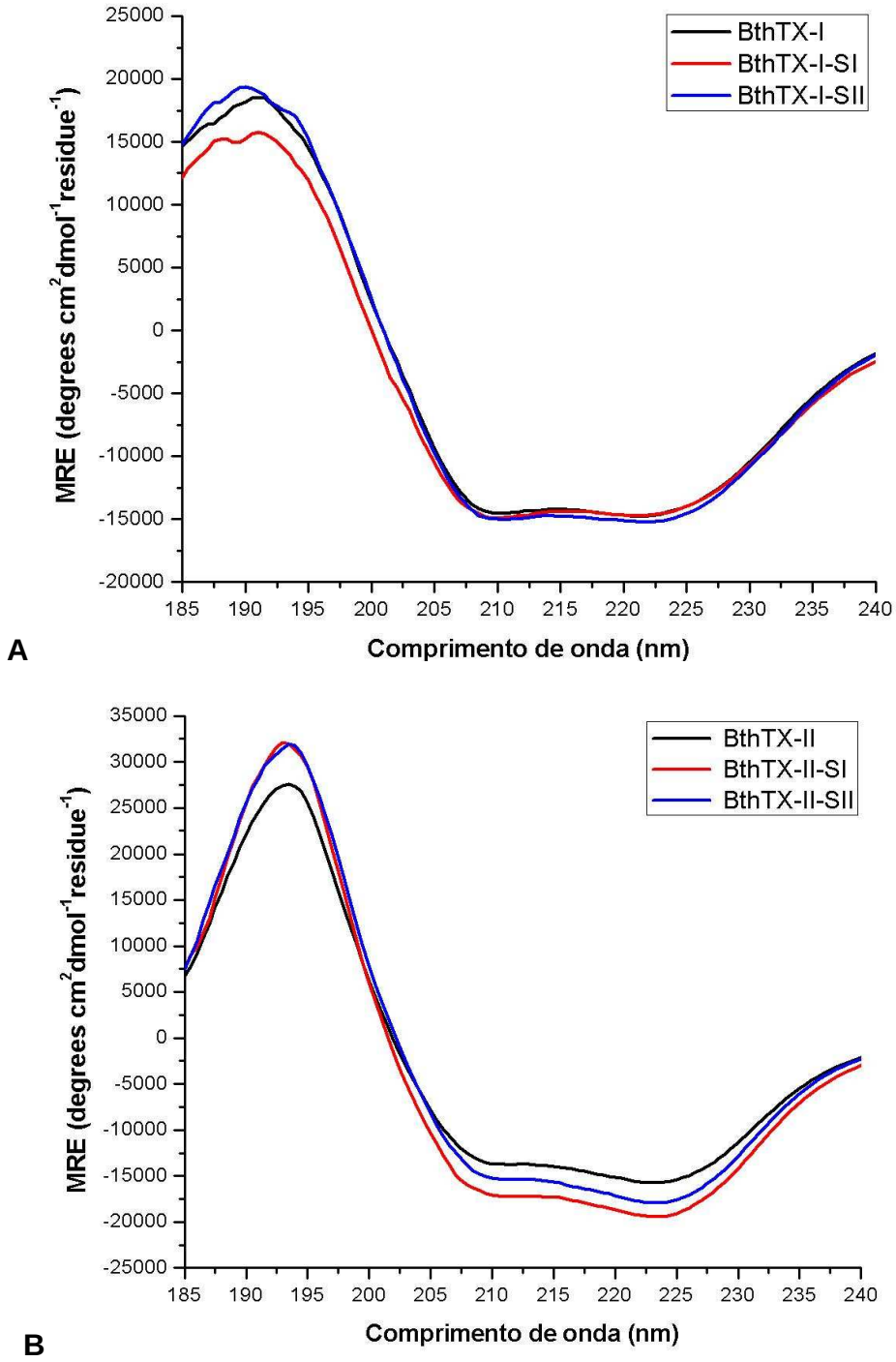


Figura 26. Análise dos espectros de dicroísmo circular das BthTX-I e II na presença dos inibidores SI e SII isolados de *S. erecta*. (A) Espectro de dicroísmo circular da BthTX-I sozinha (linha preta) e espectros dos complexos formados entre BthTX-I e os inibidores SI (linha vermelha) e SII (linha azul). (B) Espectro de dicroísmo circular da BthTX-II (linha preta) sozinha e espectros dos complexos formados entre BthTX-II e os inibidores SI (linha vermelha) e SII (linha azul). Os resultados analisados entre 185 e 240 nm.

5. DISCUSSÃO

O único tratamento validado cientificamente para o envenenamento causado pela picada das serpentes é a soroterapia. Contudo, este tratamento apresenta algumas limitações, como a ineficiência na proteção contra o dano tecidual local causado pelos efeitos deste envenenamento. Portanto, a busca continua e a identificação de novos compostos que podem ser úteis como tratamento alternativo ou complementar a soroterapia antiofídica é uma tarefa de grande importância. Desde a antiguidade, numerosas espécies de plantas são usadas pela medicina popular para tratar os efeitos das picadas das serpentes. No entanto, ainda há a necessidade de estudos que comprovem tanto sua eficácia, como novos usos para as propriedades medicinais destas plantas. É importante destacar que a maioria dos estudos que avaliam a característica antiofídica de algumas plantas medicinais não apresenta a identidade do composto ou dos compostos responsáveis por esta ação, na maioria das vezes os estudos apenas esclarecem a classe de metabólito secundário presente no extrato da planta que pode ser responsável por uma determinada ação farmacológica. Nos últimos anos alguns estudos foram realizados com este enfoque, como por exemplo, os estudos realizados com: *Mouriri pusa*, *Byrsonima crassa*, *Davilla elliptica*, *Strychnos pseudoquina* (NISHIJIMA et al, 2009), *Mikania glomerata* (FLORIANO et al., 2009), *Hibiscus aethiopicus* (HASSON et al., 2010) and *Camellia sinensis* (PITHAYANUKUL et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato metanólico das folhas de *S. erecta*, bem como de suas frações, dos compostos isolados e da cultura de calos, sobre os efeitos farmacológicos e enzimáticos induzidos pelas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*.

5.1. Análise Fitoquímica

A família Sapindaceae está amplamente distribuída nas regiões tropicais do mundo e algumas espécies são encontradas no Brasil, como por exemplo a planta medicinal *Serjania erecta*, comumente chamada como "retrato de teiú", "cinco-folhas"

ou "cipó-cinco-folhas" . O uso popular de *Serjania erecta* no Brasil está relacionado com o tratamento de doenças inflamatórias e ulcerativas. Em alguns estudos recentes foram comprovadas sua ação gastroprotetora e como antinflamatório de uso tópico. Nestes estudos foram confirmadas as presenças de metabólitos secundários de interesse farmacológico, como saponinas, flavonóides e taninos.

A maior parte das espécies de plantas é capaz de biossintetizar e acumular substâncias orgânicas com atividade biológica, as quais têm despertado crescentes interesses, principalmente as de aplicação farmacêutica. As dificuldades para assegurar a produção constante desses metabólitos secundários pelas plantas têm estimulado a investigação do potencial da cultura de tecidos e células *in vitro*, como uma solução alternativa, uma vez que na natureza as plantas são submetidas a variações nutricionais e climáticas, além da infestação por pragas (TORRES; CALDAS, 1990; 1999). O uso de culturas de células vegetais capazes de produzir compostos idênticos ou similares àqueles presentes na planta é uma alternativa viável frente à ação predatória do homem e tem como um dos objetivos a preservação da biodiversidade, uma vez que não é necessário se dispor da planta para a extração de princípios ativos de interesse. A cultura de calos tem permitido o estabelecimento *in vitro* de espécies vegetais de interesse, consequentemente, proporcionando a propagação em larga escala de diversas espécies (LUCZKIEWICZ; GLOD, 2003).

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. Tem sido sugerido que as auxinas são necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, que expressam a totipotência das células competentes e as citocininas estimulam a divisão celular e regulam o crescimento exagerado. Neste trabalho foi realizada a manutenção dos calos originados de segmentos foliares da espécie vegetal *S. erecta* com o auxílio de 2,4-D e cinetina. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma auxina sintética mais comumente utilizada para a indução de calos. Enquanto que a cinetina é uma citocinina (MATSUBARA, 2006).

O estudo fitoquímico das plantas medicinais pode ser usado para elucidar a identidade dos princípios ativos, que podem ser usados como novos medicamentos ou como moléculas molde para a síntese de novas drogas de interesse

farmacológico. Além disso, a pesquisa e o uso de culturas *in vitro* de plantas medicinais podem servir como nova fonte de compostos farmacologicamente ativos.

Conforme observado nas análises cromatográficas e nos estudos sobre ação antiofídica do extrato metanólico da cultura de calos de *S. erecta*, pode-se sugerir que esta cultura é fonte promissora de compostos biologicamente ativos de interesse farmacológico. A propagação destas culturas serve como ferramenta de conservação para espécies de plantas medicinais presentes no cerrado brasileiro, um dos biomas mais ameaçados de extinção. Além disso, a propagação destas culturas de *S. erecta* em maior escala poderia permitir um maior acúmulo de biomassa para estudos fitoquímicos mais completos visando o isolamento e a caracterização dos compostos presentes nestas culturas, uma vez que por meio da análise cromatográfica foi possível observar que as culturas de calos produzem compostos similares aos encontrados na planta *in natura*.

O extrato metanólico das folhas da *S. erecta* (EFMeOH) foi submetido a procedimentos cromatográficos visando o isolamento e a purificação dos princípios ativos presentes. O fracionamento cromatográfico deste extrato em Sephadex LH20 resultou em quatro frações principais: SF1 (20,2%), SF2 (42%), SF3 (9,3%) e SF4 (26,5%). Essas frações foram submetidas a testes de triagem fitoquímica, que revelaram a presença de saponinas, terpenos, flavonóides e taninos, respectivamente. Na análise por CCD do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* nas condições testadas foi possível observar a presença de flavonóides, compostos fenólicos com reconhecida ação antiofídica (MORS et al., 2000; IGLESIAS et al., 2005; SOARES et al., 2009).

A análise realizada por CLAE revelou que o composto SI apresentou t_R = 26,18 min e o espectro no UV apresentou máximos de absorção em 269 e 343 nm. Já o composto SII apresentou t_R = 24,18 min e máximos de absorção no UV em 267 e 341 nm, da mesma forma que o padrão vitexina. Estes espectros de absorção no UV são típicos de flavonóides, que em geral apresentam dois picos máximos de absorção no ultravioleta: um entre 240-280 nm e outro a 300-550 nm (MARKHAM, 1982; ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Na caracterização estrutural, os metabólitos secundários isolados foram submetidos a métodos espectroscópicos de ressonância magnética e posterior

comparação com dados presentes na literatura. Estes dados foram capazes de fornecer a fórmula molecular dos compostos SI e SII ($C_{21}H_{20}O_{10}$), que são duas flavonas isômeras, a isovitexina e vitexina, respectivamente. A diferença entre estes dois heterosídeos é a posição da glicose, ou seja, no composto SI identificado como isovitexina (apigenina-6-C-β-D-glicopiranosídeo), o açúcar encontra-se ligado ao C6 do anel A da genina, enquanto que no composto SII identificado como vitexina (apigenina-8-C-β-D-glicopiranosídeo), o açúcar encontra-se ligado ao C8 do anel A da genina. Além dos espectros de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C também foram realizados os espectros de massa desses compostos. Os espectros de massa foram capazes de fornecer a massa molecular e o padrão de fragmentação estrutural dos compostos analisados, que apresentaram a mesma massa molecular (432,38 g/mol).

5.2. Atividades Enzimáticas, Tóxicas e Farmacológicas

As fosfolipases A_2 são enzimas amplamente distribuídas na natureza que hidrolisam glicerofosfolípidos na posição *sn*-2 de fosfolipídeos liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, induzindo vários efeitos farmacológicos como miotoxicidade, edema, hemólise, mionecrose, entre outros (MARCUSSI et al., 2007). A atividade fosfolipásica é medida a partir do tamanho do halo formado pela ação da peçonha ou de sua toxina sobre os fosfolípídeos do substrato, o qual é composto por gema de ovo em meio sólido suplementado com eritrócito. As PLA_2s presentes nas peçonhas das serpentes são conhecidas por induzir vários efeitos patológicos em modelos animais experimentais. Para avaliar a inibição desta atividade por parte dos extratos e de suas frações foram utilizadas as peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*, além das toxinas isoladas BthTX-II e crotoxina.

A atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e pela toxina BthTX-II foi inibida em níveis diferentes pelo extratos metanólicos de *S. erecta* (EFMeOH e C) e por suas frações, sendo que a atividade fosfolipásica induzida pela BthTX-II foi completamente inibida por ação das frações SF3 e SF4. A fração SF3 é rica em flavonóides, compostos que possuem atividade anti-inflamatória, enquanto

que a fração SF4 é rica em taninos, uma classe de compostos que podem precipitar proteínas. Com relação a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *C. d. terrificus* e pela crotoxina, também foi inibida pelas amostras testadas, e a fração SF4 foi capaz de inibir totalmente a atividade fosfolipásica induzida pela crotoxina. Além dos extratos e das frações, também foram testadas as flavonas isoladas, SI (isovitexina) e SII (vitexina), que também mostraram poder inibitório sobre as atividades fosfolipásicas das peçonhas e das toxinas. O poder inibitório apresentado por SF3, possivelmente ocorre por um sinergismo da ação dos flavonóides presentes nesta fração.

De acordo com Vishwanath e colaboradores (1988), flavonóides e outros compostos orgânicos provenientes de plantas, como as flavonas, são capazes de inibir a capacidade enzimática e farmacológica de PLA_2s isoladas e, consequentemente, diminuir os efeitos inflamatórios induzidos por esta proteína.

O mecanismo de ação de substâncias com propriedades antiofídicas ainda é desconhecido, porém podem-se sugerir interações destes princípios ativos com proteínas específicas das peçonhas, como ligação a sítios catalíticos ou ligantes de substrato. A diferença de ação sob as peçonhas testadas pode ter relação com a composição das peçonhas utilizadas nas análises. Como visto anteriormente, na tabela 1 existem vários trabalhos que abordam a eficiência da ação de extratos vegetais sob a ação de fosfolipases provenientes das peçonhas das serpentes. Além disso, vários compostos provenientes de plantas medicinais como os flavonóides (MORS et al., 2000), ácido aristolóquico (VISHWANATH; GOWDA, 1987; VISHWANATH et al., 1988) e coumestanos (DIOGO et al., 2009) também são conhecidos por inibir a atividade da PLA_2.

Muitas proteínas isoladas de peçonhas de serpentes possuem atividade proteolítica, entre estas proteínas destacam duas classes: as serinoproteinases e as metaloproteinases. Algumas serinoproteinases são fibrinogenolíticas e/ou fibrinolíticas. As fibrinogenolíticas são também chamadas de proteases “semelhantes à trombina” (MATSUI et al., 2000). Alguns compostos das peçonhas de serpentes mostram grande diversidade na atividade proteolítica e o fibrinogênio é um dos principais substratos. O fibrinogênio é uma molécula constituída de três subnidades peptídicas (α, β e γ), as quais são unidas pelas regiões N-terminais por pontes de

dissulfeto (DEVLIN et al., 1998) e a degradação proteolítica das unidades que compõem o fibrinogênio podem causar alterações fisiológicas na coagulação sanguínea. Neste contexto, estudos de interações destas proteínas com inibidores sintéticos ou naturais isolados de plantas, são imprescindíveis na atenuação ou até mesmo na inibição total de suas atividades tóxicas.

O extrato metanólico *in natura* de *S. erecta* e a fração SF3 foram capazes de prevenir a degradação das cadeias do fibrinogênio sobre a ação da peçonha de *B. moojeni*. Com relação a atividade fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* foi possível observar proteção parcial das cadeias do fibrinogênio pelo extratos metanólicos *in natura* e dos calos de *S. erecta*, pelas frações SF3 e SF4, assim como pelos compostos SI e SII. Estudos anteriores sobre extratos vegetais também mostraram resultados eficientes na proteção do fibrinogênio, incluindo *Casearia sylvestris* (BORGES et al., 2001) e *Bauhinia forficata* (OLIVEIRA et al., 2005).

O fenômeno da coagulação se resume entre outros fatores, na conversão da protrombina em trombina, que ativa o fator XIII e converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina. Por sua vez, o fator XIII liga de forma cruzada a fibrina à fibronectina e esta ao colágeno, estabilizando o coágulo de fibrina (FRANCO, 2001).

Resultados com as frações SF3 e SF4, ricas em flavonóides e taninos, respectivamente, mostraram que esses compostos atuam como potentes inibidores da atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. jararacussu*, provavelmente devido à interação com serinoproteases. Enquanto que, a vitexina (SII) não promoveu a formação de coágulo, da mesma forma que as frações SF3 e SF4. Este fato pode indicar que a posição da unidade glicosídica no esqueleto das flavonas pode interferir na forma pela qual este inibidor interage como os componentes tóxicos presentes na peçonha ou ainda com componentes fisiológicos necessários à coagulação, por exemplo a daidzeína, karangina, entre outros flavonóides apresentam a habilidade de inibição da atividade procoagulante de monócitos humanos (LALE; HERBERT, 1996).

Estudos com diversas plantas (*Heliconia curtispatha, Pleopeltis percussa, Brownea rosademonte, Bixa orellana, Trichomanes elegans, Struthanthus orbiculareis e Casearia sylvestris*) descrevem o efeito inibitório total ou parcial sobre

a atividade coagulante de peçonhas das serpentes *B. asper*, *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *B. neuwiedi*, *B. moojeni* e *C. d. terrificus* (BORGES et al., 2000; 2001; NÚNEZ et al., 2004).

Edema é definido como acúmulo de fluido no espaço intersticial. A formação do edema induzido pela ação da peçonha de serpentes pode ocorrer devido à ação de mediadores inflamatórios como a histamina, liberada a partir da degranulação de mastócitos (MELLO et al., 2002). Quando ocorre uma inflamação, os vasos sanguíneos ficam mais permeáveis para facilitar a chegada das células de defesa ao local da infecção ou trauma.

A formação de edema mediada por mastócitos na presença de PLA_2s é o resultado de atividade enzimática. No entanto, PLA_2s de serpentes sem atividade catalítica, como a BthTX-I, podem induzir a ativação de mastócitos por um mecanismo independente da atividade catalítica (MARCUSSI et al., 2007). Nos ensaios da atividade de indução de edema, os extratos metanólicos de *S. erecta* e suas frações inibiram a ação de BthTX-I diminuindo a formação do edema, sendo que a fração rica em flavonóide mostrou uma rápida diminuição do edema formado, quando comparado com os demais inibidores testados, e entre os compostos isolados, a flavona vitexina (SII) exibiu uma inibição maior. Outros extratos de plantas também inibiram a formação de edema induzido pela peçonha de serpentes, entre eles destacam-se: *Mandevilla velutina* (BIONDO et al., 2003), *Cordia verbanacea* (TICLI et al., 2005), *Mikania glomerata* (MAIORANO et al., 2005) e *Blutaparon portulacoides* (PEREIRA et al., 2009).

Nos envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops*, a presença de hemorragias tanto local quanto sistêmica é comum, principalmente pela presença de metaloproteinases zinco-dependentes, que agem lesando o endotélio dos vasos capilares. Além disso, as metaloproteinases podem provocar graves danos ao músculo esquelético, como mionecrose seguida de isquemia no tecido (QUEIROZ et al., 1995). Um dos primeiros socorros mais benéficos em caso de acidentes ofídicos com serpentes da família Viperidae é a neutralização dos sintomas hemorrágicos.

As metaloproteinases são proteínas dependentes de zinco, e os compostos ativos presentes no extrato *de S. erecta* podem estar interferindo na ligação das proteínas ao cofator, ou se ligando a algum outro sítio essencial para esta atividade.

As atividades hemorrágicas das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* foram inibidas pela ação do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e de suas frações, sendo que a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. neuwiedi*, mostrou-se mais sensível à ação dos inibidores testados, e a fração SF4, rica em tanino apresentou alta atividade inibitória sobre esta peçonha.

Estudos realizados com extratos vegetais tropicais demonstraram que, dos 52 extratos hidroalcoólicos testados, dez inibiram totalmente a atividade hemorrágica da peçonha de *B. asper*, e oito inibiram parcialmente (CASTRO et al., 1999). A espécie *Casearia sylvestris* também demonstrou um grande potencial contra atividade hemorrágica neutralizando eficientemente as peçonhas de *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. asper* (BORGES et al., 2001). Pithayanukul e colaboradores (2004), mostraram os efeitos inibitórios de extratos de *Eclipta prostata* sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Calloselasma rhodostoma*. Em outro estudo, a espécie *Eclipta alba* (sinonímia *E. prostata*), também foi capaz de inibir esta atividade, e seu efeito inibitório foi atribuído a três de seus constituintes, a wedelolactona, o stigmasterol e o sitosterol (DIOGO et al., 2009). Outras plantas com propriedade anti-hemorrágica foram identificadas em estudos anteriores: *Calendula officinalis* (MELO et al., 2003), *Baccharis trimera* (JANUÁRIO et al., 2004), *Mikania glomerata* (MAIORANO et al., 2005) e *Casearia sylvestris* (BORGES et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2007).

A atividade miotóxica é o resultado da ação de metaloproteinases hemorrágicas e/ou PLA_2s miotóxicas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997). Nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* há a presença de miotoxinas com ou sem atividade fosfolipásica responsáveis pela mionecrose local (SOARES et al., 2000b; 2004).

A miotoxicidade induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e sua miotoxina isolada, BthTX-I, foi significativamente reduzida no ensaio onde foi feita a incubação prévia com os inibidores. A atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* foi inibida em 77,83%, 71,5%, 73,1% e 70,72% pelo extrato metanólico das folhas e dos calos, e pela isovitexina (SI) e vitexina (SII), respectivamente. Enquanto que a atividade miotóxica induzida pela miotoxina BthTX-I foi inibida em 32,84%, 88,36%, 64,31% e 51,2% pelo extrato metanólico das folhas e dos calos, e

pela isovitexina (SI) e vitexina (SII), respectivamente. Enquanto que no ensaio sem incubação prévia, onde a toxina foi adminstrada juntamento com o inibidor e em outro onde o inibidor foi administrado 10 min após a administração da toxina, foi possível observar que quanto mais rápida é a administração do inibidor, maior é a eficiência na inibição dos efeitos tóxicos provocados pela ação desta miotoxina.

Algumas plantas medicinais com atividade antiofídica também mostraram resultados promissores na inibição da mionecrose induzida pela peçonha de serpentes, incluindo *Calendula officinalis* (MELO et al., 2003) e *Tabernaemontana catharinensis* (VERONESE et al., 2005). Biondo e colaboradores (2003) demonstraram que o extrato aquoso de *Mandevilla velutina* inibiu em 66,5% a peçonha de *B. jararacussu,* em 75% a proteína Bth-TXI e em 100% a peçonha de *C. d. terrificus* e a proteína CB.

Pode-se concluir que, a fração SF3 de *S. erecta*, rica em flavonóides, possui compostos que apresentam atividade antiofídica e antimiotóxica, enquanto que, a fração SF4, rica em taninos, apresenta uma classe de compostos que podem precipitar proteínas. Além disso, o efeito antagonista atribuído aos compostos isolados (vitexina e isovitexina) pode ser devido à capacidade dos flavonóides de se ligarem ao sítio catalítico hidrofóbico de PLA_2 das PLA_2s miotóxicas, bloqueando o acesso livre do substrato ao sítio catalítico, causando assim uma diminuição das atividades enzimática, inflamatória e tóxica. Resultados com as frações SF3 e SF4, mostraram que essas frações enriquecidas em compostos fenólicos atuam como potentes inibidores da atividade hemorrágica e coagulante, provavelmente devido à interação com metaloproteases e enzimas “semelhantes à trombina”, respectivamente.

5.3. Estudos de Interação Molecular entre Inibidores e Miotoxinas

A principal motivação na descoberta de novas drogas é a identificação de pequenas moléculas que possuam alta afinidade e seletividade pelo alvo, com razoável absorção, distribuição, metabolização e excreção. Como por exemplo, os estudos que utilizam ferramentas de modelagem molecular têm como objetivo

descrever o processo pelo qual duas moléculas podem interagir no espaço de forma tridimensional (KROVAT et al., 2005). A modelagem molecular funciona como uma ferramenta de descoberta de inibidores de toxinas naturais e auxilia na elucidação dos mecanismos de ação dos inibidores dessas toxinas. Os modelos moleculares dos complexos formados entre a miotoxina BthTX-I com a isovitexina (SI) e a vitexina (SII) foram avaliados com o programa GOLD, no qual foi possível observar a interação destes inibidores com os resíduos de aminoácidos da BthTX-I (His48 e Lys49), por meio de pontes de hidrogênio. E apesar de BthTX-I ser catalíticamente inativa, estes compostos fenólicos são capazes de inibir as respostas inflamatórias e nociceptivas induzidas por esta miotoxina.

O ácido rosmarínico, isolado do extrato de *Cordia verbenaceae*, interagiu com BthTX-I e o possível mecanismo de inibição da atividade fosfolipásica ocorreu devido a interação de uma das hidroxilas do anel aromático com His48 e do grupo carboxila com Lys49 (TICLI et al., 2005). Estudos por modelagem molecular indicaram que os compostos fenólicos presentes na semente da manga se ligaram seletivamente aos sítios ativos ou modificaram resíduos conservados de PLA_2, além de se ligarem as LAAOs isoladas das peçonhas de *Calloselasma rhodostoma* e *Naja naja kaouthia*, inibindo suas atividades enzimáticas (LEANPOLCHAREANCHAI et al., 2009). Enquanto que em outro estudo foi averiguado que os princípios fenólicos podem formar ligações de hidrogênio com os três resíduos de histidina no sítio de ligação do zinco das metaloproteinases presentes na peçonha de serpentes (SVMPs), o que pode resultar na inibição das atividades enzimáticas da peçonha e, assim, inibir a necrose tecidual (PITHAYANUKUL et al., 2009).

Estudos de modelagem molecular indicam que compostos polihidróxi fenólicos se ligam ao aminoácido Asp49 da BthTX-II e desestabilizam a coordenação do átomo de cálcio, que é essencial para a atividade catalítica (DA SILVA et al., 2009). No entanto, as Lys49 PLA_2s cataliticamente inativas e que acionam respostas inflamatórias e nociceptivas comparáveis aos seus homólogos cataliticamente ativos (TEIXEIRA et al., 2003) também sofrem ação inibidora de suas atividades por compostos fenólicos, como por exemplo, o ácido rosmarínico (TICLI et al., 2005). Outro exemplo, são os derivados do ácido elágico, compostos hidroxilados que podem ser encontrados no extrato aquoso de *Casearia sylvestris*, e que inibiram os

efeito tóxicos da BthTX-II, possivelmente pela presença de fortes grupos polares em C3 e C3'', os quais podem formar pontes de hidrogênio com His48 e Asp49, resíduos presentes no sítio ativo (DA SILVA et al., 2008).

De acordo com a classificação (*Goldscore*) dada pelo programa utilizado para realizar o teste de "docking" por modelagem molecular, a vitexina (SII) apresentou um resultado levemente superior ao da isovitexina (SI). Fato que também pôde ser observado nos testes enzimáticos e farmacológicos.

Dicroísmo circular (CD) é a propriedade observada numa molécula que possui centros assimétricos (centros quirais), quando ela absorve de forma diferenciada a luz circularmente polarizada à direita e a luz circularmente polarizada à esquerda. Peptídeos e proteínas são amplamente estudados por CD, pois existem vários centros quirais ao longo de sua estrutura. Portanto, seus espectros de CD na região entre 180 e 260nm (UV-distante) fornecem informações capazes de caracterizar e discriminar estruturas secundárias (α-hélice, folha-β, voltas e estruturas não ordenadas) presentes nestas moléculas (SREERAMA et al., 2001).

A técnica de dicroísmo circular é um excelente método para o estudo das conformações adotadas por proteínas e ácidos nucléicos em solução. Este método possui duas grandes vantagens: pode ser feito em pequenas quantidades de material em tampão fisiológico e proporciona um dos melhores métodos para o monitoramento de qualquer alteração estrutural que pode resultar de mudanças nas condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica. Suas principais aplicações são: (1) estimativa da composição da estrutura secundária das proteínas; (2) estudo do comportamento estrutural das proteínas em função da temperatura, pH ou adição de desnaturantes químicos; (3) estudo dos efeitos das mutações na estrutura da proteína e (3) estudos de interações entre macromolécula-ligante (MARTIN; SCHILSTRA, 2008).

Em estudos anteriores os espectros obtidos de CD para PLA_2 nativa e o complexo PLA_2-morina indicaram que a PLA_2 isolada da peçonha de *Crotalus durissus cascavella* após o tratamento com morina, um flavonóide, apresentou modificações estruturais com mudanças significativas na composição da estrutura secundária do complexo formado entre PLA_2-morina, resultando na inibição da atividade catalítica. Estes resultados demonstram claramente o efeito de um

flavonóide sobre a estrutura de uma PLA_2 (IGLESIAS et al., 2005). Em outro estudo, a comparação entre os espectros de CD da BthTX-I nativa e do complexo formado entre o ácido rosmarínico e a miotoxina BthTX-I não indicaram alterações de conformação significativas da proteína (TICLI et al., 2005). Da mesma forma, não foram observadas mudanças significativas na estrutura secundária das miotoxinas BthTX-I e II, quando complexadas com os flavonóides (vitexina e isovitexina) isolados de *Serjania erecta*.

As observações da inibição das atividades testadas pelas flavonas estam de acordo com estudos anteriores que observaram as propriedades farmacológicas destas duas substâncias, por exemplo, a isovitexina (SI) possui as seguintes atividades: antinflamatória (LIN et al., 2005) e antioxidante (SHIBANO et al., 2008), enquanto que a vitexina (SII) é antiespasmódica, anti-inflamatória (RAGONE et al., 2008; PRABHAKAR et al., 1981), antimicrobiana (AFIFI et al., 1997) e antioxidante (SHIBANO et al., 2008).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os extratos in natura e *in vitro* de *S. erecta* apresentaram atividade inibitória sob os efeitos das peçonhas de serpente dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, bem como de toxinas isoladas.

- A análise CLAE/UV/DAD mostrou ser uma ferramenta útil na detecção dos dois compostos fenólicos isolados do extrato das folhas de *S. erecta*. Esta análise mostrou que o extrato das folhas de *S. erecta* e o extrato das culturas *in vitro* de *S. erecta* são ricos em compostos fenólicos, mas não necessariamente os mesmos.

- A cultura de calos estabelecida durante este estudo é uma ferramenta de obtenção de compostos biologicamente ativos, e segundo as análises realizadas no CLAE a cultura de calos de *S. erecta* parece ser fonte promissora de compostos biologicamente ativos e o estudo fitoquímico preliminar indicou a presença de compostos fenólicos semelhantes aos encontrados na planta *in natura*.

- A partir do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* foi possível a obtenção de duas flavonas glicosiladas, a isovitexina (apigenina-6-C-β-D-glicopiranosídeo) e a vitexina (apigenina-8-C-β-D-glicopiranosídeo), identificadas a partir da utilização de técnicas de RMN de ^{1}H e ^{13}C, e espectro de massa.

- Este é o primeiro estudo fitoquímico da *S. erecta* onde foi realizado o isolamento e a caracterização estrutural de compostos ativos com propriedades antiofídicas presentes nesta espécie vegetal.

- As atividades fosfolipásicas induzidas pelas peçonhas de *B. jararacussu* e e *C. d. terrificus*, e pelas toxinas BthTX-II e crotoxina foram inibidas em níveis diferentes pelas amostras testadas, sendo que a atividade fosfolipásica induzida pela

BthTX-II foi completamente inibida pela ação das frações SF3 e SF4, e a fração SF4 foi capaz de inibir totalmente a atividade fosfolipásica induzida pela crotoxina.

- O extrato metanólico *in natura* de *S. erecta* e a fração SF3 foram capazes de prevenir a degradação das cadeias do fibrinogênio sobre a ação da peçonha de *B. moojeni*. Já os extratos metanólicos *in natura* e dos calos de *S. erecta*, as frações SF3 e SF4, e as flavonas promoveram proteção parcial das cadeias do fibrinogênio quando incubados juntos com a peçonha de *B. jararacussu*.

- Nos ensaio sobre a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e a atividade indutora de edema induzida pela toxina BthTX-I, as frações SF3 e SF4, ricas em flavonóides e taninos, respectivamente, mostraram que esses compostos atuam como potentes inibidores destas atividades.

- Em comparação com a isovitexina, a vitexina possui importante propriedades anticoagulante e de inibição da atividade indutora de edema. Isto pode indicar que embora estas flavonas sejam isômeras a posição do açúcar pode influenciar na interação entre o inibidor e a toxina.

- As atividades hemorrágicas das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* foram inibidas pela ação do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e de suas frações, sendo que a fração SF4, rica em tanino, apresentou alta atividade inibitória sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. neuwiedi*.

- A miotoxicidade induzida pelo veneno de *B. jararacussu* e sua miotoxina isolada, BthTX-I, foi significativamente reduzida no ensaio onde foi feita a incubação prévia com os inibidores. Enquanto que no ensaio sem incubação prévia, foi possível observar que quanto mais rápida é a administração do inibidor, maior é a eficiência na inibição dos efeitos tóxicos provocados pela ação da toxina.

- O estudo *in silico* dos complexos formados entre BthTX-I e os compostos isolados do extrato de *S. erecta* indicam a formação de ponte de hidrogênio entre os inibidores e os aminoácidos presentes no sítio ativo da toxina, o que explicaria a inibição das atividades tóxicas de BthTX-I.

- Nos estudos por dicroísmo circular, os espectros demonstraram que a interação entre as toxinas testadas, BthTX-I e II, e as duas flavonas não revelaram mudanças significativas na estrutura secundária das toxinas, sugerindo uma interação mais específica entre essas moléculas.

- Tendo em vista que a partir do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de *S. erecta* foram obtidas outras frações com atividade antiofídica, além da fração rica em flavonóides, da qual foram extraídos as duas flavonas, sería interessante dar continuidade ao estudo fitoquímico desta espécie vegetal na busca por outros princípios ativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AFIFI, F.U.; SHERVINGTON, A.; DARWISH, R.M. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palastinum*. Part 1: Flavone *C*-glycosides. **Acta Technologiae et Legis Medicamenti**, vol. 8, p. 105-111, 1997.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier, New York, 1989.

ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, 2006.

AOKI, T.; AKASHI, T.; AYABE, S. Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity and Biosynthesis. **Journal of Plant Research**. vol. 113, p. 475-488, 2000.

ARRUDA, A.P.C.C.B.N.; COELHO, R.G.; HONDA, N.K.; FERRAZOLI, C.; POTT, A.; HIRUMA-LIMA, C.A. Gastroprotective effect of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae): involvement of sensory neurons, endogenous nonprotein sulfhydryls, and nitric oxide. **Journal of Medicinal Food**. vol. 12, p. 1411-1415, 2009.

BATINA, M.F.; CINTRA, A.C.; VERONESE, E.L.; LAVRADOR, M.A.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; DIAS, D.A.; FRANÇA, S.C.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Medica**. vol. 66, p.424-428, 2000.

BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHOM, J.-Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A_2 inhibitors. **Phytochemistry**. vol. 58, p. 865-874. 2001.

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**. vol. 85, p. 1017-1025, 2003.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002.

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 durisssus terrificus* snake venom. **Plant Cell Reports**. vol. 22, p. 549-552, 2004.

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 A_2. **Comparative Biochemistry and Physiology.** vol. 127, p. 21-30, 2000.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A. M.; RUCAVADO, A.;GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**. vol. 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 A_2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 98, p. 21-29, 2005.

BROGGINI, L.S.C.; FERNANDES, R.S.; NOGUEIRA, T.; SUZANO, F.R.; CAETANO, A.L.; BUCK, H.S.; COUTO, L.B.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S. Behavioral and enzymatic bioassays with *Serjania erecta* Radlk., Sapindaceae, correlated with cognitive dysfunctions. Brazilian Journal of Pharmacognosy. vol. 20, p. 519-528, 2010.

CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, S.A.; HADDAD, V.J. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Ed. Sarvier; 2003.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMAÑA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales **Revista de Biologia Tropical**. vol. 47, p. 605-616. 1999.

CAVALCANTE, W.L.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A_2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 112, p. 490-497, 2007.

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

CHERDCHU, C.; KARLSSON, E. Proteolytic-independent cobra neurotoxin inhibiting activity of Curcuma sp. (Zingiberaceae). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**. vol. 14, p. 176-180, 1983.

DA SILVA, A.J.M.; MELO, P.A.; SILVA, N.M.V.; BRITO, F.V.; BUARQUE, C.D.; SOUZA DE, D.V.; RODRIGUES, V.P.; POÇAS, E.S.C.; NOËL, F.; ALBUQUERQUE E.X.; COSTA P.R.R. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of coumestans with different patterns of oxygenation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. vol. 11, p. 283-286, 2001.

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. Antihemorragic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 100, p. 145-152, 2005.

DA SILVA, J.O.; TICLI, F.K.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; MAZZI, M.V.; FRANCO, J.J.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. SAMPAIO, S.V. Triterpenoid saponin, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*: Antiproteolytic and antihemorragic properties. **Toxicon**. vol. 50, p.283-291, 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-PLA_2 activity. **Toxicon**. vol. 52, p. 655-666, 2008.

DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; MASO, V.; DAMICO, D.C.; BALDASSO, P.; VEBER, C.L.; VILLAR, J.A.; OLIVEIRA, A.R.; COMAR, M.J.R.; OLIVEIRA, K.M.; MARANGONI, S.

Molecular modeling and inhibition of phospholipase A_2 by polyhydroxy phenolic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. vol. 44, p. 312-321, 2009.

DAROS, M.R.; MATOS, F.J.A.; PARENTE, J.P. A new triterpenoid saponin, Bredemeyerosid B, from the roots of *Bredemeyera foribunda*. **Planta Medica**. vol. 62, p.523-527, 1996.

DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, H.N.; BRANCO, A.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V.; QUEIROZ, L.P.; GIULIETTI, A.M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**. vol. 78, p. 215–218, 2007.

DE ALMEIDA, L.; CINTRA, A.C.; VERONESE, E.L.; NOMIZO, A.; FRANCO, J.J.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. vol. 137C, p. 19-27, 2004.

DEVLIN, T.M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas, Ed. Edgard Blucher: São Paulo, 4ªed, 1998.

DIOGO, L.C.; FERNANDES, R.S.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D.L.; ROBERTO, P.G.; MATRANGULO, P.V.F.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; GIULIATTI, S.; SOARES, A.M.; LOURENÇO, M.V. Inhibition of snake venoms and phospholipases A_2 by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.** vol.104, p. 293-299, 2009.

DI STASI, L.C.; COSTA, M.; MENDAÇOLLI, S.L.J.; KIRIZAWA, M.; GOMES, C.; TROLIN, G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 24, p. 205-211, 1988.

EDGAR, W.; PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis Research**. vol. 2, p. 85-95,1973.

EKABO, O.A.; FARNSWORTH, N.R. Antifungical and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana.* **Journal of Natural Products**. vol. 59, p. 431-435. 1996.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** vol. 42, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, L.A.; HENRIQUES, O.B.; ANDREONI, A.A.; VITAL, G.R.; CAMPOS, M.M.; HABERMEHL, G.G.; DE MORAES, V.L. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**. vol. 30, p.1211-1218, 1992.

FLORIANO, R.S.; NOGUEIRA, R.M.; SAKATE, M.; LAPOSY, C.B.; DA MOTTA, Y.P.; SANGIORGIO, F.; DAVID, H.C.; NABAS, J.M. Effect of *Mikania glomerata* (Asteraceae) leaf extract combined with anti-venom serum on experimental *Crotalus durissus* (Squamata: Viperidae) envenomation in rats. **Revista de Biología Tropical**. vol. 57, p. 929-937, 2009.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, vol. 34, p.229-237, 2001.

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**. vol. 27, p. 841-848, 1989.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. Inhibition of *Naja Naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. **Biochemistry** (Moscow). vol. 70, p. 948-952, 2005.

GOMIG, F.; PIETROVSKI, E.F.; GUEDES, A.; DALMARCO, E.M.; CALDERARI, M.T.; GUIMARÃES, C.L. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 118, p. 220–224, 2009.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de mato Grosso: Um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**. vol. 17, p. 561-584, 2003.

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**. vol. 2, p. 411-413, 1988.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipases A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms, in: R.M. Kini (Ed.), **Venom Phospholipase A_2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley & Sons, England, p. 321–352, 1997.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**. vol. 82, p. 841-50, 2000.

HASSON, S.S.; AL-JABRI, A.A.; SALLAM, T.A.; AL-BALUSHI, M.S.; MOTHANA, R.A.A. Antisnake Venom Activity of *Hibiscus aethiopicus* L. against *Echis ocellatus* and *Naja n. nigricollis*. **Journal of Toxicology**. vol. 2010, p. 1-8, 2010.

HARBORNE, J.B. **The Flavonoids advances in research since 1986**. Chapman and Hall, London, 1996.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. vol. 55, p. 481-504, 2000.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de Plantas Superiores**. 1ª ed. São Carlos: EdUFSCar. 2003.

IGLESIAS, C.V.; APARÍCIO, R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CAMARGO, E.A.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D.O.; BERIAM, L.O.S.; MONTEIRO, H.S.A.; TOYAMA, M.H. Effects of morin on snake venom phospholipase A_2 (PLA_2). **Toxicon**. vol. 46, p. 751-758, 2005.

IZIDORO, L.F.; 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* (Flacourtiaceae). **Biochimie**. vol. 85, p. 669-675, 2003.

JACOME, D.; MELO, M.M.; SANTOS, M.M.; HENEINE, L.G. Kinetics of venom and antivenom serum and clinical parameters and treatment efficacy in *Bothrops alternatus* envenomed dogs. **Veterinary and Human Toxicology**. vol. 44, p. 334-338, 2002.

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. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteradeae): Anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**. vol. 150, p. 243-251, 2004.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**. vol. 245, p. 43–53, 1995.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**. vol. 267, p. 727–748, 1997.

KRAFCZYK, N.; GLOMB, M.A. Characterization of phenolic compounds in rooibos tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 56, p. 3368-3376, 2008.

KROVAT, E.M.; STEINDL, T.; LANGER. T. Recent Advances in Docking and Scoring. **Current Computer-Aided Drug Design**. vol. 1, p. 93-102, 2005.

LALE, A.; HERBERT, J.M. Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human mono cytes. **Journal of Natural Products**. vol. 59, p. 273-276, 1996.

LEANPOLCHAREANCHAI, J.; PITHAYANUKUL, P.; BAVOVADA, R.; SAPARPAKORN, P. Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai Mango seed Kernel extract against snake venoms. **Molecules**. vol. 14, p. 1404-1422, 2009.

LI, H.; SONG, F.; XING, J.; TSAO, R.; LIU, Z.; LIU, S. Screening and structural characterization of alpha-glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS(n) and SORI-CID FTICR MS. **Journal of the American Society for Mass Espectrometry**. vol. 20, p. 1496-503, 2009.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 105, p. 137-147, 2006.

LIN, C.M.; HUANG, S.T.; LIANG, Y.C.; LIN, M.S.; SHIH, C.M.; CHANG, Y.C.; CHEN, T.Y.; CHEN, C.T. Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. **Planta Medica**. vol. 71, p. 748-753, 2005.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Selective Inhibition of Group II phospholipase by Quercetin. **Inflammation.** vol. 17, p. 573–582, 1993.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A_2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A_2. **Inflammation.** vol. 21, p. 347–356, 1997.

LUCZKIEWICZ,M.; GLOD, D. Callus culture of *Genista* plants – *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. **Plant Science**. vol. 165, p. 1101–1108, 2003.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidiciplinares. **Química Nova**. vol. 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*. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 102, p. 364-370, 2005.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STABELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A_2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. vol. 7, p. 743-756, 2007.

MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoid Identification**. Academic Press, London, 1982.

MARTIN, S.R.; SCHILSTRA, M.J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. **Methods in Cell Biology.** vol. 84, p.263-293, 2008.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**. vol. 30, p. 1131-1142, 1992.

MATSUBARA, S. Nutritional and hormonal requirements for the growth of *Vigna sinensis* callus *in vitro*. **Physiologia Plantarum**. vol. 34, p. 83 – 89, 2006.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. vol. 1477, p. 146-156, 2000.

MEBS, D. Toxicity in animals: Trends in evolution? **Toxicon**. vol. 39, p. 87-96, 2001.

MELO, M.M.; MERFORT, I.; HABERMEHL, G.G.; FERREIRA, K.M. Uso de extratos de plantas no tratamento local da pele de coelhos após envenenamento botrópico experimental. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. vol. 1, p. 100-106, 2003.

MENDES, M.M.; OLIVEIRA, F.C.; LOPES, D.S.; VALE, L.H.F.; ALCANTARA, T.M.; IZIDORO, L.F.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, vol. 22, p. 859-866, 2008.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** vol. 100, p. 783-787. 2005.

MORRIS, G.M.; GOODSELL, D.S.; HALLIDAY, R.S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A.J. Automated Docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry.** vol. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORS. W.B.; DO NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; DA SILVA, M.H.; MELO, P.A.; SUAREZ-KURTZ, G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American

rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**. vol. 27, p.1003-1009, 1989.

MORS, W. B. Plants active against snake bite. In: **Economic and Medicinal Plant Research**. vol. 5. Academic Press, New York, 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**. vol. 55, p. 627-642, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, vol. 15, p. 473-497, 1962.

NAKAGAWA, M.; NAKANISHE, K.; DARKO, L.L.; VICK, J.A. Structures of Cabenegrins I and II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Letters**. vol. 23, p. 3855-3858, 1982.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; de SOUZA, M.A.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 99, p. 37-41, 2005.

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**. vol. 15, p. 5956-5970, 2010.

NEVES, P.C.A.; NEVES, M.C.A.; CRUZ, A.B.; SANT'ANA, A.E.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A_2 and phospholipase C. **European Journal of Pharmacology**. vol. 243, p. 213-219, 1993.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A.T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol. 231, p. 309-319, 1984.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: A review of probable mechanism of action and potencial applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. vol. 74, p. 418-42. 2001.

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**. vol. 14, p.1072-80, 2009.

NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SAIDARRIAGA, M.; OSORIO, R.G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; DIAZ, 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. vol. 37, p. 969-977. 2004a.

NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMENEZ, S.; OSORIO, R.G.; QUINTANA, J.C.; DIAZ, A. Inhibition of the toxic effects of *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* and *Micrurus mipartitus* snake venoms by plant extracts. **Pharmaceutical Biology**. vol. 42, p. 49-54. 2004b.

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L.A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**. vol. 66, p. 1017-1025, 2005.

OLIVEIRA, C.Z.; MARCUSSI, S.; MAIORANO, V.A.; SANT'ANA, C.D.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract of *Bauhinia forficata* against snake venom. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 98, p. 213-216, 2005.

OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S.P.; GARCÍA, M.E.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R.G.; DÍAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE, A.; VÉLEZ, H.N. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 71, p. 493-504, 2000a.

OTERO, R.; NUÑEZ, 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. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 71, p. 505–511. 2000b.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; OSORIO, R.G.; SALDARRIAGA, M.; DIAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the nortwest region of Colômbia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Brothops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 73, p. 233-241. 2000c.

PENG, J.; FAN, G.; HONG, Z.; CHAI, Y.; WU, Y. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. vol. 1074, p. 111–115, 2005.

PEREIRA, N.A.; PEREIRA, B.M.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; MORS, W.B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**. vol. 60, p. 99-100. 1994.

PEREIRA, B.M.R.; DAROS, M.R.; PARENTE, J.P.; MATOS, F.J.A. Bredemeyeroside D, a Novel triterpenoid saponin from *Bredemeyera floribunda*: A potent snake venom antidote activity on mice. **Phytotherapy Research**. vol. 10, p. 666-669, 1996.

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

PINHO, F. M. O. PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. vol. 47, p. 24-29, 2001.

PITHAYANUKUL, P.; LAOVACHIRASUWAN, S.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 90, p. 347-352. 2004.

PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; SAPARPAKORN, P. Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of *Thai mango* seed kernel extract. **Molecules**. vol. 14, p. 3198-213, 2009.

PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; BAVOVADA, R. Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. **Phytotherapy Research**. vol. 24, p. S56-S62, 2010.

PRABHAKAR, M.C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M.A.; KHAN S.Y. Pharmacological investigations on vitexin. **Planta Medica**. vol. 43, p. 396–403, 1981.

PROVENCHER, W.; GLÖCKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**. vol. 20, p. 33-37, 1981.

QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. vol. 23, p. 341-345, 1985.

RAGONE, M.I.; SELLA, M.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M.G.; CONSOLINI A.E. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenums. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 113, p. 258–266, 2007.

RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; DUARTE, D.S.; BORGES, M.H.; DE LIMA, M.E. Anti-PLA_2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bollettino Chimico Farmaceutico**. vol. 141, p. 457-460, 2002.

RATANABANANGKOON, K.; CHERDCHU, C.; CHUDAPONGSE, P. Studies on the cobra neurotoxin inhibiting activity in an extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) rhizome. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**. vol. 24, p. 178-185, 1993.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B.; PEREIRA, N.A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente veneno de cobras. **Revista Brasileira de Farmácia**. Vol. 69, p. 82-86. 1988

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol. 381, p. 213-224, 2000.

RUPPELT, B.M.; PEREIRA, E.F.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** vol. 86, p. 203-205. 1991.

SHIBANO, M.; KAKUTANI, K.; TANIGUCHI, M.; YASUDA, M.; BABA, M. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their *a*-glucosidase-inhibitory activity. Journal **of Natural Medicines**. vol. 62, p. 349–353, 2008.

SREERAMA, N.; AND WOODY, R.W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**. vol. 287, p. 252-260. 2000.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S.Y.; WOODY, R.W. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. **Analytical Biochemistry**. vol. 299, p. 271-274. 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. 2002.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and funcional characterization of a myotoxin I a Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol. 373, p. 7-15, 2000a.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M.R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.

Structural and funcional characterization of a BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A_2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol. 378, p. 201-209, 2000b.

SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; CECCHINI, A.L.; ARANTES, E.C.; FRANCA, S.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A_2 subunit of crotoxin from Crotalus durissus terrificus snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. vol.33, p. 877-888, 2001.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M ; GIGLIO, J.R . Phospholipase A_2 myotoxins from Bothrops snake vVenoms: Structure-function relationship. Review. **Current Organic Chemistry**, vol. 8, p. 1677-1690, 2004.

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. **Current Medical Chemistry**. vol. 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**. Karachi-Pakistan: Bentham Science Publishers. vol. 4, p. 309-346, 2009.

TEIXEIRA, J.R M.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; VALLE, J.R. Timbós: Ichthyotoxic plants used by brazilian indians. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 10, p. 311-318, 1984.

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A_2. **Toxicon**. vol. 42, p. 947–962. 2003.

TICLI, F.K.; HAGE, L. I.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new phospholipases A_2 snake venom inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**. vol. 46, p. 318-327, 2005.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPACNHP, 1990.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. vol. 2, Embrapa – Brasília, DF, 1999.

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 & Clinical Pharmacology & Toxicology**. vol. 103, p.104-7, 2008.

VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; TROMBONE, A.P.F.; SANTANA, A.E.; BECHARA, G.H.; KETTELHUT, I.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine.** vol. 12, p. 123-130, 2005.

VISHWANATH B.S.; GOWDA, T.V. Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A_2: its effect on enzymatic and pathological activities. **Toxicon**. vol. 25, p. 929-37, 1987.

VISHWANATH, B.S.; FAWZY, A.A.; FRANSON, R.C. Edema inducing activity of phospholipase A_2 purified from synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. **Inflammation**. vol. 12, p. 549–561, 1988.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1ª ed. Chapecó: Argos. 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology.** vol. 126, p. 485-493. 2001.