

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Propriedades antiofídicas do ácido rosmarínico isolado do extrato vegetal de *Cordia verbenacea* sobre as ações tóxicas e farmacológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas fosfolipases A₂ miotóxicas.

Fabio Kiss Ticli

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

Orientador: Profa. Dra. Suely Vilela

Ribeirão Preto
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Ticli, Fabio Kiss

Propriedades antiofídicas do ácido rosmarínico isolado do extrato vegetal de *Cordia verbenácea* sobre as ações tóxicas e farmacológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas fosfolipases A₂ miotóxicas.

113 p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Sampaio, Suely Vilela.

1. *Bothrops jararacussu*. 2. *Cordia verbenacea*. 3. ácido rosmarínico

Autor: Fabio Kiss Tici

Título: Propriedades antiofídicas do ácido rosmarínico isolado do extrato vegetal de *Cordia verbenacea* sobre as ações tóxicas e farmacológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas fosfolipases A₂ miotóxicas.

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)
Orientador(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em ____/____/2003

AGRADECIMENTOS

A todos os professores, alunos e funcionários da Unidade de Biotecnologia (UNAERP), pelo companheirismo, amizade e ajuda, vocês foram e serão insubstituíveis.

Ao GRANDE amigo Franco (FCFRP-USP), por suas brilhantes idéias e pela admirável pessoa que é.

Aos amigos pós-graduandos, Luís Everton, Elen, Silvio, Mauricio e Jocivânia, pela ótima convivência e pelo apoio.

A amiga Dra. Adélia (FCFRP-USP), pela ajuda nos momentos difíceis e pelas idéias de uma excelente pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira e seus alunos (FCFRP-USP), pelas ações e pesquisas conjuntas.

Aos amigos Aldo e Reinaldo (FCFRP-USP), pela ajuda e organização do biotério, também pelas piadas, todo dia surgia uma nova.

A Denise, Ana e Rosana (FCFRP-USP), pela tolerância e ajuda nos preenchimentos de papéis. Espero não incomoda-las tanto nos próximos anos.

A amiga Nancy (FCFRP-USP), pela ajuda na organização do laboratório e pelo seu sorriso sempre estampado no rosto.

A Virgínia (FFCLRP-USP), pelas análises espectrométricas realizadas com uma eficiência de dar inveja a muitos doutores.

Ao primo e amigo Luís Henrique, que informou o efeito "milagroso" desta planta.

Aos amigos Robson, Ricardo, Rogério, Pedro, e João Paulo, pelo companheirismo e lealdade de velhos amigos. Depois desta correria espero que possamos jogar uma pelada toda semana.

Aos meus pais e irmãos, por ensinar ao caçula caminhos menos dolorosos da vida, vocês sempre terão minha mão como ajuda e agradecimento.

A minha esposa Emanuelle e minha filha Laís, vocês são perfeitas, ainda não descobri o que fiz nesta vida para merecer vocês duas.

A minha orientadora Suely (FCFRP-USP), pela amizade, compreensão e ajuda. Espero estar correspondendo a confiança que me foi dada.

A DEUS pelo destino e caminho que me conduz, afinal encontrei todas as pessoas acima graças a Ele. Sempre ilumine meu caminho, que nunca lhe desapontarei.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS -----	i
LISTA DE TABELAS -----	ii
LISTA DE FIGURAS -----	iii
RESUMO -----	v
SUMMARY -----	vi
1 – INTRODUÇÃO -----	01
1.1 – Serpentes -----	02
1.2 – Venenos -----	04
1.3 – Efeitos farmacológicos e tóxicos do veneno do gênero <i>Bothrops</i> -----	08
1.4 – Substâncias naturais antiofídicas -----	10
1.4.1 <i>Cordia verbenacea</i> -----	13
1.5 - Tratamento do acidente ofídico -----	15
2 – OBJETIVOS -----	16
3 – MATERIAIS -----	18
3.1 – Veneno -----	19
3.2 – BthTX-I e II -----	19
3.3 – Animais -----	19
3.4 – Vegetal -----	19
3.5 – Plasma -----	19
3.6 – Fosfolipase ácida -----	19
3.7 – Reagentes em geral -----	19
3.8 – Resinas -----	20
4 – MÉTODOS -----	21
4.1 – Purificação das toxinas BthTX-I e II do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> --	22
4.1.1 – Preparação da amostra -----	22
4.1.2 – Filtração em gel de Sephadex G-75 -----	22
4.1.3 – Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25 -----	22
4.1.4 – Dessalificação em Gel de Sephadex G-10 -----	23
4.2 – Preparação das soluções de veneno e das toxinas BthTX-I e BthTX-II ----	24
4.3 – Coleta e classificação do vegetal -----	24
4.4 – Preparação do vegetal -----	24
4.5 – Preparação do extrato de <i>Cordia verbenacea</i> -----	24
4.6 – Cromatografia em camada delgada (CCD) -----	26
4.7 – Fracionamento do extrato bruto metanólico de <i>C. verbenacea</i> -----	26
4.7.1 – Filtração em Sephadex LH-20 -----	26
4.7.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) -----	27
4.8 – Elucidação estrutural da fração CL6 -----	27
4.8.1 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN) -----	27
4.8.2 – Infra-Vermelho (I.V.) -----	27
4.9 – Determinação da atividade edematogênica -----	27
4.9.1– Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i> -----	28
4.9.2 – Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e II -----	29

4.9.3 – Avaliação da atividade edematogênica do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> -----	30
4.9.4 – Avaliação do efeito das frações obtidas do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da BthTX-I do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> -----	30
4.9.5 - Avaliação do efeito das frações obtidas em CLAE (CL1 a CL7) da fração F3, sobre a atividade edematogênica provocada pela toxina BthTX-I do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> -----	32
4.10 – Determinação da atividade miotóxica -----	33
4.10.1 – Avaliação do efeito do AR sobre a atividade miotóxica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> e pelas toxinas BthTX-I e II -----	34
4.11 – Determinação da atividade fosfolipásica -----	35
4.11.1 – Avaliação do efeito do ácido rosmarinico sobre a atividade fosfolipásica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> e pelas toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA ₂ -----	36
4.12 – Determinação da atividade anticoagulante -----	37
4.12.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade anticoagulante da toxina BthTX-II -----	38
4.13 – Determinação da atividade hemorrágica -----	39
4.13.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	40
4.14 – Determinação da atividade coagulante -----	40
4.14.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	41
4.15 – Eletroforese em Gel de Poli(acrilamida) com SDS -----	42
5 – RESULTADOS -----	44
5.1 Purificação das toxinas BthTX-I e II do veneno de <i>B. jararacussu</i> -----	45
5.1.1 - Filtração em Gel de Sephadex G-75 -----	45
5.1.2 - Cromatografia em SP-Sephadex C-25 -----	46
5.2 – Purificação do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> -----	47
5.2.1 - Filtração em gel de Sephadex LH-20 -----	47
5.2.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração F3 do extrato metanólico de <i>Cordia verbenacea</i> -----	50
5.2.3 - Elucidação estrutural da fração CL6 -----	50
5.3 – Avaliação da ação do extrato metanólico de <i>Cordia verbenacea</i> sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> e suas toxinas, BthTX-I e II -----	57
5.3.1 - Veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i> -----	57
5.3.2 - Toxina BthTX-I -----	59
5.3.3 - Toxina BthTX-II -----	59
5.4 – Avaliação da ação edematogênica do extrato metanólico de <i>Cordia verbenacea</i> -----	62
5.5 – Avaliação da ação das frações do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I -----	63
5.6 – Avaliação da ação das frações obtidas da fração 3 do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I -----	63

5.7 – Avaliação da ação do AR sobre a atividade miotóxica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> , BthTX-I e BthTX-II -----	64
5.8 – Avaliação do efeito do AR sobre a atividade fosfolipásica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA ₂ -----	71
5.9 – Avaliação do efeito do AR sobre a atividade anticoagulante da BthTX-II do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	71
5.10 – Avaliação da ação do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	73
5.11 – Avaliação do efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	73
5.12 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS -----	76
6 – DISCUSSÃO -----	79
7 – CONCLUSÃO -----	91
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Ácido rosmarínico				
BthA-I-PLA ₂	Fosfolipase ácida de <i>Bothrops jararacussu</i>				
BthTX-I	Bothropstoxina-I				
BthTX-II	Bothropstoxina-II				
CCD	Cromatografia em Camada Delgada				
CHCl ₃	Clorofórmio				
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência				
COSY	Ressonância	Magnética	Nuclear	bidimensional	Hidrogênio- Hidrogênio
HMBC	Ressonância	Magnética	Nuclear	bidimensional	Hidrogênio- Carbono
HMQC	Ressonância	Magnética	Nuclear	bidimensional	Hidrogênio- Carbono
IV	Infravermelho				
NP/PEG	Nature Product/Polietilenoglicol				
MeOH	Metanol				
PBS	Solução tampão fosfato ou solução salina tamponada				
PLA ₂	Fosfolipase A ₂				
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13				
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio				
VB	Veneno bruto				

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i> administrado por via i.d.-----	28
Tabela 2 -	Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I e II administrada por via i.d.---	29
Tabela 3 -	Avaliação da atividade edematogênica do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> administrado por via i.d.-----	30
Tabela 4 -	Avaliação da atividade anti-edematogênica das frações (F1, F2 e F3) do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> administrado por via i.d. -----	31
Tabela 5 -	Avaliação da atividade anti-edematogênica das frações (F1, F2 e F3) do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> administrados por via i.d. -----	32
Tabela 6 -	Avaliação da atividade anti-edematogênica das frações (CL1 a CL7) obtidas da fração F3 do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> administrados por via i.d. -----	33
Tabela 7 -	Avaliação do efeito do AR sobre a atividade miotóxica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> e pelas toxinas BthTX-I e II administrado por via i.d. -----	35
Tabela 8 -	Avaliação do efeito do AR sobre a atividade fosfolipásica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> e pelas toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA ₂ -----	37
Tabela 9 -	Avaliação do efeito do AR sobre a atividade anticoagulante da toxina BthTX-II -----	39
Tabela 10 -	Avaliação do efeito do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> administrado por via i.d.-----	41
Tabela 11 -	Avaliação do efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	42
Tabela 12 -	Rendimento das frações CL1 a CL7 obtidas em CLAE-----	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Serpente <i>Bothrops jararacussu</i> pertencente a série solenóglifa, com as presas voltadas para trás e os demais dentes são menores e maciços. -----	03
Figura 2 -	Folhagem da erva baleeira (<i>Cordia verbenacea</i>) -----	14
Figura 3 -	Preparação do extrato bruto metanólico de <i>Cordia verbenacea</i> ----	25
Figura 4 -	Filtração em gel de Sephadex G-75 de 500 mg do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	45
Figura 5 -	Cromatografia em SP-Sephadex C-25 da fração S _{III} -----	46
Figura 6 -	Fluxograma para fracionamento do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> purificação e identificação do ácido rosmarínico -----	48
Figura 7 -	CCD das frações obtidas do extrato metanólico de <i>Cordia verbenacea</i> -----	49
Figura 8 -	Purificação da fração 3 (F3) em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência -----	51
Figura 9 -	CCD da fração CL6 -----	53
Figura 10 -	Espectro de RMN de H ¹ para amostra CL6 à 300 MHz diluída em DMSO-d ₆ -----	54
Figura 11 -	Espectro de RMN de C ¹³ para amostra CL6 à 75 MHz diluída em DMSO-d ₆ -----	55
Figura 12 -	Espectro de absorção na região do I.V. da amostra CL6 -----	56
Figura 13 -	Estrutura da fração CL6 (ácido rosmarínico) -----	57
Figura 14 -	Efeito do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i> -----	58
Figura 15 -	Efeito do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I -----	60
Figura 16 -	Efeito do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-II -----	61

Figura 17 - Atividade edematogênica do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i>	62
Figura 18 - Efeito das frações do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I	65
Figura 19 - Efeito das frações do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I	65
Figura 20 - Efeito das frações da fração F3 do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I	66
Figura 21 - Atividade edematogênica das frações obtidas da fração F3 do extrato metanólico de <i>C. verbenacea</i> em CLAE	67
Figura 22 - Efeito do AR sobre a atividade miotóxica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	68
Figura 23 - Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da BthTX-I de <i>B. jararacussu</i>	69
Figura 24 - Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da toxina BthTX-II de <i>B. jararacussu</i>	70
Figura 25 - Efeito do AR sobre a atividade fosfolipásica do veneno bruto e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA ₂ de <i>B. jararacussu</i>	72
Figura 26 - Efeito do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	74
Figura 27 - Efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno de <i>B. jararacussu</i>	75
Figura 28 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	77
Figura 29 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	78
Figura 30 - Estrutura molecular do ácido rosmarinico	87
Figura 31 - Estrutura do ácido rosmarinico em três dimensões	88

RESUMO

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* se caracterizam por induzir miotoxicidade, edema, coagulação, hemorragia e atividade fosfolipásica. O veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (VBj) é conhecido pela sua alta atividade miotóxica e edematogênica e suas principais miotoxinas BthTX-I e II induzem necrose muscular, edema, lise de lipossomas e citotoxicidade. A busca de tratamentos alternativos contra os envenenamentos ofídicos tem freqüentemente induzido pesquisas científicas com animais resistentes e extratos vegetais. A espécie vegetal *Cordia verbenacea*, popularmente conhecida como baleeira, é utilizada pela população como cicatrizante e antiinflamatória. O extrato metanólico (EM) desta espécie inibiu significativamente o edema de pata provocado pelas BthTX-I e II. O EM foi fracionado em Sephadex LH-20, sendo a fração 3 aplicada em CLAE permitindo o isolamento do ácido rosmarínico (AR). A estrutura molecular foi determinada por métodos espectrofotométricos como: RMN ¹H, RMN ¹³C, IV, COSY, HMQC e HMBC. O AR não inibiu significativamente as atividades coagulante e anticoagulante realizadas *in vitro*, mas mostrou ser bastante eficaz para inibição do edema e miotoxicidade induzida pelas BthTX-I e II, mas não foi tão eficiente para inibir a necrose induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu*. A hemorragia provocada pelo VBj foi inibida pelo AR em doses elevadas (30 e 50 mg), demonstrando a especificidade deste princípio ativo na inibição de fosfolipases A₂ básicas (BthTX-I e II).

SUMMARY

The *Bothrops* snake venoms are characterized by the propensity to induce diverse physiopathological effects such as: miotoxicity, edema, coagulation, hemorrhaging, and phospholipasic activities. The *Bothrops jararacussu* venom is known for its high miotoxic and edematogenic activity. The mainly miotoxins (BthTX-I e II) this venom induce muscular necrosis, edema, smoothing of liposome and citotoxicity. The search for alternative treatments against snake poisonings has frequently led to scientific research with resistant animals and vegetable extracts. The vegetable species *Cordia verbenacea*, commonly known as "baleera", is used by the population as a scar-former and anti-inflammatory. The methanolic extract (ME) significantly inhibited paw edema provoked by toxins BthTX-I and II. The ME went fractionize in Sephadex LH-20 and the number 3 fraction was applied in HPLC, isolating the rosmarinic acid (RA). The molecular structure was detremined by spectrophotometric methods: NMR ^1H , NMR ^{13}C , IV, COSY, HMQC and HMBC. The RA proved to be fairly effective in inhibiting edema and miotoxicity induced by BthTX-I and II, but was not as efficient in inhibiting necrosis, coagulating and anti-coagulating induced by *Bothrops jararacussu* crude venom and BthTX-II. RA in elevated doses inhibited hemorrhage produced by this venom. This effect demonstrated the specificity of this active potion in inhibiting basic phospholipases A_2 (BthTX-I and II).

*O mistério da vida me causa
A mais forte emoção,
É o sentimento que suscita a beleza
E a verdade, cria a arte e a ciência.
Se alguém não conhece esta sensação
Ou não pode mais experimentar
Espanto ou surpresa,
Já é um morto vivo
E seus olhos se cegaram.*

(Albert Einstein)

1 -INTRODUÇÃO

1.1 - Serpentes

Existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes no mundo, sendo que apenas 410 (13,7%) são consideradas venenosas e classificadas de acordo com suas características morfológicas em 4 famílias: *Viperidae*, *Elapidae*, *Hydrophyidae* e *Colubridae*.

No Brasil 256 espécies foram catalogadas até o momento, sendo 69 venenosas (27%). Das 69 espécies de serpentes venenosas, 32 pertencem ao gênero *Bothrops*; 29 ao gênero *Micrurus*; 6 ao gênero *Crotalus* e 2 ao gênero *Lachesis* (BARRAVIERA, 1994; BARRAVIERA & PEREIRA, 1999).

Anualmente ocorrem cerca de 20.000 acidentes ofídicos no Brasil, sendo que o número de óbitos dificilmente ultrapassa o número de 300 pessoas por ano.

A maioria destes acidentes ocorrem nas áreas rurais e nas matas, acometendo principalmente, trabalhadores rurais. As serpentes atacam o homem, por se sentirem ameaçadas e o fazem no intuito de se defenderem.

O gênero *Bothrops*, pertencente à família *Viperidae*, compreende muitas espécies com distribuição que vai do México à Argentina sendo responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (ROSENFELD, 1971).

Normalmente, os ofídios são divididos, quanto a dentição, em quatro grupos ou séries (VITAL BRAZIL, 1982): Série áglifa, opistóglifa, proteróglifa e solenóglifa. O gênero *Bothrops* pertence a série solenóglifa. Serpentes desta série apresentam um par de dentes muito desenvolvido, provido de canal central que se comunica com o canal excretor da glândula de veneno. Esses dentes são móveis e, em repouso, ficam deitados e voltados para trás.

Esta divisão está baseada, na capacidade inoculadora do veneno. VITAL BRAZIL (1982) considera como “verdadeiramente peçonhentas as serpentes capazes de inocular o veneno em suas presas naturais, a fim de capturá-las para sua alimentação, e acidentalmente, no homem ou em outros animais por instinto de defesa. Desta forma considera-se somente as serpentes proteróglifas (*Elapidae*) e solenóglifas (*Viperidae*) como sendo peçonhentas. Sob o ponto de vista biológico, devem ser consideradas peçonhentas todas as serpentes possuidoras de glândulas capazes de secretar substâncias tóxicas, independente da maior ou menor capacidade de inocular esta substância (JIM & SAKATE, 1999).

A espécie *Bothrops jararacussu* (Fig. 1) pertence a série solenóglifa, que são as serpentes mais evoluídas de acordo com a classificação pela dentição.



Figura 1 – Serpente *Bothrops jararacussu* pertencente a série solenóglifa, com as presas voltadas para trás e os demais dentes são menores e maciços.

As espécies do gênero *Bothrops* apresentam as mesmas características de envenenamento, algumas apresentam atividade hemorrágica mais acentuada,

outras espécies demonstram maior atividade fosfolipásica, mas considerando os aspectos gerais de envenenamento, todas as espécies apresentam similaridade; exemplos de espécies deste gênero: *jararaca*, *jararacussu*, *moojeni*, *atrox*, *pirajai*, *alternatus*, *neuwiedii*, *insularis*, *erythromellis*, entre outras (GUTIÉRREZ, 2002).

1.2 – Venenos

O veneno das serpentes peçonhentas é composto de substâncias simples e complexas, cuja proporção e características específicas variam entre as diferentes espécies conhecidas (TU, 1977). O veneno é uma mistura de várias toxinas, enzimas e peptídeos, os quais induzem uma diversidade de efeitos farmacológicos em suas vítimas. Apesar da função primária do veneno das serpentes ser a captura de suas presas, ele pode ser usado secundariamente como defesa, causando acidentes em seres humanos (AMARAL, 1977).

Os venenos das serpentes, especialmente da família *Viperidae* contêm um grande número de proteínas farmacológica e bioquimicamente ativas, além de serem mais complexos que os pertencentes à outras famílias (DAL PAI & SANTO NETO, 1994). Cerca de 90 % do peso seco do veneno consiste de proteínas como metaloproteases, fosfolipases e L-amino ácido oxidases. Os componentes não protéicos podem ser divididos em orgânicos e inorgânicos como aminoácidos livres, peptídios, nucleotídios, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, ânions e cátions.

A fosfolipase A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) é uma enzima amplamente encontrada nos venenos de serpentes. Muitos pesquisadores a tem estudado devido às suas propriedades químicas e seus efeitos biológicos. É uma enzima estável (VARANDA & GIANNINI, 1999) e tem sido isolada de uma variedade de venenos animais (serpentes, abelhas, escorpiões e pâncreas de mamíferos). Os venenos das

espécies de *Bothrops*, como *B. jararacussu* e *B. atrox*, possuem alta atividade fosfolipásica (VIDAL & STOPANN, 1971; VIDAL *et al.*, 1972).

O envenenamento causado por este gênero de serpentes, induz lesão tecidual local. Este efeito aparece relativamente rápido em humanos, cerca de uma a três horas após o acidente. A necrose muscular causada pelo veneno deve-se à ação de miotoxinas, algumas das quais possuem estrutura homólogas a PLA₂s. As miotoxinas afetam a integridade da membrana plasmática desenvolvendo no tecido muscular uma isquemia, como conseqüência da drástica lesão vascular, lesões arteriais e hemorragias. A porção muscular necrosada pode regenerar, entretanto, em muitos casos a regeneração é pobre, principalmente devido a alteração da microvasculatura muscular, ocorrendo formação de abscessos.

A ação miotóxica provocada pelos venenos ou miotoxinas isoladas pode ser demonstrada através de alterações histológicas analisadas microscopicamente e de testes laboratoriais pelo perfil enzimático de liberação de enzimas como CK (Creatina Cinase), LDH (Lactato desidrogenase) e determinação de mioglobulina no sangue (BATINA, 1997).

O mensuramento dos níveis de CK no soro sanguíneo é um método clínico estável para estimar o envolvimento de células musculares na lesão e/ou mionecrose (MEBS *et al*, 1983). O efeito de veneno de serpentes nos níveis de CK foram investigados usando os venenos de *Trimeresurus flavoviridis* (CHINZEI, 1978; NAKADA *et al.*, 1980), *B. asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980), *Micrurus nigrocintrus* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980), *B. atrox* (da SILVA *et al.*, 2001) e *B. jararacussu* (VERONESE *et al.*, 2003).

GUTIÉRREZ *et al.* (1991) e DOS SANTOS *et al.* (1992) estudaram a patogênese da mionecrose induzida pelo veneno de *B. jararacussu* e pelas toxinas BthTX-I e II, em camundongos e observaram que esta toxina induz um rápido aumento dos níveis de CK plasmática, atingindo níveis máximos de liberação em um tempo de 3 h, ocorrendo diminuição desses níveis nos tempos seguintes. Observações histopatológicas e ultraestruturais indicam que a BthTX-II afeta as fibras dos músculos esqueléticos por alterarem primeiramente a membrana plasmática.

Enquanto o aumento dos níveis de CK apresentam uma boa correlação com a destruição do tecido muscular quando se usa proteínas puras, os efeitos com o veneno bruto precisam de interpretações mais cuidadosas, pelo fato do veneno bruto apresentar vários constituintes com efeitos farmacológicos adversos (MEBS *et al.*, 1983).

As PLA₂s demonstram uma relevante resposta inflamatória, contribuindo para o edema e outras reações teciduais (PRUZANSKI & VADAS, 1991). As PLA₂s isoladas de venenos, têm sido muito utilizadas em modelos de testes para edema (VISHWANATH *et al.*, 1987; CIRINO *et al.*, 1989, CALHOUN *et al.*, 1989; ROSENBERG, 1990).

HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* (1988) foram os primeiros a isolar e caracterizar as proteínas do veneno de *Bothrops jararacussu*, responsáveis pela necrose muscular: a BthTX-I e a BthTX-II (bothropstoxinas). A BthTX-I é uma proteína básica de cadeia única, PM aproximadamente 14.000, 7 pontes dissulfeto e pI = 8,2.

FLETCHER & JIANG (1998) demonstraram que quando se adiciona a BthTX-I em cultura de células, há liberação de ácidos graxos devido a hidrólise de fosfolípidos de membrana. Quando a BthTX-I é tratada com Brometo p-bromofenacila (BPB), essa atividade na cultura de células é baixa, sugerindo que a toxina possa hidrolisar fosfolípidos.

A BthTX-II é uma miotoxina com atividade fosfolipase A₂ sobre lecitina de gema de ovo e foi bioquimicamente caracterizada em termos de composição em aminoácidos, peso molecular e ponto isoelétrico por HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* (1988).

CINTRA *et al.* (1993), através da determinação da estrutura primária, demonstraram que a BthTX-I é uma miotoxina Lys₄₉ contendo 121 resíduos de aminoácidos e apresentando grande homologia com as fosfolipases A₂ miotóxicas de *Agkistrodon*, *Trimeresurus* e *Bothrops*, mas diferenças bem definidas quando comparada com proteínas que apresentam atividade fosfolipásica. Essas diferenças estão presentes na alça de ligação do íon Ca⁺⁺, tais como Asp₄₉ → Lys₄₉, Tyr₂₈ → Asn₂₈ e Gly₃₂ → Leu₃₂, conservando-se os resíduos envolvidos no sítio catalítico (His₄₈ e Asp₉₉) com mutações nos aminoácidos hidrofóbicos que circundam o sítio ativo, o que deve justificar a ausência de atividade enzimática.

O veneno da serpente *B. jararacussu* apresenta além de fosfolipases, outras proteases purificadas como Jararacussina-I (BORTOLETO *et al.*, 2002), uma enzima que apresenta atividade coagulante. O veneno apresenta atividade hemorrágica, demonstrando indícios de conter metaloproteases em sua composição.

1.3 – Efeitos farmacológicos e tóxicos do veneno do gênero *Bothrops*

A ação do veneno é principalmente proteolítica, coagulante e hemorrágica. Os sintomas das vítimas são dor, edema, rubor, equimose (formação de bolhas) e necrose. A hipotensão e o choque periférico são observados em acidentes graves e são devidos à liberação de mediadores vasoativos. Ocorre aumento do tempo de coagulação sangüínea. A vítima pode falecer por insuficiência renal aguda e/ou poderá ter infecção secundária por bactérias que são encontradas na flora bucal da serpente (AMARAL, 1977).

A mortalidade causada pelas espécies botrópicas, foi estimada em 2,4% podendo atingir 8% quando não tratadas devidamente (World Health Organization, 1981). Nestes casos o edema, a hemorragia e a necrose muscular são as mais sérias manifestações clínicas locais, causando incapacidade prolongada ou permanente do membro atingido. Alguns componentes isolados dos venenos do gênero *Bothrops*, tais como fatores hemorrágicos (MANDELBAUM *et al.*, 1976, 1984), enzimas que provocam distúrbios da coagulação sangüínea (ASSAKURA *et al.*, 1985; HOFMANN & BON, 1987), e miotoxinas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988) são responsáveis pelos sintomas clínicos do envenenamento botrópico.

A inflamação é um fenômeno muito comum no envenenamento botrópico, o processo inflamatório pode ser desencadeado por vários estímulos como: agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e lesão térmica ou provocada por outros agentes físicos. Cada estímulo provoca um padrão característico de resposta, que representa uma variação muito pequena do mesmo tema.

Macroscopicamente, a resposta geralmente é acompanhada de sinais clínicos bem conhecidos como: eritema, edema, hiperestesia (hiperalgesia) e dor.

O edema local é outra típica manifestação de envenenamento botrópico, independente da via de inoculação. O edema é acompanhado de dor, que pode variar de discreta a intensa. Isto é causado, provavelmente pela combinação de elementos tais como, efeito direto do veneno sobre os vasos e liberação de mediadores endógenos como, histamina, cininas e prostaglandinas devido a ação dos componentes dos venenos sobre os mastócitos, cininogênios e fosfolípeos, respectivamente. Em alguns casos, o edema é responsável pela elevação da pressão intersticial hidrostática nos compartimentos musculares. Além da sua ação sobre células musculares e microvasculatura, o veneno botrópico também afeta artérias, causando trombose e lesão das paredes arteriais. Lesão arterial causa isquemia e necrose futura. Em adição, este veneno afeta nervos intramusculares (BARRAVIEIRA, 1994).

LANDUCCI *et al.* (1998) demonstraram que a formação do edema é dependente da ativação de células mastocitárias, como havia observado com outras fosfolipases A₂ (CIRINO *et al.*, 1989; WANG & TENG, 1990; MORENO *et al.*, 1992). Assim os resultados sugerem que a hidrólise de fosfolípeos pela fosfolipase A₂ não é essencial para a formação do edema.

A hemorragia é causada pela ação de metaloproteases que provavelmente degradam colágeno e outros componentes da lâmina basal dos vasos capilares. Como consequência os capilares são rompidos, promovendo equimoses e sangramentos. O veneno possui uma ação sobre os fatores de coagulação, alterando o tempo de coagulação (TC). Os venenos das serpentes do gênero

Bothrops diminuem o tempo de coagulação, por atuarem sobre fatores da cascata de coagulação e sobre a trombina (GUTIÉRREZ & CHAVES, 1980; GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; QUEIROZ & PETTA, 1984).

A hemorragia, uma das mais evidentes atividades biológicas dos venenos da família *Viperidae*, é a mais relevante patofisiologia do envenenamento (BJARNASSON & FOX, 1994). A medição do halo hemorrágico obtido após a injeção i.d. do veneno (KONDO *et al.*, 1960; OHSAKA *et al.*, 1966) é específico, rápido e reprodutível.

Os danos hemorrágicos locais são rápidos; a patogênese do veneno é complexa, envolvendo ação combinada de metaloproteases e outros componentes existentes no veneno bruto (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995).

Um grande número de metaloproteases estão sendo isoladas dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, como *B. atrox*, *B. moojeni* (ITOH *et al.*, 1987) e *B. jararaca* (NISHIDA *et al.*, 1994). O veneno da serpente *B. jararacussu* não apresenta hemorragia tão intensa como os venenos de outras serpentes botrópicas, devido a este fato estudos envolvendo veneno de *Bothrops jararacussu* com atividade hemorrágica não são muito explorados, mas o veneno não deixa de demonstrar este dano local no tecido.

1.4 – Substâncias naturais antiofídicas

A busca de novos antídotos para o envenenamento por serpentes é muito comum principalmente pela população rural e indígena, que acreditam na sabedoria de raizeiros e pajés. Para as duas populações as plantas são rica fonte de alimento e medicamento, buscando a cura pelo uso de plantas (MOREIRA, 1994).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, lignanas, é de grande importância para a terapia de acidentes ofídicos (CHECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Em quase todas as localidades do mundo, onde acidentes ofídicos ocorrem, numerosas espécies de plantas são usadas pela medicina popular para tratar os efeitos de picadas de serpentes (MARTZ, 1992; OTERO *et al.*, 2000; MEBS, 2000).

É grande a evidência de que constituintes químicos de plantas – os chamados metabólitos secundários – possam ser responsáveis pelo efeito de neutralização da ação de venenos de serpentes devido a provável capacidade de interagir com macromoléculas alvo (MORS *et al.*, 2000).

Em toda a história, pesquisadores buscam drogas com menos efeitos colaterais possíveis. Além da evidente importância das plantas como fonte vital para manutenção do ecossistema terrestre através do fornecimento de energia alimentar, muitas espécies produzem compostos ou substâncias que são benéficas para o homem. As propriedades medicinais de certas plantas, principalmente de origem tropical e subtropical, são conhecidas há milhares de anos. Os fármacos ativos destas espécies de plantas são substâncias estruturalmente complexas e peculiares como alcalóides, terpenos, flavonóides, entre outras. Várias plantas foram pesquisadas buscando a cura por substâncias naturais, onde algumas plantas demonstraram grandes resultados, surgindo assim os produtos fitoterápicos.

Várias espécies de plantas são estudadas e pesquisadas com potencial antiofídico. A neutralização das atividades tóxicas dos venenos de serpentes na medicina folclórica é creditada por remédios caseiros compostos por plantas

(MORS, 1991). A veracidade da ação farmacológica de algumas espécies utilizadas popularmente no Brasil, vem sendo investigadas experimentalmente (VAN BEEK *et al.*, 1984; MORS, 1991; RUPPELT *et al.*, 1991; PEREIRA *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1999; MEBS, 2000; BATINA *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2000; 2001).

Os procedimentos usados, popularmente para a administração destas plantas, são: aplicação tópica da seiva ou do vegetal sobre a área picada, mastigação de folhas ou cascas ou ingestão de extratos e chás. Mas a eficácia desses tratamentos, na maioria dos casos, não está comprovada (MEBS, 2000).

O uso de plantas medicinais, popularmente conhecidas como antiofídicas, têm sido amplamente estudado, para verificar e comprovar seus efeitos terapêuticos.

BATINA *et al.* (2000) demonstraram que o extrato aquoso da planta *Tabernaemontana catharinensis* foi capaz de inibir a atividade letal e miotóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Posteriormente, o referido extrato foi fracionado e foram identificados 6 alcalóides indólicos (PEREIRA *et al.*, 1999). O estudo da atividade antiofídica destes alcalóides demonstra que o 12-metoxi-4-metilvoacolatina foi capaz de inibir a atividade letal do veneno de *C. d. terrificus* (VERONESE *et al.*, 1997; BATINA *et al.*, 2000). Os alcalóides atualmente é a classe de compostos mais empregados pela medicina, estes são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, porém apresentam toxicidade quando administrados em doses elevadas (HENRIQUES *et al.*, 2002).

BORGES *et al.* (2000) demonstraram a ação anti-peçonha do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*, conhecida popularmente como guaçatonga, para os venenos das serpentes *B. jararacussu*, *B. newiedii*, *B. moojeni*, *C. d. terrificus* e *Micrurus*

frontalis. O extrato da folha dessa planta foi capaz de inibir a atividade enzimática e tóxica desses venenos bem como de fosfolipases A₂ tóxicas isoladas dos mesmos.

Estes mesmos autores demonstraram também que o extrato desta espécie vegetal é eficaz na neutralização das atividades proteolítica e hemorrágica induzidas por venenos botrópicos e metaloproteases isoladas de *B. asper* e *B. newwiedi* (BORGES *et al.*, 2001).

VERONESE *et al.* (2003) demonstraram que o extrato aquoso de *Tabernaemontana catharinensis* foi efetivo em inibir a miotoxicidade *in vitro* provocada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e pelas miotoxinas BthTX-I e II. No entanto este mesmo apresentou atividade hemorrágica e foi capaz de potencializar esta atividade induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (ESMERALDINO, 1998).

1.4.1 *Cordia verbenacea*

Seguindo esta mesma linha de pesquisa, alguns estudos foram feitos no sentido de comprovar os efeitos antiofídicos e antiinflamatórios da planta *Cordia verbenacea* popularmente conhecida como balieira ou baleeira.

Cordia verbenacea pertence à família Boraginaceae (Fig. 2). Estudos fitoquímicos realizados com este gênero descreveram a presença de flavonóides glicosilados ou não, rutina, derivados fenólicos, hesperidina, e outros (FICARRA *et al.*, 1995).



Figura 2 – Folhagem da erva baleeira (*Cordia verbenacea*)

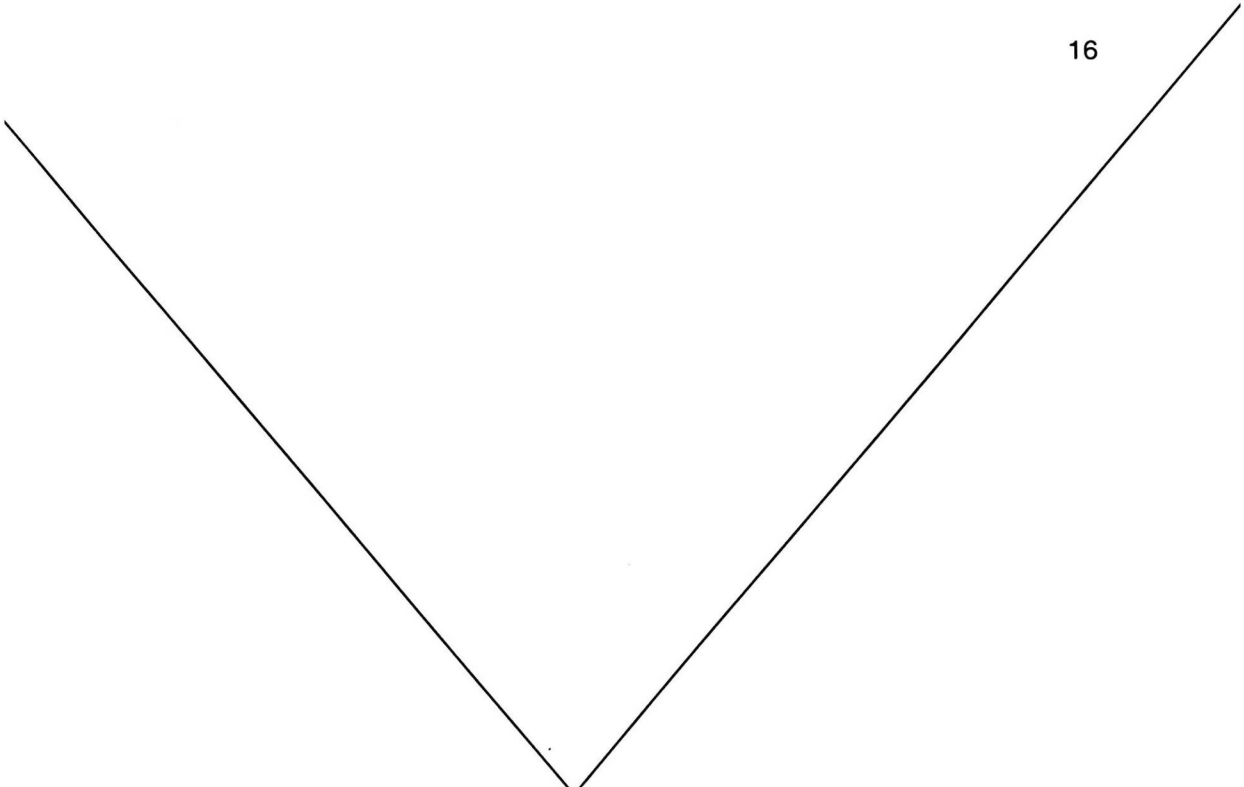
A planta *C. verbenacea* no Brasil é geralmente encontrada no litoral dos estados de São Paulo e Paraná e também no cerrado do estado de Minas Gerais. Extratos dessa planta são utilizados pela população brasileira como cicatrizante e antiinflamatória, ajudando assim no tratamento de úlceras gastro-intestinais (SÉRTIE *et al.*, 1988). Estes pesquisadores demonstraram que o extrato bruto desta planta e uma substância isolada e identificada, denominada artemetina (flavonóide) exibe efeito antiinflamatório e baixa toxicidade em ratos (SÉRTIE *et al.*, 1988; 1990).

BAYEUX *et al.* (2002) isolaram da *C. curassavica* o mesmo flavonóide (artemetina), que demonstrou os mesmos efeitos antiinflamatórios sobre carregenina e baixa toxicidade. Estes mesmos efeitos foram comprovados nos frutos da planta *C. myxa* (AL AWADI *et al.*, 2001).

Na família Boraginaceae já foram descritos vários tipos de substâncias isoladas, como flavonóides, alcalóides e ácido gama-linolênico (GUIL GUERRERO *et al.*, 2001; LIDELL, 2001; WOLLENWEBER *et al.*, 2002).

1.5 - Tratamento do acidente ofídico

O tratamento usual contra picadas de serpentes é a soroterapia, que consiste na administração intravenosa de antivenenos monovalentes e polivalentes. Se a administração do antiveneno for iniciada imediatamente após o envenenamento, a neutralização dos efeitos sistêmicos é usualmente alcançada com sucesso, mas a neutralização da lesão tecidual local é muito difícil de ser alcançada, muitas vezes resultando em uma seqüela permanente isto é, na perda do tecido (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Devido a relevância dos efeitos locais no envenenamento, induzido por serpentes do gênero *Bothrops* torna-se necessário a busca de novos antídotos.



2 -OBJETIVO

**Arrisque perder o orgulho;
o conhecimento não se aprofunda sem riscos**

Dotterweich

O presente trabalho teve por objetivo:

1 - Avaliar a ação do extrato metanólico de *Cordia verbenacea* sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e por suas principais toxinas, BthTX-I e BthTX-II.

2 – Isolar, caracterizar e identificar o princípio ativo do extrato metanólico responsável pela inibição da atividade edematogênica.

3 – Avaliar a ação do princípio ativo quanto à inibição das atividades miotóxica, hemorrágica, fosfolipásica, coagulante e anticoagulante.

3 -MATERIAIS

*Por minha sabedoria eu governo
O primeiro princípio de movimento.
Minhas mãos são a oitava esfera,
Como meu Pai ordenou,
Meus malhos são os sete planetas
Com os quais eu forjo belas coisas.
A substância com que modelo meu trabalho
E todas as coisas sob o céu,
Eu obtenho apenas dos quatro elementos
Pela minha virtude e eficácia
Eu torno o imperfeito perfeito,
Seja um metal ou um corpo humano.
Eu misturo seus ingredientes
E tempero os quatro elementos.
Eu reconcilio opostos e acalmo sua discórdia.*

(John A. Mehung)

3.1 – Veneno

Veneno bruto liofilizado de *B. jararacussu* foi adquirido do Instituto Butantan de São Paulo.

3.2 – BthTX-I e II

O veneno bruto de *B. jararacussu* foi fracionado, para serem obtidas as miotoxinas BthTX-I e II, no laboratório de toxinologia da FCFRP-USP, segundo o método descrito por HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* (1988)

3.3 – Animais

Camundongos machos, linhagem suíça com peso de 18-22 g, procedentes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

3.4 – Vegetal

As folhas da planta *Cordia verbenacea* foram coletadas na época de floração no campus da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

3.5 – Plasma

O plasma humano utilizado, foi procedentes do Hemocentro da cidade de Ribeirão Preto.

3.6 – Fosfolipase A₂ ácida

A BthA-I-PLA₂ foi cedida pelo Prof. Dr. Andreimar M. Soares do laboratório de bioquímica e biologia estrutural da Unidade de Biotecnologia – UNAERP.

3.7 – Reagentes em geral

- kit CK-UV Sigma Chem. Co.
- Persulfato de amônio – Merck; dodecil sulfato de sódio (SDS) – Reagen; tetrametileno diamina (TEMED) – Sigma Chem. Co.; Acrilamida – Sigma

Chem. Co.; Azul Coomassie G-250 – Sigma Chem. Co.; ácido acético – Reagen; Metanol (P.A) – Synth; Clorofórmio (P.A) – Synth; Metanol (HPLC) – Merck.

Os demais reagentes foram todos de grau analítico.

3.8 – Resinas

- Sephadex G-75 – Merck; Sephadex C-25 – Merck; Sephadex LH-20 – Merck; Silica GF – Sigma Chem. Co.

4 - MÉTODOS

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o SENHOR e através do céu, passavam cenas de minha vida .

Para cada cena que se passava, percebi que eram deixadas dois pares de pegadas na areia; um era o meu e o outro do SENHOR. Quando a última cena de minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia, notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiados do meu viver.

Isso aborreceu-me deveras, e perguntei então ao SENHOR:

" SENHOR, tu me disseste que, uma vez que eu resolvi te seguir, tu andarias sempre comigo, mas notei que durante as maiores atribulações de meu viver havia na areia dos caminhos da minha vida, apenas um par de pegadas. Não compreendo porque nas horas que mais necessitava de ti, tu me deixaste?"

O SENHOR me respondeu:

"Meu precioso filho, EU te amo e jamais te deixaria nas horas da tua prova e de teu sofrimento. Quando viste na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí, que EU te carreguei nos braços".

Oração pegadas na areia.

4.1 – Purificação das toxinas BthTX-I e BthTX-II do veneno de *Bothrops jararacussu*

4.1.1 – Preparação da amostra

Amostras de 500 mg do veneno bruto liofilizado de *B. jararacussu* foram suspensas em 5,0 mL de tampão formato de amônio (NH_4FO) 0,05 M, pH 3,5 e centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos a 0° C. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem de proteínas pelo método do microbiureto (ITZHAKI & GILL, 1964) e leitura da absorvância em 280 nm.

4.1.2 – Filtração em gel de Sephadex G-75

O sobrenadante límpido obtido anteriormente foi aplicado a uma coluna contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm), previamente equilibrada, e eluído com tampão formato de amônio 0,05 M, pH 3,5 (CINTRA *et al.*, 1993). Foram coletadas frações de 10 mL, em coletor de frações LKB acoplado a um sistema ultravioleta e a um registrador num fluxo de 30 mL/h à temperatura ambiente.

A absorvância das frações coletadas foram determinadas em 280 nm, em espectrofotômetro Beckman DU-640. As frações foram reunidas em 4 picos, dializadas e liofilizadas.

4.1.3 – Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25

Primeiramente foi feita a preparação da resina SP-Sephadex C-25, suspendendo-a em uma solução de NaOH 0,5M, filtrada em funil de placa sinterizada sob pressão reduzida e lavada com água destilada até pH neutro. Em seguida, foi suspensa em HCl 0,5M e lavada exaustivamente com água destilada até atingir pH neutro. A resina foi então suspensa em tampão acetato de amônio (NH_4Ac) 0,1M pH 5,0 deaerada.

A fração S_{III} obtida da filtração em gel de Sephadex G-75 (item 4.1.2) foi submetida à cromatografia de troca iônica. Para tal a fração foi dissolvida em 5,0 mL de tampão acetato de amônio 0,1 M, pH 5,0 e aplicada à coluna (45 x 2,0 cm) contendo SP-Sephadex C-25, previamente preparada e equilibrada. Alíquotas foram retiradas para dosagem de proteínas e para leitura de absorvância em 280 nm.

A amostra foi eluída com um gradiente de concentração de acetato de amônio 0,1 M, 1,0 M e 2,0 M, pH 5,0. Os valores numéricos da concentração molar foram obtidos através da medida de condutividade nos tubos lançados na reta padrão traçada com concentrações conhecidas de acetato de amônio.

A condutividade foi medida em um condutímetro digimed CD 20.

Frações de 5,0 mL foram coletadas, num fluxo de 13 mL/h em temperatura ambiente e suas absorvâncias determinadas em 280 nm. As frações foram dializadas e liofilizadas. Foram obtidas nove frações, sendo as duas últimas ($S_{III}SP_{IV}$ e $S_{III}SP_{V}$) a BthTX-II e BthTX-I, respectivamente.

4.1.4- Dessalificação em Gel de Sephadex G-10

As frações $S_{III}SP_{IV}$ e $S_{III}SP_{V}$ (BthTX-II e I, respectivamente), obtidas da cromatografia em SP-Sephadex C-25 (item 4.1.3), após liofilização, foram dissolvidas em 5,0 mL de bicarbonato de amônio 0,3 M, aplicados à coluna (190x2,5 cm) contendo Sephadex G-10 e então eluídas com o mesmo tampão, num fluxo de 24 mL/h. Amostra foram retiradas para leitura da absorvância em 280 nm e a dosagem de proteínas foi feita segundo o método do microbiureto (ITZHAKI & GILL, 1964).

Frações de 5,0 mL por tubo foram coletadas e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas para a detecção dos íons amônio e acetato. Para detecção dos íons

acetato foi aplicado o teste de lantânio e iodo segundo FEIGL (1954) e de amônia usando reagente de Nessler (KOLTRHOFF *et al.*, 1971).

4.2 – Preparação das soluções de veneno e das toxinas BthTX-I e BthTX-II

O veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e as toxinas foram dissolvidas em PBS (solução salina tamponada em fosfato) na concentração de 1,25 mg de veneno/Kg/25 µL PBS e 2,5 mg de BthTX-I ou BthTX-II/Kg/25 µL PBS e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos.

4.3 – Coleta e classificação do vegetal

Os exemplares de *Cordia verbenacea* foram coletados no Campus da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Lin Chau Ming do departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu e a excicata foi depositada no herbário da Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) com o n° de registro 259.

4.4 – Preparação do vegetal

Após a coleta, as folhas de *Cordia verbenacea* foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 40° C. Após a secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho, para fornecer pó fino.

4.5 – Preparação do extrato de *Cordia verbenacea*.

As folhas secas e moídas (375,6 g) foram maceradas com clorofórmio (1.750 mL) por 3 dias à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O procedimento de extração foi repetido três vezes com o mesmo solvente. Após a extração com

clorofórmio o mesmo procedimento foi utilizado para obtenção do extrato metanólico como demonstra a Figura 3.

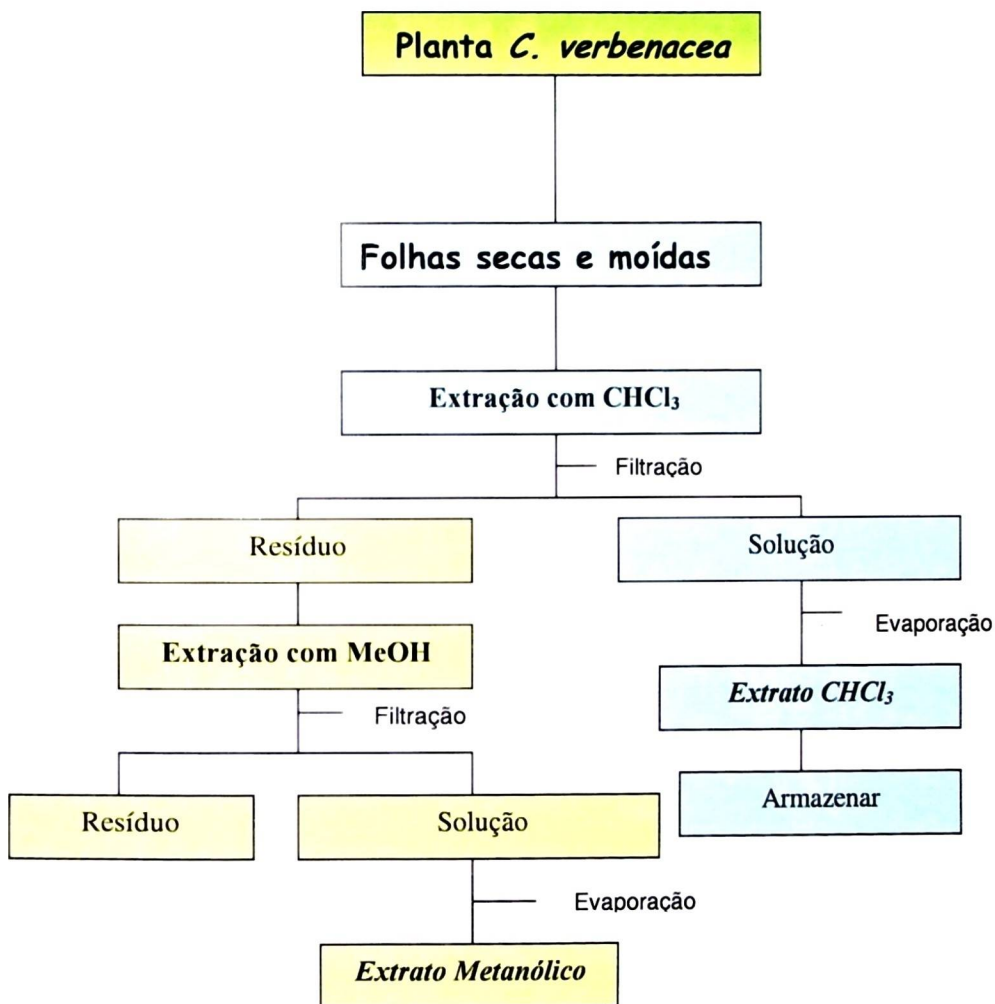


FIGURA 3 - Preparação do extrato bruto metanólico de *Cordia verbenacea*.

4.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato metanólico de *Cordia verbenacea* foi monitorado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se placas de vidro revestidas com sílica gel GF (SIGMA). Em um tubo eppendorf contendo 5 mg de extrato, adicionou-se 200 µL de metanol. As amostras foram aplicadas nas cromatoplasas a 1cm de uma das extremidades, deixando-se secar à temperatura ambiente.

O desenvolvimento ocorreu em cuba fechada, previamente saturada com a seguinte fase móvel: Clorofórmio/ Metanol (8:2).

Para a revelação dos componentes do extrato foram utilizados os reveladores: luz UV (ultravioleta) com comprimentos de onda de 254 e 366 nm e vanilina sulfúrica (0,5 g vanilina/ 100 mL etanol/ 2,5 mL ácido sulfúrico), seguida de aquecimento, para a visualização de substâncias orgânicas.

4.7. Fracionamento do extrato bruto metanólico de *C. verbenacea*

4.7.1 Filtração em Sephadex LH-20

O fracionamento foi realizado em coluna contendo Sephadex LH 20 (40 x 1,8 cm), utilizando como fase móvel o solvente metanol (300 mL). As frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, utilizando placas de sílica gel (item 4.6). As frações que apresentaram constituintes idênticos foram agrupadas e posteriormente, administradas em camundongos para avaliar o efeito destas, sobre a atividade edematogênica da BthTX-I do veneno de *Bothrops jararacussu*. Após o agrupamento das frações idênticas, ficamos com três frações, F1, F2 e F3 que foram avaliadas nas doses de 25 e 19 mg/Kg, como mostram as TABELAS 4 e 5 (item 4.9.4).

4.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foi utilizado uma coluna semi-preparativa supelcosil C-18 (25 cm X 10 mm), detector diodearray SPD M-10A, coletor de frações FRC-10A, duas bombas para fase móvel LC-10AD e comunicador CBM-10A da Shimadzu. A fase móvel utilizada foi metanol : água em gradiente 0:10 durante 60 minutos, aumentando a concentração de metanol até obter o gradiente 10:0 e em seguida voltar ao gradiente inicial. O tempo total de corrida da fase móvel foi de 110 minutos, utilizando fluxo a 2,0 mL/min. Foram obtidas, sete frações do CLAE, denominadas de CL1, CL2, CL3, CL4, CL5, CL6 e CL7.

As frações obtidas foram submetidas a determinação da atividade anti-edematogênica (item 4.9.5 – Tabela 6).

4.8. Elucidação estrutural da fração CL6

4.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Bruker DPX-300, operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Os espectros foram obtidos com a amostra (CL6) dissolvida em dimetilsulfóxido hexadeuterado ($\text{DMSO-}d_6$).

4.8.2 Infra-Vermelho (I.V.)

O espectro de absorção na região do I.V. foi obtido com espectrômetro Perkin-Elmer 1420 utilizando 0,2 mg da amostra (CL6).

4.9 Determinação da atividade edematogênica

Para esta determinação foram utilizados camundongos, os quais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, que permaneceram em repouso para adaptação por 24 h. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

O edema foi induzido através de injeção intradérmica na região sub-plantar da pata posterior direita, sendo avaliado com um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (MYTUTOYO, Japão) nos intervalos de 0; 0,5; 1; 2; 4 e 24h após a injeção.

4.9.1 Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*.

Nesta etapa, foram fixadas as doses de veneno bruto em 1,25 mg/Kg (25 µg/animal) para a indução do edema e de extrato metanólico em 25 mg/Kg para a inibição do edema.

Em tubos “ependorf ” foram misturados 25 µL do veneno (1,25 mg/Kg) com 25 µL de extrato (25 mg/Kg) e imediatamente após, administrou-se 50 µL desta mistura aos animais do grupo 1, por via i.d. (TABELA 1). Foram utilizados dois grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 µL) e o outro com veneno (1,25 mg/Kg) misturado com 25 µL de PBS para atingir o volume final de 50 µL .

TABELA 1. Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* administrado por via i.d.

Grupo	Veneno (mg/Kg)	Extrato (mg/Kg)
* PBS	-	-
VB	1,25	-
1	1,25	25

* 50 µL; n=5; proporção veneno:extrato = 0,5:10

4.9.2 Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica das toxinas BthTX-I e II.

A dose de BthTX-I e BthTX-II utilizada para a indução do edema na pata dos camundongos foi a de 2,5 mg/Kg/50 μ L (50 μ g/animal)

Em tubos “eppendorf ” foram misturados 25 μ L da BthTX-I ou BthTX-II (2,5 mg/Kg) com 25 μ L de extrato (25 mg/Kg) e imediatamente após, administrou-se 50 μ L desta mistura aos animais dos grupos 1 e 2, por via i.d., respectivamente (TABELA 2). Foram utilizados três grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 μ L), outro com BthTX-I e outro com BthTX-II (2,5 mg/Kg) misturado com 25 μ L de PBS para atingir o volume final de 50 μ L.

TABELA 2. Avaliação do efeito do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I e BthTX-II administrada por via i.d.

Grupo	BthTX-I (mg/Kg)	BthTX-II (mg/Kg)	Extrato (mg/Kg)
* PBS	-	-	-
BthTX-I	2,5	-	-
BthTX-II	-	2,5	-
1	2,5	-	25
2	-	2,5	25

* 50 μ L; n=5; proporção de toxina:extrato = 1:10

4.9.3 Avaliação da atividade edematogênica do extrato metanólico de *C.*

verbenacea

O extrato foi administrado aos animais por via i.d., para verificar a sua atividade edematogênica. Para isso foram utilizadas três diferentes doses de extrato: 19; 25 e 31 mg/Kg.

O grupo controle recebeu 50 μ L de PBS por via i.d., conforme descrito na TABELA 3.

TABELA 3. Avaliação da atividade edematogênica do extrato metanólico de *C. verbenacea* administrado por via i.d.

Grupo	Extrato (mg/Kg)
* PBS	-
1	19
2	25
3	31

* 50 μ L; n=5

4.9.4 Avaliação do efeito das frações obtidas do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da BthTX-I do veneno de *Bothrops jararacussu*.

As frações F1, F2 e F3 foram avaliadas nas doses de 25 e 19 mg/Kg, como mostram as TABELAS 4 e 5.

Em tubos "ependorf" foram misturados 25 μ L da BthTX-I (2,5 mg/Kg) com 25 μ L da fração (F1 ou F2 ou F3) (25 mg/Kg ou 19 mg/Kg) diluído em 50 μ L de PBS

e imediatamente após, administrou-se 50 μ L desta mistura aos animais, por via i.d. (TABELAS 4 e 5). Foram utilizados dois grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 μ L) e outro com BthTX-I (2,5 mg/Kg), misturado com 25 μ L de PBS para atingir o volume final de 50 μ L.

TABELA 4. Avaliação da atividade anti-edematogênica das frações (F1, F2 e F3) do extrato metanólico de *C. verbenacea* administrado por via i.d.

Grupo	BthTX-I (mg/Kg)	F1 (mg/Kg)	F2 (mg/Kg)	F3 (mg/Kg)
* PBS	-	-	-	-
BthTX-I	2,5	-	-	-
F1	2,5	25	-	-
F2	2,5	-	25	-
F3	2,5	-	-	25

* 50 μ L; n=5; Proporção de toxina:frações = 1:10

TABELA 5. Avaliação da atividade anti-edematogênica das frações (F1, F2 e F3) do extrato metanólico de *C. verbenacea* administrados por via i.d.

Grupo	BthTX-I (mg/Kg)	F1 (mg/Kg)	F2 (mg/Kg)	F3 (mg/Kg)
* PBS	-	-	-	-
BthTX-I	2,5	-	-	-
F1	2,5	19	-	-
F2	2,5	-	19	-
F3	2,5	-	-	19

* 50 µL; n=5; Proporção de toxina:frações = 1:7,5

4.9.5 Avaliação do efeito das frações obtidas em CLAE (CL1 a CL7) da fração F3, sobre a atividade edematogênica provocada pela toxina BthTX-I do veneno de *Bothrops jararacussu*.

As frações obtidas em CLAE (item 4.7.2) foram avaliadas na dose de 8,5 mg/Kg, como mostra a TABELA 6.

Em tubos “eppendorf ” foram misturados 25 µL da BthTX-I (2,5 mg/Kg) com 25 µL da fração (CL1 a CL7) (8,5 mg/Kg) diluídos em 50 µL de PBS e imediatamente após, administrou-se 50 µL desta mistura aos animais, por via i.d. (TABELA 6). Foram utilizados dois grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 µL) e outro administrado com BthTX-I (2,5 mg/Kg), misturado com 25 µL de PBS para atingir o volume final de 50 µL.

TABELA 6. Avaliação da atividade anti-edematogênica das frações (CL1 a CL7) obtidas da fração F3 do extrato metanólico de *C. verbenacea* administrados por via i.d.

Grupo	BthTX-I (mg/Kg)	CL1 (mg/Kg)	CL2 (mg/Kg)	CL3 (mg/Kg)	CL4 (mg/Kg)	CL5 (mg/Kg)	CL6 (mg/Kg)	CL7 (mg/Kg)
* PBS	-	-	-	-	-	-	-	-
BthTX-I	2,5	-	-	-	-	-	-	-
CL1	2,5	8,5	-	-	-	-	-	-
CL2	2,5	-	8,5	-	-	-	-	-
CL3	2,5	-	-	8,5	-	-	-	-
CL4	2,5	-	-	-	8,5	-	-	-
CL5	2,5	-	-	-	-	8,5	-	-
CL6	2,5	-	-	-	-	-	8,5	-
CL7	2,5	-	-	-	-	-	-	8,5

* 50 µL; n=5; Proporção de toxina:frações = 1:3,5

4.10 - Determinação da atividade miotóxica

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, permanecendo em repouso para adaptação por 24 h. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

A miotoxicidade foi induzida através de injeção intramuscular no músculo gastrocnemius direito, sendo o sangue colhido pela veia caudal em capilares heparinizados 3 horas após a injeção. O sangue foi centrifugado a 12.000 x g por 6

min e o plasma obtido foi utilizado para dosagem de CK (SOARES *et al.*, 2000) em um espectrofotômetro Gênesis 2 a 340 nm, utilizando Kit CK-UV Sigma Chem. Co.

4.10.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade miotóxica induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu* e pelas toxinas BthTX-I e II.

Nesta etapa, foram fixadas as doses de veneno bruto e das toxinas em 2,5 mg/Kg para a indução da miotoxicidade e de ácido rosmarínico (AR) em 2,5 mg/Kg e 25 mg/Kg para a inibição da atividade miotóxica.

Em tubos “eppendorf ” foram misturados 25 μ L do veneno, ou BthTX-I, ou BthTX-II (2,5 mg/Kg) com 25 μ L de AR (2,5 ou 25 mg/Kg) e imediatamente após, administrou-se 50 μ L desta mistura aos animais dos grupos AR (1:1) e AR (1:10), por via i.m. (TABELA 7). Foram utilizados cinco grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 μ L), outro com veneno, ou BthTX-I, ou BThTX-II (2,5 mg/Kg), misturado com 25 μ L de PBS para atingir o volume final de 50 μ L e o outro com AR (25 mg/Kg/50 μ L).

TABELA 7. Avaliação do efeito do AR sobre a atividade miotóxica induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu* e pelas toxinas BthTX-I e BthTX-II administrado por via i.d.

Grupo	Veneno (mg/Kg)	BthTX-I (mg/Kg)	BthTX-II (mg/Kg)	AR (mg/Kg)
* PBS	-	-	-	-
VB	2,5	-	-	-
BthTX-I	-	2,5	-	-
BthTX-II	-	-	2,5	-
VB/AR	2,5	-	-	2,5
VB/AR	2,5	-	-	25
BthTX-I/AR	-	2,5	-	2,5
BthTX-I/AR	-	2,5	-	25
BthTX-II/AR	-	-	2,5	2,5
BthTX-II/AR	-	-	2,5	25
AR	-	-	-	25

* 50 μ L; n=5, Proporções de toxinas ou veneno:AR = 1:1 e 1:10.

4.11 - Determinação da atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada *in vitro*, em meio de cultura com gema de ovo (6 gemas/L), CaCl_2 (0,56 g/L) e ágar (20 g/L), com base na metodologia DE HAAS *et al.* (1968). Foram inoculados o veneno bruto (1 μ g), uma fosfolipase A_2 básica a toxina BthTX-II (1 μ g) e uma ácida, a BthA-I-PLA $_2$ (1 μ g) do

veneno de *B. jararacussu* por um período de 24 horas, sendo o diâmetro dos halos formados medidos em mm.

A determinação da quantidade de veneno e toxinas utilizadas foi analisado em experimentos anteriores variando a dose do veneno de *B. jararacussu* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 µg), medindo-se os halos formados pela atividade fosfolipásica em tempos variados (1, 2, 4 e 24 horas após a inoculação do veneno), variando o pH do meio (5, 6, 7 e 8) e variando a temperatura de incubação do meio (25, 30 e 37° C).

4.11.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade fosfolipásica induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu* e pelas toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂.

Nesta etapa, foi fixada a concentração de 1,0 µg/50 µL de veneno bruto ou BthTX-II ou BthA-I-PLA₂ para a indução da atividade fosfolipásica e de AR em 5; 10 e 50 µg para a inibição da atividade fosfolipásica.

Em tubos “eppendorf ” foram misturados 25 µL do veneno ou BthTX-II ou BthA-I-PLA₂ (1,0 µg/25 µL PBS) com 25 µL de AR (5 ou 10 ou 50 µg/25 µL PBS) e imediatamente após foram aplicados ao meio de cultura dos grupos AR (1:5), AR (1:10) e AR (1:50) (TABELA 8). Foram utilizados cinco grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 µL), outro com veneno ou BthTX-II ou BthA-I-PLA₂ (1µg/ 25 µL PBS), misturado com 25 µL de PBS para atingir o volume final de 50 µL e outro com AR (50 µg/50 µL).

TABELA 8. Avaliação do efeito do AR sobre a atividade fosfolipásica induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu* ou pelas toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂

Grupo	Veneno (µg)	BthTX-II (µg)	BthA-I-PLA ₂ (µg)	AR (µg)
* PBS	-	-	-	-
VB	1,0	-	-	-
BthTX-II	-	1,0	-	-
BthA-I-PLA ₂	-	-	1,0	-
VB/AR	1,0	-	-	5,0
VB/AR	1,0	-	-	10
VB/AR	1,0	-	-	50
BthTX-II/AR	-	1,0	-	5,0
BthTX-II/AR	-	1,0	-	10
BthTX-II/AR	-	1,0	-	50
BthA-I-PLA ₂ /AR	-	-	1,0	5,0
BthA-I-PLA ₂ /AR	-	-	1,0	10
BthA-I-PLA ₂ /AR	-	-	1,0	50
AR	-	-	-	50

* 50 µL; Proporções de toxinas ou veneno:AR = 1:5; 1:10 e 1:50.

4.12 - Determinação da atividade anticoagulante

A atividade anticoagulante (VALENTIN & LAMBEAU, 2000) foi realizada utilizando plasma humano (200 µL), CaCl₂ (0,25 mM) e BthTX-II (0,5 µg). O plasma foi colocado um tubo de ensaio em banho-maria à 37° C por 5 min. Após este

intervalo de tempo foi adicionado 0,5 µg de BthTX-II e após 10 min aplicou-se 25 µL de CaCl₂. Após 45 min se o plasma não estiver coagulado então considera-se incoagulável. Para teste controle do plasma não adiciona-se a BthTX-II mas aplica-se PBS, onde o plasma deve coagular no intervalo de 3 a 6 min.

Para determinar a quantidade adequada de BthTX-II a ser adicionada ao plasma foram realizados ensaios com diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5 e 1 µg). Por este teste ser muito sensível, qualquer variação da quantidade de BthTX-II o plasma se torna coagulável. Para garantir o controle do plasma incoagulável foi utilizado o dobro da D.A.M. (Dose anticoagulante mínima).

4.12.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade anticoagulante da toxina BthTX-II.

Nesta etapa, foi fixada a concentração de 0,5 µg/50 µL de BthTX-II para a indução da atividade anticoagulante e de AR em 0,5; 5,0; 15,0 e 25,0 µg para a inibição da atividade anticoagulante.

Em tubos "ependorf " foram misturados 25 µL de BthTX-II (0,5 µg/25 µL PBS) com 25 µL de AR (0,5 ou 5 ou 15 ou 25 µg/25 µL PBS) e imediatamente após, aplicou-se 50 µL desta mistura ao plasma dos grupos AR (1:1), AR (1:10), AR (1:30) e AR (1:50) (TABELA 9). Foram utilizados três grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 µL), outro com BthTX-II (1µg/ 25 µL PBS) misturado com 25 µL de PBS para atingir o volume final de 50 µL e o outro com AR (25 µg/50 µL).

TABELA 9. Avaliação do efeito do AR sobre a atividade anticoagulante de BthTX-II do veneno bruto de *B. jararacussu*.

Grupo	BthTX-II (μg)	AR (μg)
* PBS	-	-
BthTX-II	0,5	-
AR (1:1)	0,5	0,5
AR (1:10)	0,5	5
AR (1:30)	0,5	15
AR (1:50)	0,5	25
AR	-	25

* 50 μL ; Proporções de toxina:AR = 1:1; 1:10; 1:30 e 1:50.

4.13 - Determinação da atividade hemorrágica

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, permanecendo em repouso para adaptação por 24 h. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

A hemorragia foi induzida através de injeção intradérmica na região dorsal, sendo a pele retirada 3 horas após a injeção. O halo hemorrágico formado foi medido em milímetros (mm) segundo método de KONDO *et al.* (1960).

4.13.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. jararacussu*.

Nesta etapa, foi fixada a dose de veneno bruto de *B. jararacussu* em 1,0 mg/Kg (de ROODT *et al.*, 2000) para a indução da hemorragia e de AR em 1; 10; 30 e 50 mg/Kg para a inibição da atividade hemorrágica.

Em tubos “eppendorf ” foram misturados 25 μ L do veneno (1,0 mg/Kg/ 25 μ L PBS) com 25 μ L de AR (1 ou 10 ou 30 ou 50 mg/Kg/ 25 μ L PBS) e imediatamente após, administrou-se 50 μ L desta mistura aos animais dos grupos AR (1:1), AR (1:10), AR (1:30) e AR (1:50), por via i.d. (TABELA 10). Foram utilizados três grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 μ L), outro com veneno (1,0 mg/Kg/ 25 μ L PBS), misturado com 25 μ L de PBS para atingir o volume final de 50 μ L e outro com AR (50 mg/Kg/50 μ L).

4.14 – Determinação da atividade coagulante

A atividade coagulante foi realizada utilizando plasma humano (200 μ L), CaCl_2 (0,25 mM) e veneno bruto (0,23 μ g). O plasma foi colocado em um tubo de ensaio em banho-maria à 37° C por 5 min. Após este intervalo de tempo foi adicionado o veneno bruto. Para teste controle do plasma não adiciona-se o veneno bruto mas aplica-se 25 μ L de CaCl_2 , onde o plasma deve coagular no intervalo de 3 a 6 min.

Para obtermos a D.C.M. (Dose coagulante mínima), do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, foram realizados ensaios com diferentes concentrações (2,0; 1,6; 1,2; 0,8; 0,4; 0,2 e 0,1 μ g).

TABELA 10. Avaliação do efeito do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. jararacussu* administrado por via i.d.

Grupo	Veneno (mg/Kg)	AR (mg/Kg)
* PBS	-	-
VB	1,0	-
AR (1:1)	1,0	1
AR (1:10)	1,0	10
AR (1:30)	1,0	30
AR (1:50)	1,0	50
AR	-	50

* 50 μ L; n=5; Proporção de veneno:AR = 1:1; 1:10; 1:30 e 1:50.

4.14.1 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno bruto de *B. jararacussu*.

Nesta etapa, foi fixada a concentração de 0,23 μ g/25 μ L do veneno bruto para a indução da atividade coagulante e de AR em 0,23; 1,15; 2,3 e 11,5 μ g para a inibição da atividade coagulante.

Em tubos “ependorf ” foram misturados 25 μ L de veneno bruto (0,23 μ g/25 μ L PBS) com 25 μ L de AR (0,23 ou 1,15 ou 2,3 ou 11,5 μ g/25 μ L PBS) e imediatamente após, aplicou-se 50 μ L desta mistura ao plasma dos grupos AR (1:1), AR (1:5), AR (1:10) e AR (1:50) (TABELA 11). Foram utilizados três grupos controles, sendo um administrado com PBS (50 μ L), outro com veneno bruto

(0,23µg/ 25 µL PBS) misturado com 25 µL de PBS para atingir o volume final de 50 µL e o outro com AR (11,5 µg/50 µL).

TABELA 11. Avaliação do efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno bruto de *B. jararacussu*.

Grupo	VB (µg)	AR (µg)
* PBS	-	-
VB	0,23	-
AR (1:1)	0,23	0,23
AR (1:5)	0,23	1,15
AR (1:10)	0,23	2,3
AR (1:50)	0,23	11,5
AR	-	11,5

* 50 µL; Proporções de veneno:AR = 1:1; 1:5; 1:10 e 1:50.

4.15. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS

As toxinas e o veneno bruto, juntamente com o extrato metanólico de *Cordia verbenacea* ou AR foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo técnica de LAEMMLI (1970), utilizando gel de separação a 12% (m/v) em acrilamida e tampão Tris pH 8,3.

O tempo de eletroforese foi de 3 h e 40 min. As amostras de extrato metanólico (25 µg), AR (8,75 µg), VB (2,5 µg), BthTX-I (2,5 µg) e BthTX-II (2,5 µg)

foram dissolvidas em tampão Tris pH 8,3 (20 μ L), mesmo tampão de corrida, e aplicado na eletroforese.

As condições eletroforéticas foram: 200V (voltagem) a uma corrente de 10 mA (Electrophoresis Power Supply EPS 601 – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Após o tempo adequado, o gel foi retirado da placa e corado com Azul Coomassie G-250 0,2% em H₂O/MeOH 1:1 (v/v) durante 1 hora. O descoramento foi obtido com trocas sucessivas de solução de ácido acético glacial a 10% (v/v).

5 -RESULTADOS

Procure onde ninguém procurou,
Estude o que ninguém estudou e
Encontre o que apenas você,
Saberia encontrar.

Autor desconhecido

5.1 Purificação das toxinas BthTX-I e II do veneno de *B. jararacussu*

5.1.1 Filtração em Gel de Sephadex G-75

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* através da filtração em gel de Sephadex G-75, foi desdobrado em 6 frações designadas S_{IA}, S_{IB}, S_{IIA}, S_{IIB}, S_{III}, S_{IVA} e S_{IVB} (Fig. 4).

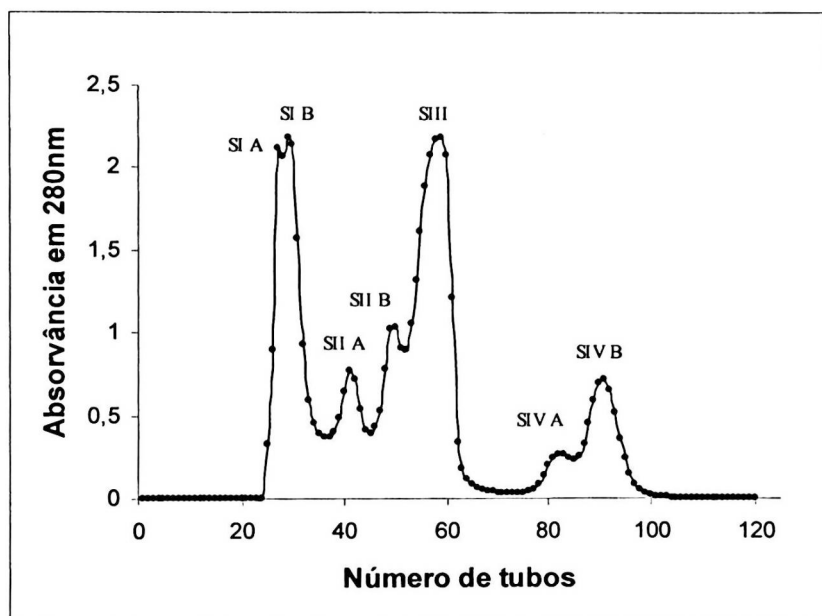


Figura 4 - Filtração em gel de Sephadex G-75 de 500 mg do veneno bruto de *B. jararacussu* em tampão formato de amônio 0,05 mol/L pH 3,5 à temperatura ambiente. Coluna 110 x 4,0 cm, fluxo de 30 ml/h, volume coletado por tubo: 10 ml.

5.1.2 Cromatografia em SP-Sephadex C-25

A fração S_{III} obtida da filtração em gel de Sephadex G-75 (Fig. 6) foi submetida a cromatografia de troca-iônica em SP-Sephadex C-25, sendo fracionada em nove sub frações: $S_{III}SP_I$ a $S_{III}SP_V$ (Fig. 5).

A fração $S_{III}SP_{IV}$ foi denominada de BthTX-II e a $S_{III}SP_V$ de BthTX-I.

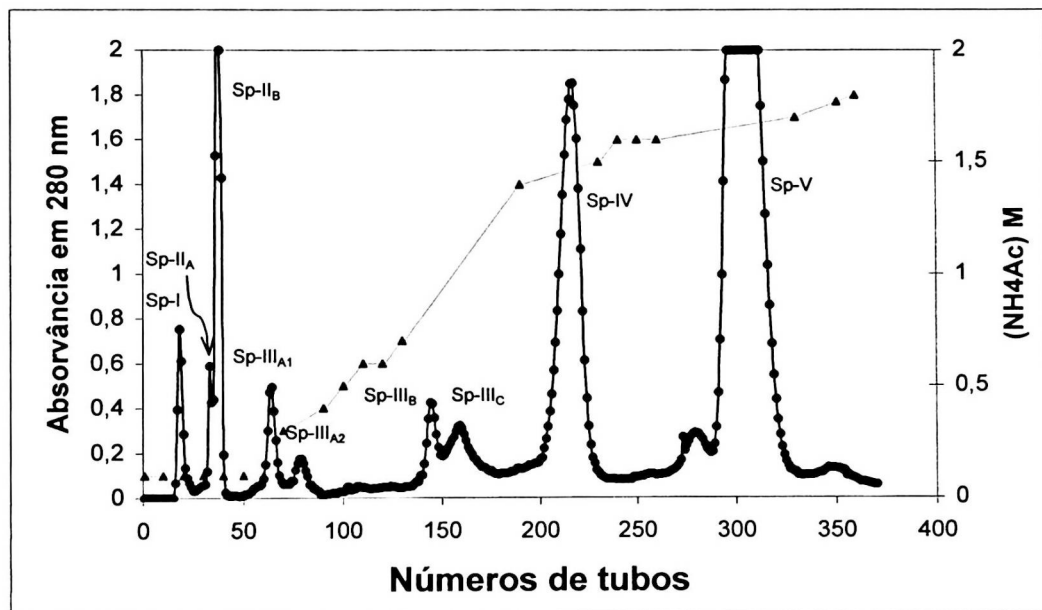


Figura 5 - Cromatografia em SP-Sephadex C-25 da fração S_{III} (Fig. 4). Amostra: 300 mg da fração S_{III} (4 mL). A eluição foi realizada inicialmente com tampão acetato de amônio 0,1 mol/L (65mL) e em seguida com gradiente de concentração de acetato de amônio de 1 a 2 mol/L, pH 5 à temperatura ambiente. Coluna: 45 x 2 cm; fluxo: 18 mL/hora; volume coletado por tubo: 5mL.

○—○ Absorvância em 280 nm
 △—△ Concentração Molar de NH_4Ac .

5.2 Purificação do extrato metanólico de *C. verbenacea*.

O extrato bruto metanólico foi obtido a partir de folhas secas e moídas da planta *Cordia verbenacea* (item 4.4), onde foram colocados 375,6 g de folhas a serem maceradas pelos solventes, obtendo 13,2 g de extrato bruto após três extrações com o solvente metanol, que demonstra um rendimento de 3,51% (item 4.5).

A Figura 6 mostra o fluxograma para o fracionamento do extrato metanólico de *C. verbenacea* e a purificação e identificação do AR.

5.2.1 Filtração em gel de Sephadex LH-20.

O fracionamento do extrato bruto metanólico (1 g) em coluna cromatográfica contendo Sephadex LH-20, apresentou 3 frações: a F1 sendo a mais rentável (81,5%), a F2 a menos rentável (7,8%) e a F3 que apesar do pouco rendimento (8,7%) apresentou estar mais pura que a F1. Este método apresentou 2% de perda de material.

A Figura 7 representa a CCD das frações obtidas do extrato metanólico após cromatografia em Sephadex LH-20.

A ação das frações F1, F2 e F3 foram avaliadas sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I (item 5.5).

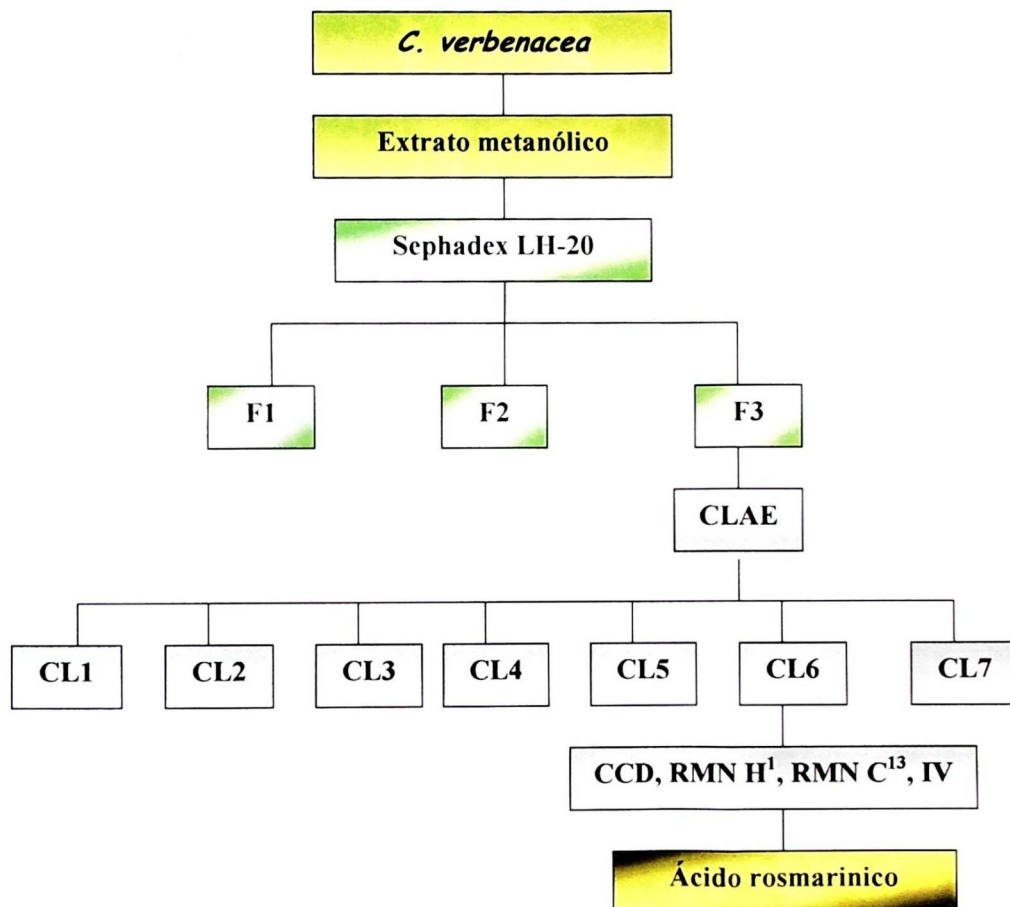


FIGURA 6 – Fluxograma para fracionamento do extrato metanólico de *C. verbenacea* purificação e identificação do ácido rosmarinico.

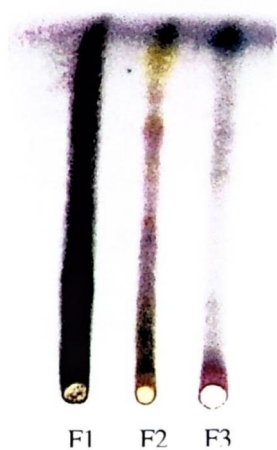


FIGURA 7 – CCD das frações obtidas do extrato metanólico de *Cordia verbenacea*. Fase móvel clorofórmio:metanol (8:2), revelador vanilina sulfúrica (0,5 g vanilina, 100 mL etanol, 2,5 mL ácido sulfúrico), seguida de aquecimento.

5.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração F3 do extrato metanólico de *Cordia verbenacea*.

A Figura 8 mostra o perfil cromatográfico da fração F3 do extrato metanólico de *Cordia verbenacea* em CLAE preparativa. A fração F3 foi desdobrada em sete frações (CL1 a CL7).

O rendimento obtido, neste processo, para cada fração pode ser observado na Tabela 12.

As frações CL1 a CL7 foram submetidas a avaliação sobre a inibição do edema provocado pela BthTX-I (item 5.6).

A fração CL6 por apresentar atividade anti-edematogênica e melhor rendimento foi selecionada para a elucidação estrutural.

5.2.3 Elucidação estrutural da fração CL6

A Figura 9 representa a CCD da fração CL6 revelada em U.V.

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam espectros para identificação do composto orgânico, sendo respectivamente os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e de I.V.

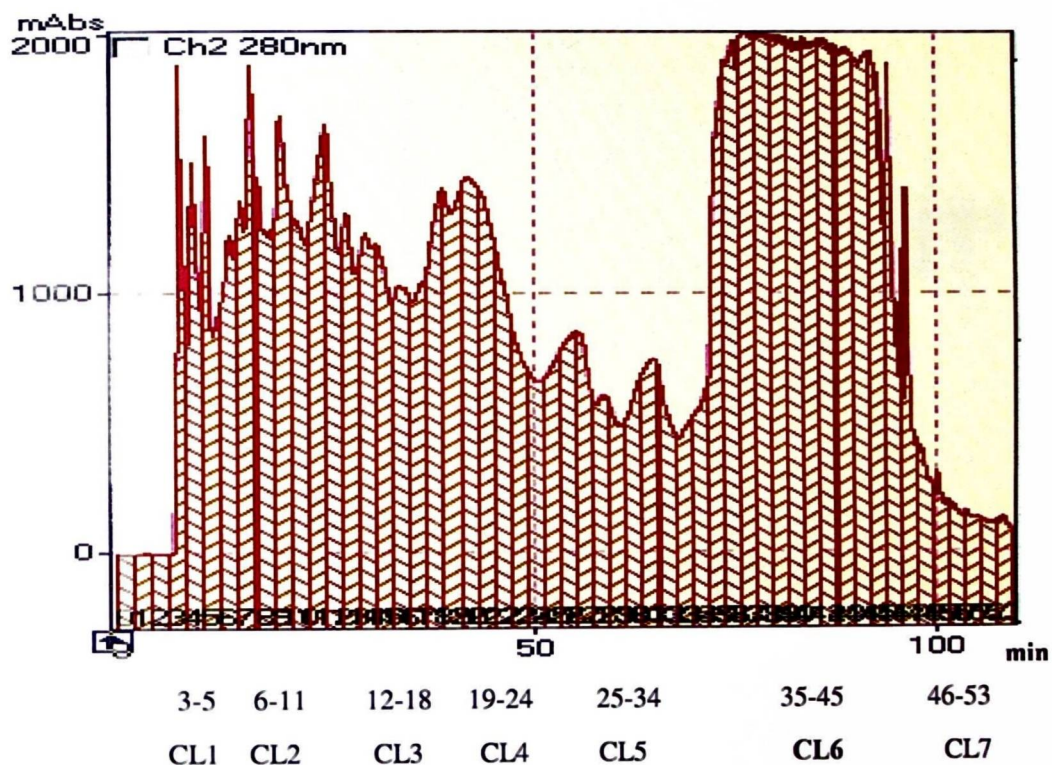


FIGURA 8- Purificação da fração 3 (F3) em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, em coluna de fase reversa (Supelcosil C-18), com gradiente de concentração metanol:água 0:10 chegando à 10:0 e retornando a concentração 0:10, obtendo as frações 3-5 (CL1), 6-11 (CL2), 12-18 (CL3), 19-24 (CL4), 25-34 (CL5), 35-45 (CL6), 46-53 (CL7). Em cada cromatografia utilizou-se 500 μL (40 mg) da fração F3, em um fluxo de 2 mL/min, sendo coletados 2 mL em cada tubo.

TABELA 12. Rendimento das frações CL1 a CL7 obtidas em CLAE.

FRAÇÕES	QUANTIDADE (mg)	RENDIMENTO (%)
F3	40	100
CL1	8,00	20
CL2	0,88	2,2
CL3	1,00	2,5
CL4	1,40	3,5
CL5	0,96	2,4
CL6	18,80	47
CL7	4,80	12

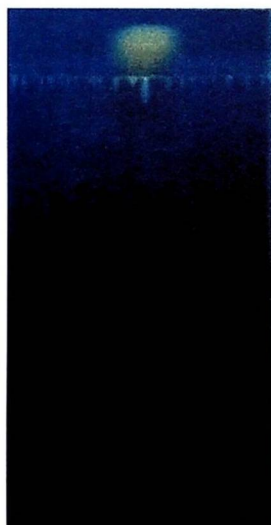


FIGURA 9 - CCD da fração CL6. Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26, v/v). Revelação: NP/PEG (difenilboriloxietilamina / polietilenoglicol), seguida de visualização em luz U.V. (WAGNER *et al.*, 1984).

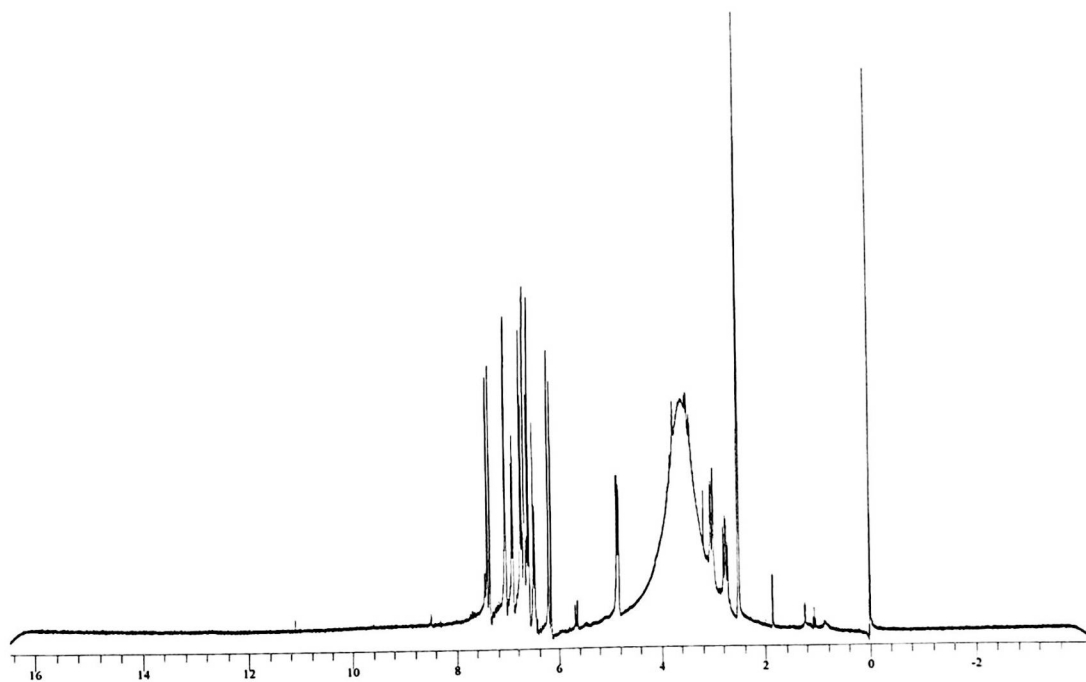
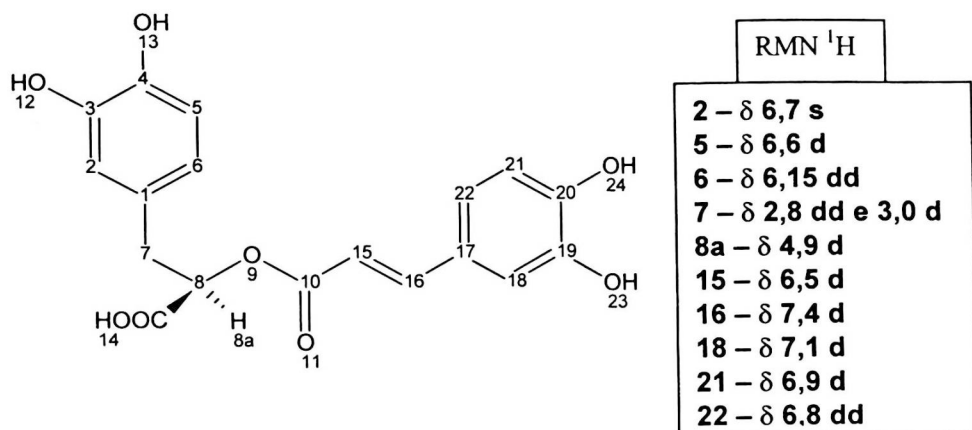


FIGURA 10 - Espectro de RMN de ^1H para amostra CL6 à 300 MHz diluída em $\text{DMSO-}d_6$.

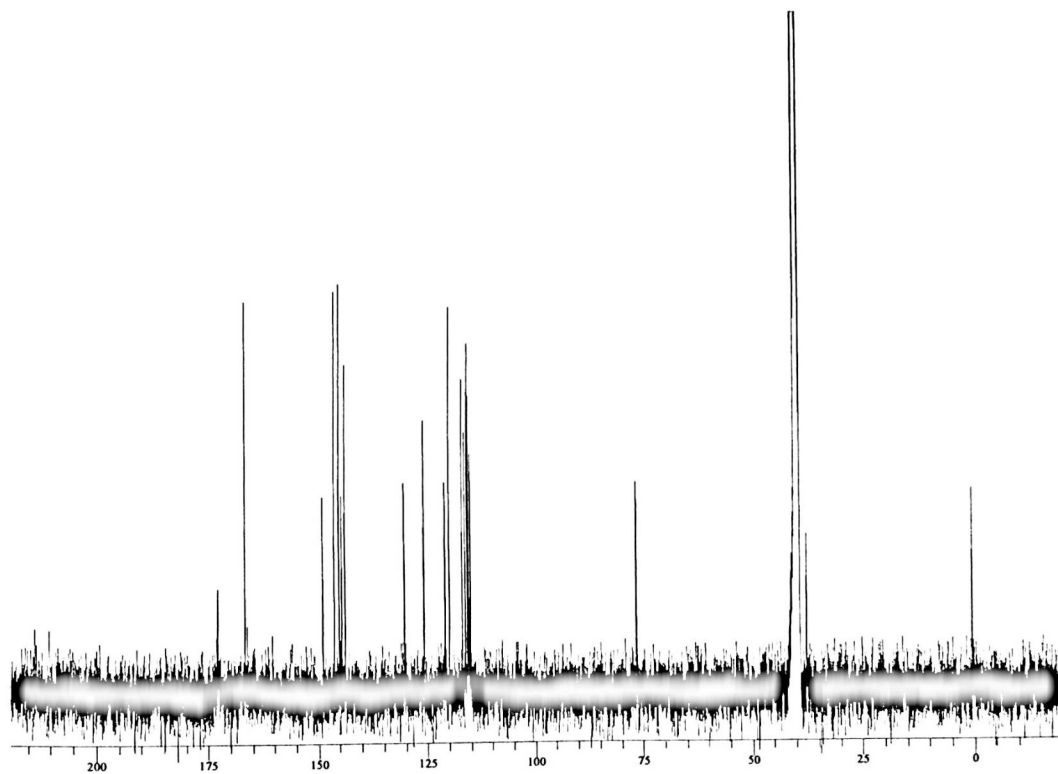
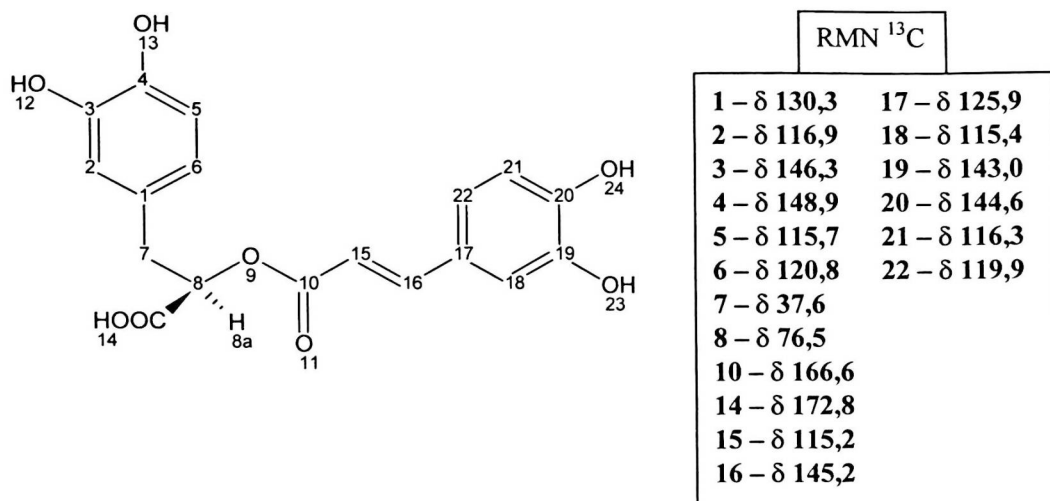


FIGURA 11 - Espectro de RMN de ^{13}C para amostra CL6 à 75 MHz diluída em $\text{DMSO-}d_6$.

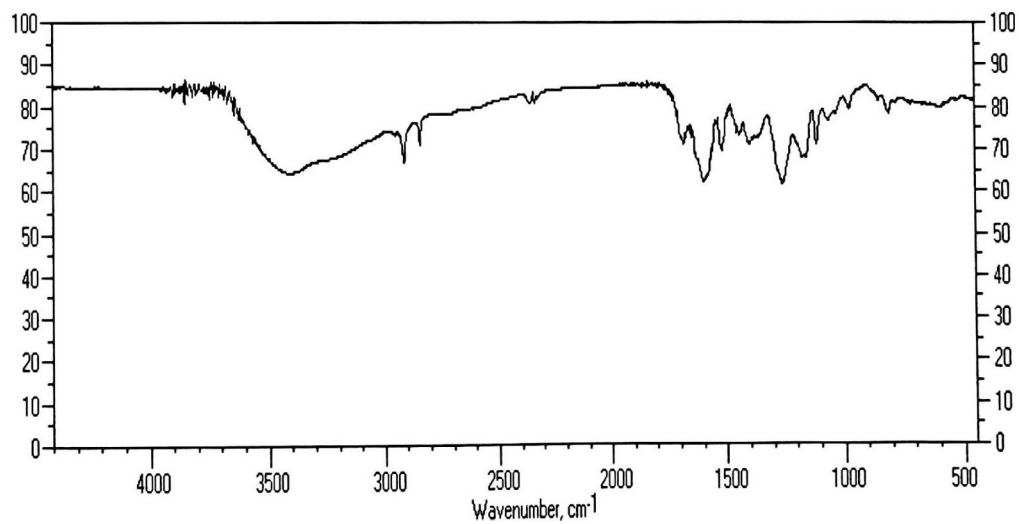


FIGURA 12 - Espectro de absorção na região do I.V. da amostra CL6.

A análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e de IV identificou o composto ácido rosmarinico, cuja estrutura pode ser observada na Figura 13.

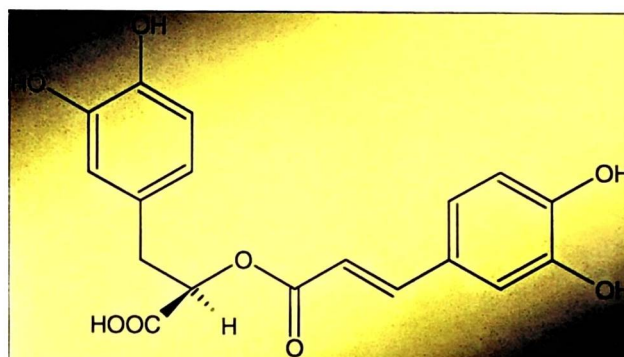


FIGURA 13 – Estrutura da fração CL6 (ácido rosmarinico).

5.3 Avaliação da ação do extrato metanólico de *Cordia verbenacea* sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de *B. jararacussu* e suas toxinas, BthTX-I e II.

5.3.1. Veneno bruto de *Bothrops jararacussu*.

O efeito do extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de *B. jararacussu* pode ser observado na Figura 14.

Os resultados apresentados, demonstram aumento na porcentagem de edema nos animais administrados com a mistura do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (1,25 mg/Kg) e o extrato metanólico de *C. verbenacea* (25 mg/Kg), nos tempos de 0,5; 1; 2 e 4 horas, quando comparados ao grupo controle veneno.

Vinte e quatro horas após o tratamento, não houve diferença significativa entre os animais do grupo 1 e os do grupo controle veneno (Fig. 14).

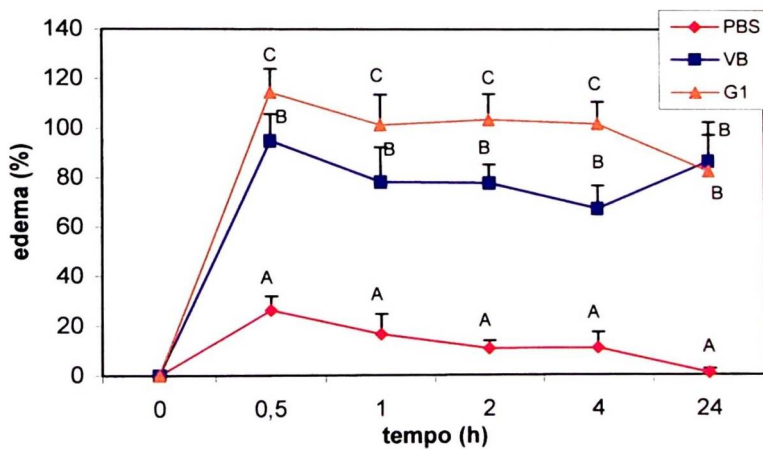


FIGURA 14 Efeito do extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica do veneno bruto de *B. jararacussu*.

Tratamentos: **G1** = 25 mg Extrato/Kg/25 μ L PBS + 1,25 mg veneno/Kg/25 μ L PBS; **VB** = 1,25 mg/Kg/50 μ L PBS; **PBS** = 50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.3.2 Toxina BthTX-I.

A Figura 15 mostra a porcentagem de edema verificada após a administração, por via i.d., da toxina BthTX-I misturada com de extrato metanólico (2,5 mg/Kg) de *Cordia verbenacea*.

Os animais tratados com o extrato apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de edema, quando comparado ao grupo controle da toxina, nos tempos de 0,5; 1; 2 e 4 horas. Após vinte e quatro horas, não houve diferença significativa entre os animais do grupo 1 e os do grupo controle BthTX-I (Fig. 15).

5.3.3 Toxina BthTX-II.

A Figura 16 mostra a porcentagem de edema verificada após a administração, por via i.d., da toxina BthTX-II misturada com de extrato metanólico (2,5 mg/Kg) de *Cordia verbenacea*.

Os animais tratados com o extrato apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de edema, quando comparado ao grupo controle da toxina, no tempo de 1 hora. Após vinte e quatro horas, não houve diferença significativa entre os animais do grupo 1 e os do grupo controle BthTX-II (Fig. 16).

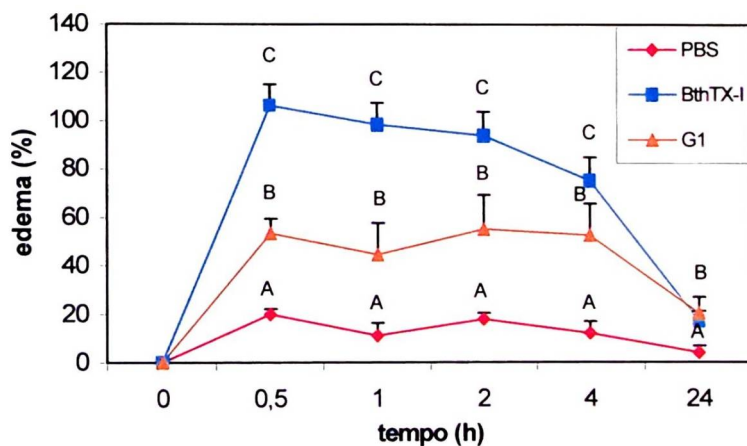


FIGURA 15 - Efeito do extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I.

Tratamentos: **G1** = 25 mg Extrato/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-I** = 2,5 mg/Kg/50 μ L PBS; **PBS** = 50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

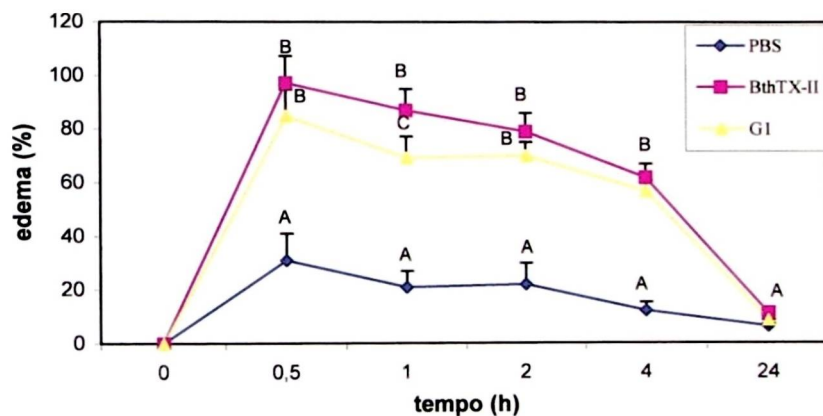


FIGURA 16 - Efeito do extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-II.

Tratamentos: **G1** = 25 mg Extrato/Kg/25µL PBS + 2,5 mg BthTX-II/Kg/ 25 µL PBS; **BthTX-II** = 2,5 mg/Kg/50 µL PBS; **PBS** = 50 µL. N=5. Os resultados representam a média ± DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.4 Avaliação da ação edematogênica do extrato metanólico de *Cordia verbenacea*.

A Figura 17 demonstra o edema provocado pelo extrato metanólico nas concentrações 19, 25 e 31 mg/Kg.

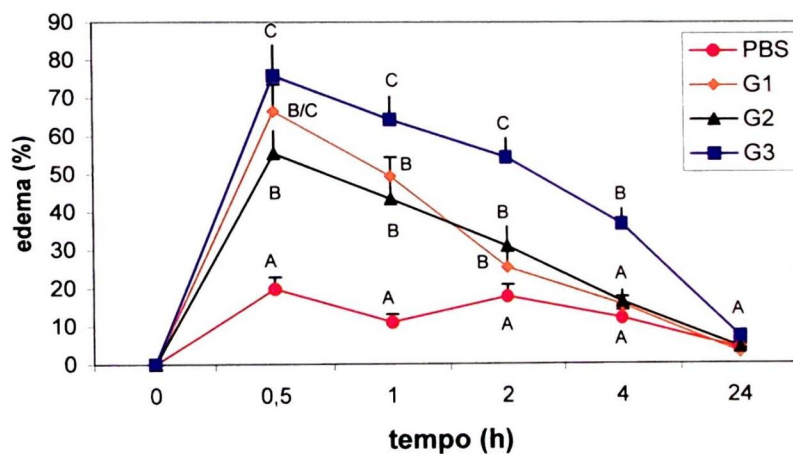


FIGURA 17 - Atividade edematogênica do extrato metanólico de *C. verbenacea*. Tratamentos: **G1** = 19 mg Extrato/Kg/50 μ L PBS; **G2** = 25 mg Extrato/Kg/50 μ L PBS; **G3** = 31 mg Extrato/Kg/50 μ L PBS; **PBS** = 50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.5 Avaliação da ação das frações do extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I.

As Figuras 18 e 19 mostram a porcentagem de edema verificada após a administração, por via i.d., da toxina BthTX-I misturada com 19 e 25 mg/Kg de frações do extrato metanólico de *Cordia verbenacea*.

Nesse protocolo, podemos observar que os animais tratados com as frações F1 e F3 apresentaram diminuição significativa da porcentagem de edema ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle da toxina, nos tempos de 0,5; 1; 2 e 4 horas. Após vinte e quatro horas, não houve diferença significativa entre os animais do grupo 1 e os do grupo controle BthTX-I (Fig. 18 e 19).

5.6 Avaliação da ação das frações obtidas da fração 3 do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I.

A Figura 20 mostra a porcentagem de edema verificada após a administração, por via i.d., da mistura de toxina BthTX-I com as frações (8,5 mg/Kg) obtidas da fração F3 do extrato metanólico de *Cordia verbenacea*.

Nesse protocolo, podemos observar que os animais tratados com as frações CL2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram, algumas com melhores resultados, diminuição significativa da porcentagem de edema ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle da toxina, nos tempos de 0,5 h e 1 hora. Com os tempos de 2 e 4 horas os grupos tratados com as frações CL4, 5 e 6 ainda apresentavam inibição ao edema provocado pela toxina BthTX-I. Após vinte e quatro horas, não houve diferença significativa entre os animais do grupo CL1, 4, 5, 6, 7 e os do grupo controle BthTX-I. Os animais dos grupos CL2 e CL3 apresentaram em vinte e quatro horas certa dificuldade para que o tamanho da pata voltasse ao normal.

A Figura 21 mostra o edema provocado pelas sete frações obtidas da fração F3. Observa-se que todas as frações formaram edema significativo ($p < 0,05$), demonstrando que as frações apesar de inibirem o edema provocado pela toxina BthTX-I, apresentam um certo nível de toxicidade.

As frações CL 4, 5 e 6 apresentam o maior edema, ao contrario da fração CL 1 que apresentou o menor edema entre elas.

5.7 Avaliação da ação do AR sobre a atividade miotóxica do veneno bruto de *B. jararacussu*, BthTX-I e BthTX-II.

As Figuras 22, 23 e 24 mostram os níveis de CK no plasma após a administração, por via i.m., da mistura de VB ou BthTX-I ou BthTX-II com o AR (2,5 e 25 mg/Kg).

Na Figura 22, podemos observar que os animais tratados com ácido rosmarinico com menor concentração não apresentaram diminuição significativa dos níveis de creatina cinase (CK), quando comparado ao grupo controle do veneno. O grupo tratado com concentração maior apresentou pequena mas significativa ($p < 0,05$) diminuição dos níveis de CK.

Nas Figuras 23 e 24, podemos observar que todos os grupos de animais tratados com ácido rosmarinico apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) os níveis de creatina cinase (CK), quando comparado ao grupo controle do veneno.

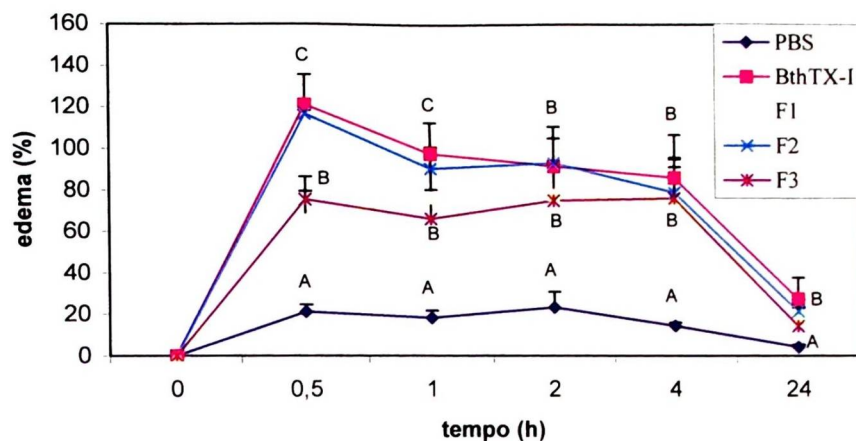


FIGURA 18 - Efeito das frações do extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I.

Tratamentos: **F1** = 25 mg F1/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **F2** = 25 mg F2/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **F3** = 25 mg F3/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **BthTX-I** = 2,5 mg/Kg/50 μ L PBS; **PBS** = 50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

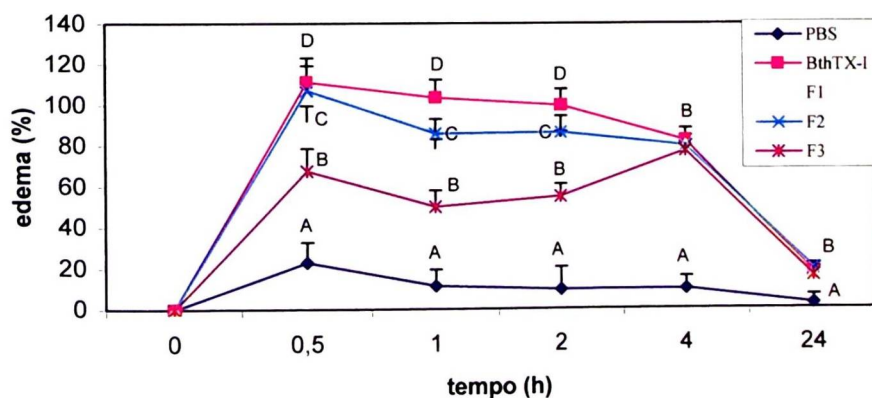


FIGURA 19 - Efeito das frações do extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I.

Tratamentos: **F1** = 19 mg F1/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **F2** = 19 mg F2/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **F3** = 19 mg F3/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **BthTX-I** = 2,5 mg/Kg/50 μ L PBS; **PBS** = 50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

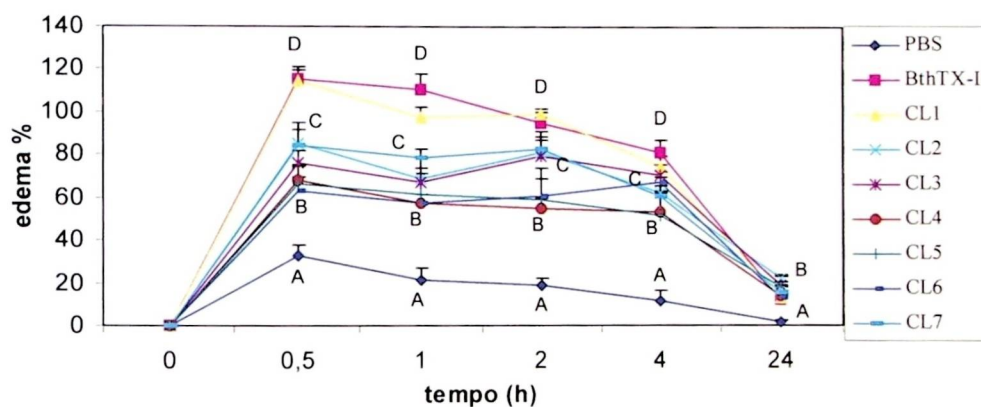


FIGURA 20 - Efeito das frações da fração F3 do extrato metanólico sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I.

Tratamentos: **CL1** = 8,5 mg CL1/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **CL2** = 8,5 mg CL2/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **CL3** = 8,5 mg CL3/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **CL4** = 8,5 mg CL4/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **CL5** = 8,5 mg CL5/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **CL6** = 8,5 mg CL6/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **CL7** = 8,5 mg CL7/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/ 25 μ L PBS; **BthTX-I** = 2,5 mg/Kg/50 μ L PBS; **PBS** = 50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

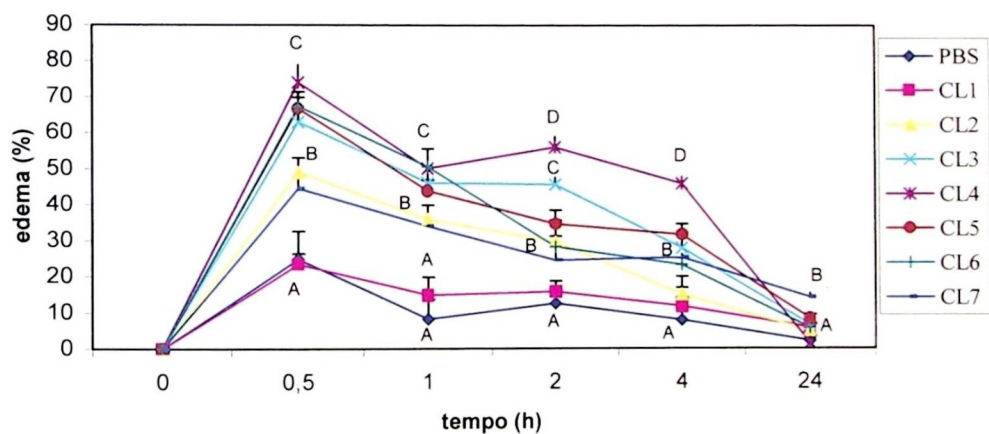


FIGURA 21 - Atividade edematogênica das frações obtidas da fração F3 do extrato metanólico de *C. verbenacea* em CLAE.

Tratamentos: **CL1** = 8,5 mg CL1/Kg/50 μ L PBS; **CL2** = 8,5 mg CL2/Kg/50 μ L PBS; **CL3** = 8,5 mg CL3/Kg/50 μ L PBS; **CL4** = 8,5 mg CL4/Kg/50 μ L PBS; **CL5** = 8,5 mg CL5/Kg/50 μ L PBS; **CL6** = 8,5 mg CL6/Kg/50 μ L PBS; **CL7** = 8,5 mg CL7/Kg/50 μ L PBS; **PBS** = 50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

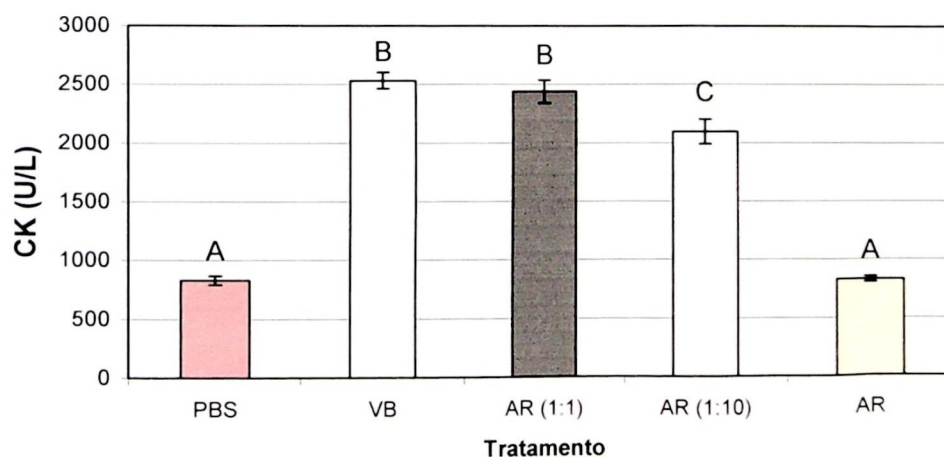


FIGURA 22 - Efeito do AR sobre a atividade mitótica do VB de *B. jararacussu*.

Tratamentos: **PBS** = PBS 50 μ L; **VB** = VB 2,5mg/Kg/50 μ L PBS; **AR (1:1)** = 2,5 mg AR/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg VB/Kg/25 μ L PBS; **AR (1:10)** = 25 mg AR/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg VB/Kg/25 μ L PBS; **AR** = 25 mg AR/Kg/50 μ L PBS. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

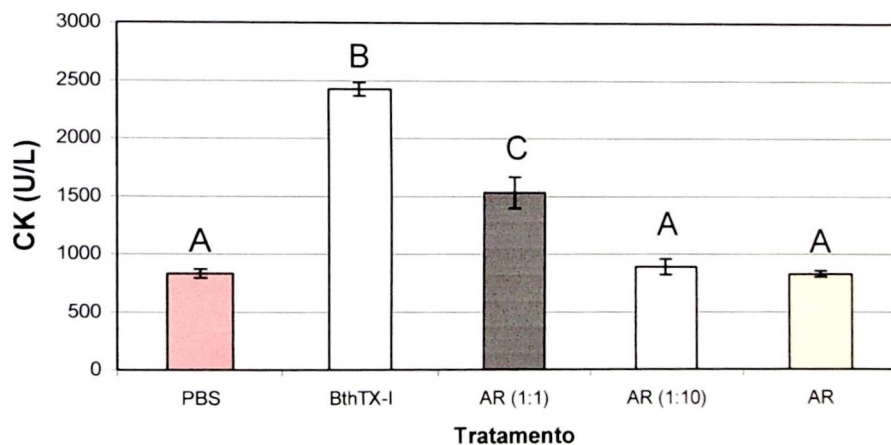


FIGURA 23 - Efeito do AR sobre a atividade mitotóxica da BthTX-I de *B. jararacussu*.
 Tratamentos: **PBS** = PBS 50 μ L; **BthTX-I** = BthTX-I 2,5mg/Kg/50 μ L PBS; **AR (1:1)** = 2,5 mg AR/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **AR (1:10)** = 25 mg AR/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS; **AR** = 25 mg AR/Kg/50 μ L PBS. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

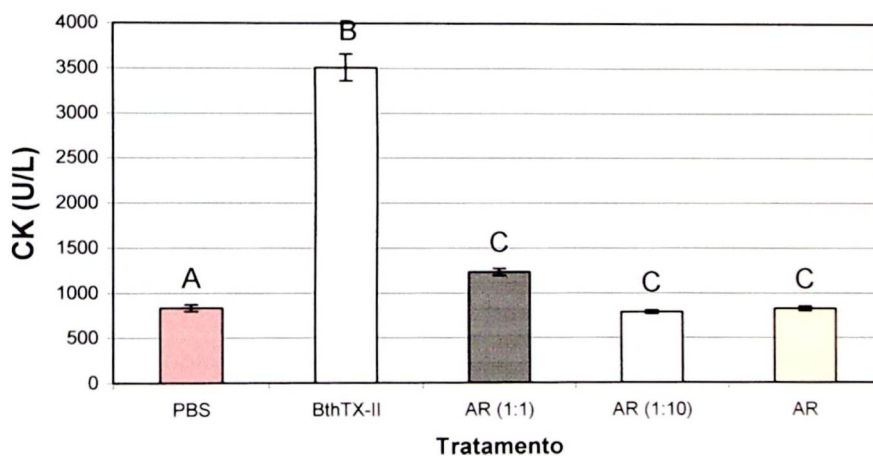


FIGURA 24 - Efeito do AR sobre a atividade mitotóxica da BthTX-II de *B. jararacussu*. Tratamentos: **PBS** = PBS 50 μ L; **BthTX-II** = BthTX-II 2,5mg/Kg/50 μ L PBS; **AR (1:1)** = 2,5 mg AR/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS; **AR (1:10)** = 25 mg AR/Kg/25 μ L PBS + 2,5 mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS; **AR** = 25 mg AR/Kg/50 μ L PBS. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.8 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade fosfolipásica do veneno bruto de *B. jararacussu* e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂

A Figura 25, demonstra o tamanho do halo, em milímetros, promovido pela atividade fosfolipásica sobre o substrato de gema de ovo em meio sólido, após administração do veneno bruto (Figura 25 A), ou BthTX-II (Figura 25 B), ou BthA-I-PLA₂ (Figura 25 C) (1 µg/50µL) de *B. jararacussu* misturado ao AR (5, 10, 50 µg).

O que se observa é que os meios tratados com AR nas concentrações estudadas (5,10 e 50 mg/Kg) não apresentaram diminuição significativa no tamanho do halo promovido pela atividade fosfolipásica quando comparado ao grupo controle do veneno.

5.9- Avaliação do efeito do AR sobre a atividade anticoagulante da BthTX-II do veneno bruto de *B. jararacussu*.

Nesta etapa, foi fixada a dose de BthTX-II em 0,5 µg para a indução da atividade anticoagulante e de ácido rosmarinico em 0,5; 5; 15 e 25 µg para a inibição da atividade anticoagulante.

O que se observa é que o plasma tratado com ácido rosmarinico nas concentrações estudadas (0,5; 5; 15 e 25 µg) não apresentaram inibição da atividade anticoagulante promovida pela toxina BthTX-II, ou seja, o plasma continuou incoagulável mesmo com o ácido rosmarinico misturado a toxina.

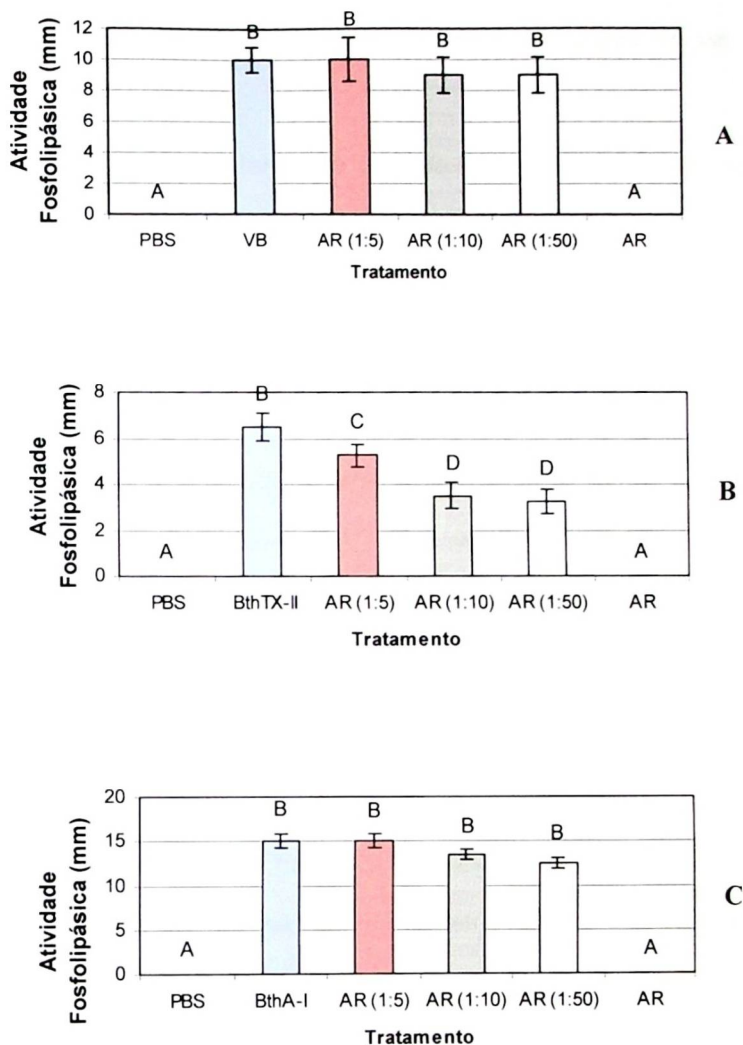


FIGURA 25 - Efeito do AR sobre a atividade fosfolipásica do veneno bruto e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂ de *B. jararacussu*.

A: PBS = PBS 50 μ L; VB = VB 1 μ g/50 μ L; AR (1:5) = VB 1 μ g + AR 5 μ g/50 μ L; AR (1:10) = VB 1 μ g + AR 10 μ g/50 μ L; AR (1:50) = VB 1 μ g + AR 50 μ g/50 μ L; AR = AR 50 μ g/50 μ L.

B: PBS = PBS 50 μ L; BthTX-II = BthTX-II 1 μ g/50 μ L; AR (1:5) = BthTX-II 1 μ g + AR 5 μ g/50 μ L; AR (1:10) = BthTX-II 1 μ g + AR 10 μ g/50 μ L; AR (1:50) = BthTX-II 1 μ g + AR 50 μ g/50 μ L; AR = AR 50 μ g/50 μ L.

C: PBS = PBS 50 μ L; BthA-I = BthA-I 1 μ g/50 μ L; AR (1:5) = BthA-I 1 μ g + AR 5 μ g/50 μ L; AR (1:10) = BthA-I 1 μ g + AR 10 μ g/50 μ L; AR (1:50) = BthA-I 1 μ g + AR 50 μ g/50 μ L; AR = AR 50 μ g/50 μ L. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.10 Avaliação da ação do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. jararacussu*.

A Figura 26 demonstra o tamanho do halo hemorrágico em milímetros, após administração do veneno bruto (1 mg/Kg) e do veneno misturado ao AR (1, 10, 30 e 50 mg/Kg) por via i.d.

O que se observa é que os animais tratados com AR com concentrações menores (1 e 10 mg/Kg) não apresentaram diminuição significativa no tamanho do halo hemorrágico quando comparado ao grupo controle do veneno. Os grupos tratados com concentrações maiores (30 e 50 mg/Kg) apresentaram significativa ($p < 0,05$) diminuição no tamanho do halo hemorrágico.

5.11 - Avaliação do efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno bruto de *B. jararacussu*.

A dose coagulante mínima (DCM) do veneno de *B. jararacussu* é 0,23 µg/25 µL, determinada conforme metodologia descrita no item 4.14.

Nesta etapa, foi fixada a dose do veneno bruto em 0,23 µg para a indução da atividade coagulante e de AR em 0,23; 1,15; 2,3 e 11,5 µg para a inibição da atividade coagulante.

O que se observa é que o plasma tratado com AR nas concentrações 0,23 e 1,15 µg não apresentaram inibição da atividade coagulante promovida pelo veneno bruto de *B. jararacussu*.

O plasma tratado com AR nas concentrações de 2,3 e 11,5 µg demonstraram pequena mas significativo retardamento da coagulação (Fig. 27).

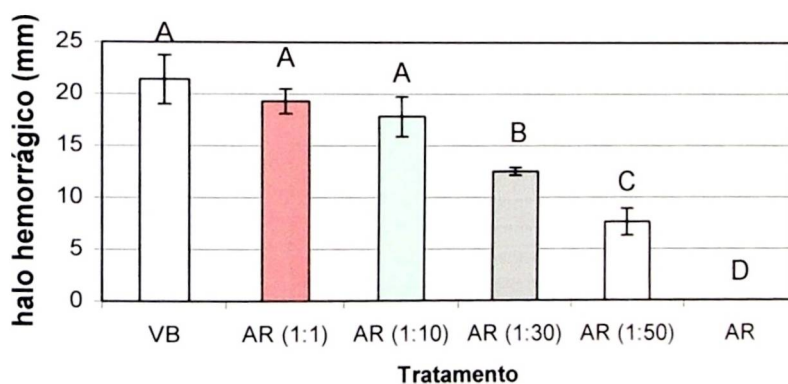


FIGURA 26 - Efeito do AR sobre a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. jararacussu*.

Tratamentos: **VB** = VB 50 μ L; **AR (1:1)** = VB 1 mg/Kg + AR 1mg/Kg; **AR (1:10)** = VB 1 mg/Kg + AR 10 mg/Kg **AR (1:30)** = VB 1 mg/Kg + AR 30 mg/Kg **AR (1:50)** = VB 1 mg/Kg + AR 50 mg/Kg; **AR** = AR 50 mg/Kg. N=5. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

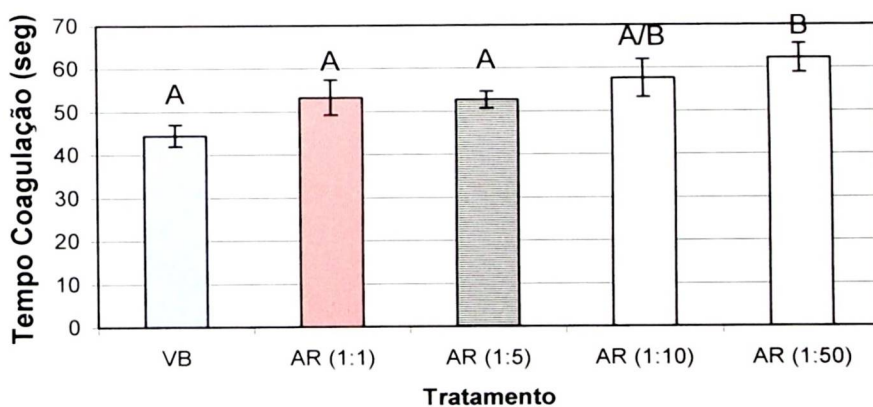


FIGURA 27 - Efeito do AR sobre a atividade coagulante do veneno de *B. jararacussu*. Tratamentos: **VB** = VB 0,23 μg ; **AR (1:1)** = VB 0,23 μg + AR 0,23 μg ; **AR (1:5)** = VB 0,23 μg + AR 1,15 μg ; **AR (1:10)** = VB 0,23 μg + AR 2,3 μg ; **AR (1:50)** = VB 0,23 μg + AR 11,5 μg . N= 15. Os resultados representam a média \pm DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS

As duas eletroforeses abaixo apresentam o perfil protéico do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e das toxinas BthTX-I e II sozinhas e misturadas com o extrato metanólico de *C. verbenacea* e também misturadas com o ácido rosmarinico (Figs. 28 e 29).

As eletroforeses demonstram que não houve desnaturação do veneno nem das toxinas, quando misturadas ao extrato metanólico ou, ao ácido rosmarinico.

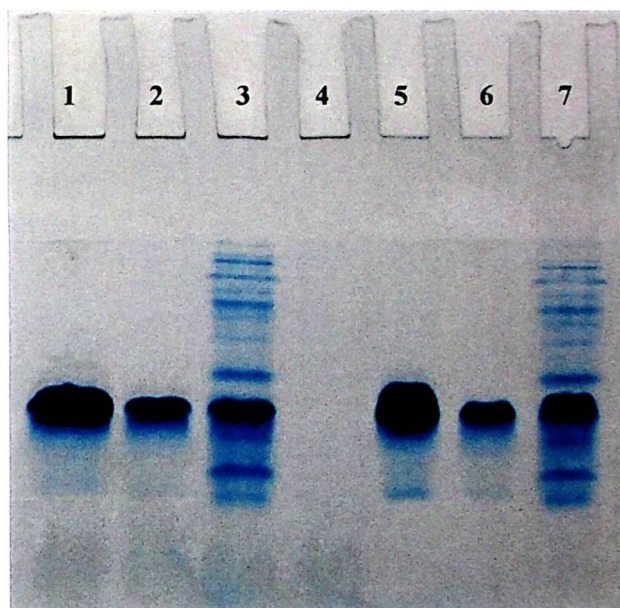


FIGURA 28 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida: 1- extrato metanólico + BthTX-II (1:10), 2- extrato metanólico + BthTX-I (1:10), 3- extrato metanólico + VB (0,5:10), 4- extrato metanólico, 5- BthTX-II, 6- BthTX-I, 7- VB
Condições: 200V (voltagem), 10mA (amperagem) em 3h 40min. (tempo). Corada com Azul Coomassie G-250 0,2% em H₂O/MeOH 1:1 (v/v) durante 1 hora. O descoramento foi obtido com trocas sucessivas de solução de ácido acético glacial à 10% (v/v).

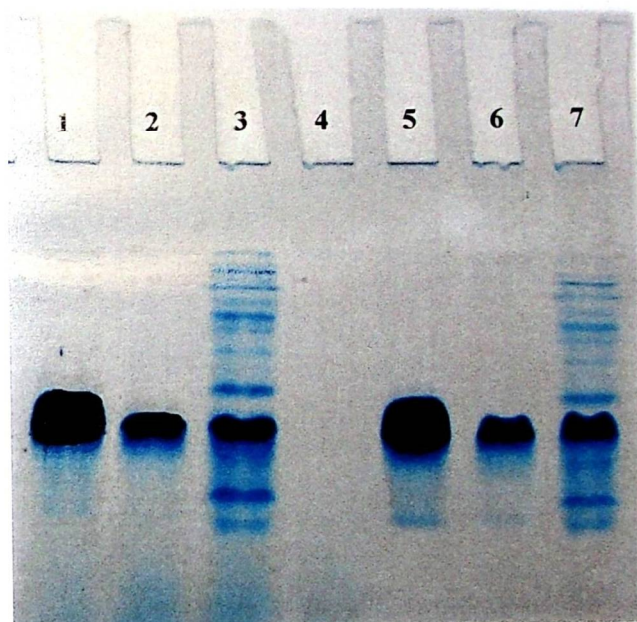


FIGURA 29 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida: 1- AR + BthTX-II (1:3,5), 2- AR + BthTX-I (1:3,5), 3- AR + VB (0,5:3,5), 4- AR, 5- BthTX-II, 6- BthTX-I, 7- VB
Condições: 200V (voltagem), 10mA (amperagem) em 3h 40min. (tempo). Corada com Azul Coomassie G-250 0,2% em H₂O/MeOH 1:1 (v/v) durante 1 hora. O descoloramento foi obtido com trocas sucessivas de solução de ácido acético glacial à 10% (v/v).

6 - DISCUSSÃO

Notar cedo as pequenas mudanças
Ajuda-o a adaptar-se às maiores
Que ocorrerão.

Spencer Johnson

Neste estudo comprovamos a eficácia das toxinas BthTX-I e BthTX-II e do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* na indução do edema e da miotoxicidade, também avaliamos a atividade hemorrágica do veneno bruto desta serpente, assim como o efeito coagulante e sua atividade fosfolipásica. Com a toxina BthTX-II comprovamos o efeito anticoagulante e sua atividade fosfolipásica e com a toxina BthA-I-PLA₂ comprovamos sua elevada atividade fosfolipásica.

A toxina BthTX-I isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, possui alta atividade miotóxica, com estrutura PLA₂ mas não apresenta atividade fosfolipásica em lecitina de gema de ovo (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988), sendo denominada Lys₄₉, isto é, o resíduo Asp₄₉ foi substituído por uma lisina. Os mecanismos de lesão local da membrana, exercidos pela BthTX-I, ainda não estão totalmente esclarecidos (DIAZ *et al.*, 1991; RUFINI *et al.*, 1992). LANDUCCI *et al.* (1998) demonstraram um forte indício de que a miotoxina BthTX-I atua sobre a degranulação de mastócitos.

A BthTX-II é uma miotoxina presente no veneno de *B. jararacussu*, possui atividade fosfolipásica A₂ sobre lecitina de gema de ovo (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988). GUTIÉRREZ *et al.* (1991) observaram que esta toxina induziu um rápido aumento dos níveis de CK plasmático. Análises histopatológicas e ultraestrutural indicaram que a BthTX-II afeta as fibras dos músculos esqueléticos por alterarem primeiramente a membrana plasmática.

Com os resultados obtidos nos trabalhos de LANDUCCI *et al.* (1998) e SOARES *et al.* (2000), concluímos que as toxinas BthTX-I, II e conseqüentemente o veneno bruto da serpente *B. jararacussu* apresentam atividade inflamatória, tanto

pela atividade fosfolipásica como pelos danos provocados no tecido muscular, em células como mastócitos.

As etapas envolvidas no processo de fracionamento do veneno de *B. jararacussu* visando a purificação das toxinas BthTX-I e II é um processo relativamente fácil. Consiste basicamente em uma filtração em gel de Sephadex G-75 e uma cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25, possibilitando assim a obtenção das subfrações S_{III}SP_I a S_{III}SP_V.

Na primeira etapa do fracionamento do veneno de *B. jararacussu* foram obtidas sete frações, sendo que a fração S_{III} (onde encontram-se as toxinas BthTX-I e II) representou cerca de 41% do veneno bruto. A etapa seguinte de purificação consistiu na cromatografia de troca iônica da fração S_{III}, obtendo-se nove frações: S_{III}SP_I a S_{III}SP_V, sendo as frações S_{III}SP_{IV} e S_{III}SP_V, as toxinas BthTX-II e I respectivamente.

Estudos realizados por HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* (1988) mostraram que somente as frações S_{III} e S_{IV} provaram ser termoestáveis e somente S_{III} revelou ter atividade fosfolipásica.

O principal objetivo deste projeto foi avaliar o extrato metanólico de *C. verbenacea* sobre a atividade edematogênica induzida pelas toxinas BthTX-I e II e purificar o princípio ativo inibidor desta atividade. Após a obtenção da substância pura outras atividades biológicas também foram testadas como: miotoxicidade, atividade fosfolipásica, hemorragia, atividade coagulante e anti-coagulante. Assim quantidades significativas dessas toxinas e do princípio ativo da planta deveriam ser acumuladas para etapas subseqüentes dos ensaios biológicos.

Tendo como base as pesquisas realizadas por SERTIÉ *et al.* (1988), com o extrato da planta *C. verbenacea* que apresentou atividade antiinflamatória e antiedematogênica, após indução com carragenina e também pelo uso popular desta planta que é amplamente conhecida como cicatrizante e antiinflamatória, resolvemos avaliar o efeito de *C. verbenacea* sobre o veneno e as toxinas da serpente *B. jararacussu*, que como colocado anteriormente são conhecidas por promover uma resposta inflamatória devido suas ações farmacológicas em animais.

O solvente escolhido para obter o extrato vegetal deve ser o mais seletivo possível. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que deseja extrair, determina o solvente que deve ser utilizado. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece o conteúdo do material, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente. Desta forma na extração de *C. verbenacea* foram obtidos dois extratos brutos, o clorofórmico (característica apolar) e o metanólico (característica polar). Solventes de características apolares, tendem a extrair substâncias apolares como: lipídeos, óleos essenciais e flavonóides. Solventes com características polares tendem a extrair substâncias polares como: saponinas, alcalóides e heterosídeos em geral (FALKENBERG, M.B. *et al*, 2000). Devido aos resultados iniciais o extrato clorofórmico foi descartado, pelo fato do controle do extrato, ou seja, animais tratados apenas com o extrato clorofórmico, apresentarem edema muito elevado quando comparado ao edema provocado pelo grupo controle tratado apenas com PBS, e também por não apresentarem resultados positivos à inibição do edema provocado pelo veneno e pelas toxinas.

O extrato metanólico de *C. verbenacea* apresentou desde os primeiros testes, conter substâncias que promovem a inibição do edema provocado pelas toxinas do veneno de *Bothrops jararacussu*. Assim todos os testes farmacológicos e de purificação de um princípio ativo ficou focado ao extrato metanólico.

Os resultados obtidos são bastante satisfatórios, pelo fato do extrato metanólico (25 mg/Kg) inibir significativamente ($p < 0,05$) o edema produzido pelas BthTX-I e II (Fig. 15 e 16) sendo o extrato metanólico mais ativo na inibição do edema provocado pela BthTX-I (Fig. 15). Os resultados não foram positivos com o edema provocado pelo veneno bruto de *B. jararacussu* (Fig. 14), provavelmente pelo fato do veneno bruto atuar em vários sistemas farmacológicos e não apenas na atividade fosfolipásica, e também por conter metaloproteínas, que promovem o efeito hemorrágico (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

Os testes para avaliação edematogênica do extrato metanólico de *C. verbenacea* em várias concentrações, apresentou menor atividade com 25 mg/Kg, demonstrando assim ser a melhor concentração a ser utilizada nas avaliações comparativas com o veneno bruto e as BthTX-I e II. O mesmo não ocorreu com as doses de 31 e 19 mg/Kg, apesar de estar utilizando quantidade maior e menor de extrato, os resultados não foram os esperados, mostrando que nas medições do edema estas doses apresentaram maior ação edematogênica; assim a dose escolhida de extrato metanólico para continuar as avaliações biológicas foi a de 25 mg/Kg.

Observando as Figuras 17 e 21, podemos verificar que todas as concentrações de extrato utilizadas (19, 25 e 31 mg/Kg) e todas as frações obtidas em CLAE (8,5 mg/Kg), apresentaram atividade edematogênica. Devido os resultados

experimentais serem melhor visualizados com a BthTX-I as frações do extrato metanólico foram testadas contra esta toxina.

No primeiro fracionamento do extrato metanólico (item 4.7.1), utilizamos uma coluna cromatográfica contendo Sephadex LH-20 para filtração do extrato, assim conseguimos três frações, sendo que as frações 1 e 3 apresentaram bons resultados, mas a fração 3 demonstrou estar mais pura do que a fração 1 como mostra a Figura 7. Assim, optamos em continuar o projeto visando purificar o(s) princípio(s) ativo(s) contidos na fração 3.

A escolha pela utilização do Sephadex LH-20 para o fracionamento do extrato metanólico, deve-se ao fato de poder utilizar solventes hidrofílicos e lipofílicos. Como o extrato utilizado no fracionamento é de origem polar (metanol) não é recomendável o uso de sílica gel, pelo fato de solventes polares poderem arrastar junto com as frações quantidades significativas de sílica.

Ao fracionar a fração 3 em CLAE, foram obtidas sete frações chamadas de CL1, CL2, CL3, CL4, CL5, CL6 e CL7 (Fig. 8). As frações CL4, CL5 e CL6 apresentaram os melhores resultados, sendo que neste caso a fração CL6 mostrou ter maior rendimento (47% - Tabela 12) e estar praticamente pura (Fig. 9) e necessitar de uma dose (8,5 mg/Kg) relativamente baixa para a inibição do edema promovido pela BthTX-I (Fig.20).

A coluna utilizada em CLAE foi a C-18 (fase reversa) que consiste em uma cadeia de 18 carbonos ligadas a sílica da coluna, fazendo com que substâncias apolares se liguem a coluna e substâncias polares saiam primeiro. O tempo em que cada substância sai da coluna pode também ser diferenciado pelo tipo de solvente utilizado na eluição. Neste projeto foram utilizados solventes bastante polares (água

e metanol), em gradiente de eluição. Iniciou-se a eluição utilizando 100% de água, aumentando o gradiente de metanol gradativamente até atingir 100%, depois o gradiente de concentração de metanol regredia e a concentração de água voltava a 100%.

Após a purificação do princípio ativo (P.A), inibidor da atividade edematogênica, foi realizada a elucidação estrutural desta fração (CL6) e sua atuação sobre outras atividades farmacológicas exercidas pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e pelas toxinas BthTX-I e II.

Para a elucidação estrutural utilizamos técnicas espectroscópicas, entre elas o infravermelho que identificou grupo hidroxila (OH) de ácido com a deformação axial no comprimento de onda próximo a 3.500 (Fig.12). A técnica de RMN ^1H demonstra os deslocamentos exercidos pelos hidrogênios da molécula, onde quanto maior o valor do deslocamento químico (ppm) mais desblindado está o hidrogênio, ou seja, o hidrogênio se encontrará em um anel aromático ou ligado a um heteroátomo (O, N, S, entre outros) (SILVERSTEIN *et al.*, 1994). Assim os deslocamentos químicos entre 6,15 a 7,1 ppm, revelam os hidrogênios dos anéis aromáticos. A técnica de RMN ^{13}C se equivale a técnica de RMN ^1H mas demonstra os deslocamentos químicos dos carbonos da molécula.

Observando as Figuras 9, 10, 11 e 12, podemos verificar que a fração CL6 se trata de um composto fenólico, pelo fato dela ter sido revelada por NP/PEG em CCD (Fig. 9), também apresentou características de deslocamento químico em RMN ^1H idênticos a compostos fenólicos como flavonóides e lignanas, onde deslocamentos químicos aparecem entre 6 e 8 ppm no espectro de RMN ^1H (anel aromático e hidrogênios bastante desblindados).

O espectro de RMN ^{13}C apresenta grande número de carbonos acima de 115 ppm, demonstrando assim estarem próximos de hetero átomos e de anéis aromáticos em uma região bastante desblindada.

Com os deslocamentos químicos em RMN ^1H , RMN ^{13}C e comparando com espectros bidimensionais como COSY, HMQC e HMBC, podemos concluir que o composto fenólico isolado da planta *C. verbenacea* é um princípio ativo já conhecido e isolado de outras plantas, chamado ácido rosmarínico (AR) (Fig. 13, 30 e 31).

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático com um hidrogênio (H^+) substituído por uma hidroxila (OH^-). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos. Os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático. Os vegetais tem a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e a partir dele, compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais, são encontradas estruturas bastante variadas como, ácidos fenólicos, derivados da cumarina, pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas. Além disso esta classe de substâncias abrange as lignanas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais (CARVALHO *et al.*, 2002).

O ácido rosmarínico está ligado a um grupo de substâncias ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos e do ácido cinâmico. Estas substâncias apresentam ampla distribuição no reino vegetal, sendo encontradas na forma de ésteres, glicosídeos e amidas. Nesse grupo destacam-se os derivados do ácido caféico.

Este metabólito secundário é comumente encontrado na família Lamiaceae e Boraginaceae (AUF'MKOLK *et al.*, 1984; PETERSEN & SIMMONDS, 2003).

Os principais efeitos do ácido rosmarínico estudados até o momento são efeitos anti-oxidantes, antiinflamatórios, antidepressivo e supressor (TAKEDA *et al.*, 2002; MAKINO *et al.*, 2002; CERVELLATI *et al.*, 2002). Também foram realizados experimentos do ácido rosmarínico sobre ação anti-HIV e antiplaquetária (KIM *et al.*, 1999; ZOU *et al.*, 1993).

Não foram realizados até o momento experimentos com modificações na fórmula estrutural deste composto mas já foram avaliadas formas de obtenção utilizando síntese orgânica e estudos sobre o seu metabolismo em ratos (NAKAZAWA & OHSAWA, 1998; MATSUNO *et al.*, 2001).

O ácido rosmarínico apresenta fórmula estrutural, $C_{18}H_{16}O_8$, com PM = 360,315 e sua estrutura molecular pode ser observada na Figura 30.

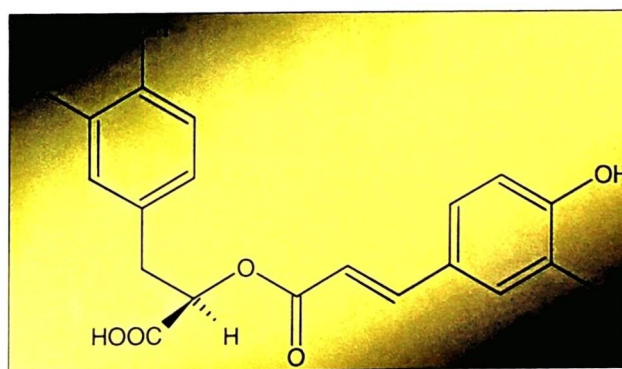


Figura 30 - Estrutura molecular do ácido rosmarínico

A Figura 31 demonstra a estrutura do ácido rosmarínico em 3 dimensões.

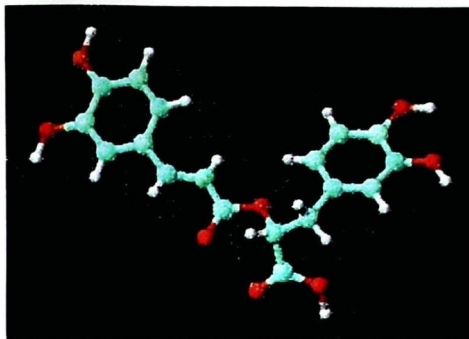


Figura 31 - Estrutura do ácido rosmarínico em três dimensões.

O ensaio biológico mais promissor para o AR foi a inibição da miotoxicidade das BthTX-I e II, o que indica uma provável inibição de alterações sobre a membrana plasmática e conseqüentemente as fibras musculares esqueléticas. O estudo da atividade miotóxica foi realizado através da metodologia de dosagem de CK no plasma. Esta enzima está concentrada no músculo cardíaco, músculo esquelético e cérebro. Aumento nos níveis de CK são observados no sangue quando células que contêm a enzima são lesadas (NOAKES, 1987). Portanto a liberação de CK é um indicador de degeneração muscular, podendo também ocorrer em quadro de hemorragia grave (MEBS & OWNBY, 1990).

O veneno de *B. jararacussu* é bastante estudado por sua ação miotóxica, ou seja, aumento da liberação da enzima CK no organismo e destruição do tecido muscular. QUEIROZ *et al.* (1985) observaram necrose das fibras musculares 10 min. após injeção do veneno desta serpente em ratos.

Estudos *in vitro*, realizados em músculos isolados também demonstram que tanto o veneno bruto quanto as miotoxinas BthTX-I e II induzem aumento de liberação da enzima CK ao meio (MELO *et al.*, 1994).

O veneno bruto de *B. jararacussu* e a toxina BthTX-II possuem atividade fosfolipásica que podem influenciar na liberação da enzima CK (MELO *et al.*, 1994). A toxina BthTX-I possui estrutura homóloga à PLA₂ e embora ausente desta atividade apresenta ação sobre os mastócitos (LANDUCCI *et al.*, 1998), que podem aumentar os níveis de CK no plasma.

Os resultados obtidos demonstram que é preciso doses baixas (2,5 mg/Kg) de AR para ocorrer a inibição significativa ($p < 0,05$) da miotoxicidade promovida pelas BthTX-I e II (Fig. 23 e 24).

Apesar de estudos com atividade hemorrágica não ser muito comum com o veneno de *B. jararacussu*, o veneno desta serpente apresenta esta ação farmacológica (QUEIROZ *et al.*, 1984), assim resolvemos testar a ação do AR sobre a atividade hemorrágica induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu*.

A inibição da atividade hemorrágica foi atingida com uma concentração extremamente alta para um principio ativo isolado (Fig. 26), demonstrando que este P.A não tem especificidade a algum constituinte do veneno bruto. Como citamos anteriormente, a hemorragia é provocada principalmente pela ação de metaloproteínas, demonstrando assim, que o AR atua melhor na inibição de proteínas com estrutura fosfolipásica.

Com as avaliações realizadas para atividade fosfolipásica, em meio de cultura, o AR demonstra maior especificidade para inibição das fosfolipases de característica básica como a BthTX-II.

Observando as Figuras 25 B e C podemos concluir que ocorreu uma inibição significativa da atividade fosfolipásica da toxina BthTX-II, mas não houve inibição da atividade exercida pela toxina BthA-I-PLA₂ que se trata de uma fosfolipase ácida.

A atividade anticoagulante foi realizada com a toxina BthTX-II, e sua inibição não foi alcançada com o AR, comprovando assim que este princípio ativo não atua diretamente ou não se liga as toxinas mas sim, atuando sobre seus efeitos ou agindo sobre o sítio de ligação das toxinas, onde para comprovarmos esta afirmação será necessário fazermos uma co-cristalização do AR com as BthTX-I e II.

A atividade fosfolipásica não foi realizada com a toxina BthTX-I por esta ser desprovida de tal atividade (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988).

O mecanismo de ação do AR ainda é uma incógnita, para melhor avaliá-lo será necessário fazermos estudos histopatológicos comparando os tecidos tratados apenas com as toxinas BthTX-I e II e de tecidos tratados com as toxinas mais o AR. Também é importante realizarmos avaliações biológicas comparando antiinflamatórios clinicamente conhecidos como os corticóides e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) com o AR, para assim deciframos seu mecanismo de ação já que até o momento são conhecidos três tipos de mecanismos: os inibidores de fosfolipases, os inibidores da cicloxigenase e os inibidores da lipoxigenase (SIQUEIRA, 2000).

Para verificarmos se o extrato metanólico ou o AR estavam degradando o veneno e as toxinas, utilizamos a técnica de eletroforese para visualizar este tipo de ocorrência. Observando as Figuras 28 e 29 podemos concluir que o extrato metanólico e o AR não degradam as toxinas, nem o veneno bruto, ou seja, o extrato metanólico e o princípio ativo isolado da planta *C. verbenacea* não alteram o perfil protéico das toxinas e do veneno como demonstrado na eletroforese.

7 -CONCLUSÃO

Não siga por caminhos já traçados
Faça sua trilha e deixe sua marca

Fabio Kiss Ticli

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O extrato metanólico da planta *Cordia verbenacea* não inibe o edema provocado pelo veneno bruto da serpente *Bothrops jararacussu* na concentração de 25 mg/Kg, mas inibe consideravelmente ($p < 0,05$) o edema provocado pelas toxinas BthTX-I e II, principalmente da toxina BthTX-I na mesma concentração.
- Foi padronizada a metodologia para isolar o princípio ativo a partir do extrato metanólico da planta *Cordia verbenacea*, utilizando duas metodologias rápidas, que consiste em:
 - Filtração em Sephadex LH-20 e eluição com metanol.
 - Técnica cromatográfica CLAE em uma coluna C-18 eluída com metanol:água, em gradiente de concentração.
- A estrutura do princípio ativo foi determinada pelos métodos espectrofotométricos: RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HMBC, HMQC e IV. Sendo identificado o ácido rosmarínico (AR). Este produto fitoquímico puro trata-se de um composto polifenólico com características polares, por ser facilmente solúvel em soluções salina, PBS e água.
- O AR, assim como o extrato metanólico inibe consideravelmente o edema provocado pela toxina BthTX-I ($p < 0,05$) nas respectivas concentrações: 8,5 mg/Kg e 25 mg/Kg.
- O AR inibe significativamente ($p < 0,05$) a miotoxicidade induzida pelas toxinas BthTX-I e II na concentração de 2,5 mg/Kg e a atividade fosfolipásica promovida pela BthTX-II.
- A hemorragia causada pela ação do veneno bruto de *B. jararacussu* é inibida pelo AR em doses elevadas (30 e 50 mg/Kg).

- Este composto não apresenta inibição significativa para as atividades anticoagulante e coagulante, demonstrando atuar especificamente nos ensaios envolvendo ações inflamatórias, como edema e miotoxicidade.
- O extrato metanólico e o AR não degradam o veneno e as toxinas.

8 -REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

O conhecimento não está apenas em livros,
está em nossos instintos e na busca de nossos limites.

Autor desconhecido

AL-AWADI, F.M.; SRIKUMAR, T.S.; ANIM, J.T.; KHAN, I. Antiinflammatory effects of *Cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats. **Nutrition**, Stanford, v.17, p.391-396, 2001.

AMARAL, A. **Serpentes do Brasil**: iconografia colorida. 2^a ed., Ed. Melhoramentos, São Paulo, 1977.

ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; ASPERTI, M.C.A.; MANDELBAUM, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, Amsterdam, v.23, p.691-706, 1985.

AUF'MKOLK, M.; KOHRLE, J.; GUMBINGER, H.; WINTERHOFF, H.; HESCH, R.D. Antihormonal effects of plant extracts: iodothyronine deiodinase of rat liver is inhibited by extracts and secondary metabolites of plants. **Horm. Metab. Res.**, Stuttgart, v.16, p.188-192, 1984.

BARRAVIERA, B. **Venenos Animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUB, cap.63 p.97-105, 1994.

BARRAVIERA, B. **Venenos**: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro, EPUB, 411p. 1999.

BATINA, M.F.C.; CINTRA, A.C.O.; VERONESE, E.L.G.; LAVRADOR, M.A.S.; 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**, Stuttgart, v.66, p.424-428, 2000.

BATINA, M.F.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Methodological care in the evaluation of the LD₅₀ and neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by plant *Peschiera fuschiaefolia* (Apocynaceae). **The J. of Venous Animal and Toxins**, Botucatu, v.3, p.115-119, 1997.

BAYEUX, M.C.; FERNANDES, A.T.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.35, p.1229-1232, 2002.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, New York, v.62, p.325-372, 1994.

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

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, 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**, Amsterdam, v.39, p.1863-1869, 2001.

BORTOLETO, R.K.; MURAKAM, M.T.; WATANABE, L.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, Amsterdam, v.40, p.1307-1312, 2002.

CALHOUN, W.; YU, J.; SUNG, A.; CHAU, T.T.; MARSHALL, L.A.; WEICHMAN, B.M.; CARLSON, R.P. Pharmacologic modulation of D-49 phospholipase A₂ paw edema in the mouse. **Agents Actions**, Berlin, v.27, p.418-421, 1989.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Ed. UFRGS, 4 ed., Porto Alegre, p. 833, 2002.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMANA, E.; Neutralization of the hemorrhagic effect induced by *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) venom with tropical plant extracts. **Rev. Biol. Trop.**, San José, v.47, p.605-616, 1999.

CERVELLATI, R.; RENZULLI, C.; GUERRA, M.C.; SPERONI, E. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the briggs-rauscher reaction method. **J. Agric. Food Chem.**, Los Angeles, v.50, p.7504-7509, 2002.

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

CHINZEI, H. Studies on the method of determining the effect of antymionecrotic factor antibody in habu-antivenom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, Tokyo, v.31, p.204-212, 1978.

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

CIRINO, G.; PEERS, S.H.; FLOWER, J.L.; PEPINSKY, R.B. Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw oedema test. **Proc. Nat. Acad. Science**, Washington, v.86, p.3428, 1989.

da SILVA, J.O. **Avaliação do efeito do extrato de *Pentaclethra macroloba* W. (Fabaceae) sobre as atividades letal e miotóxica induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox***. Tese mestrado, Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 2001.

DAL PAI, V.; NETO, H.S. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro, Ed. EPUC, p.411, 1994.

DE HAAS, G.H.; POSTEMA, N.M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.159, p.103-117, 1968.

de ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; DOKMETJIAN, J.C.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J.C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, Amsterdam, v.38, p.865-873, 2000.

DIAZ, C., GUTIERREZ, J.M., LOMONTE, B.; GENÉ, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipases A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochem. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1070, p.455-460, 1991.

DOS SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, São Paulo, v.34, n.4, p.77-83, 1992.

ESMERALDINO, L.E. **Avaliação da ação do extrato aquoso de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae) sobre a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca***. Tese mestrado, Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 1998.

FALKENBERG, M.B.; DOS SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS, 4 edição, Porto Alegre, p.833, 2002.

FEIGL, F. Spot test, Organic Application, v.II. **Elsevier Publishing Company**, 1954.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; TOMMASINI, S.; CALABRO, M.L.; RAGUSA, S.; BARBERA, R.; RAPISARDA, A. Leaf extracts of some *Cordia* species: analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. **Farmaco**, Turim, v.50, p.245-256. 1995.

FLETCHER, J.E.; JIANG, M. Lys₄₉ phospholipase A₂ myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. **Toxicon**, Amsterdam, v.36, p.1549-1555, 1998.

GUIL-GUERRERO, J.L.; GOMEZ-MERCADO, F.; RODRIGUEZ-GARCIA, I.; CAMPRA-MADRID, P.; GARCIA-MAROTO, F. Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid (III): the taxonomical value of the fatty acids in *Echium* (Boraginaceae). **Phytochemistry**, New York, v.58, p.117-120, 2001.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon**, Amsterdam, v.18, p.315-321, 1980.

GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, Amsterdam, v.18, p.603, 1980.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; ROJAS, E.; BOLAÑOS, R. Efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* en ratón blanco. **Toxicon**, Amsterdam, v.18, p.633, 1980.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, A review v.51, p.211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Pathol.**, Berlin, v.40, p.367-370, 1984.

GUTIÉRREZ, J.M.; NUÑEZ, J.; DÍAZ, C.; CINTRA, A.C.O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of BthTX-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Mol. Pathol.**, Berlin, v.55, p.217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; NUÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.**, Berlin, v.62, p.28-41, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie.**, Paris, v.8, p.841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M. Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. **Rev. Biol. Trop.**, San José, v.50, p.377-394, 2002.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS, 4 edição, Porto Alegre, p.833, 2002.

HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. **Biochemistry**, Columbus, v.26, p.780-787, 1987.

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

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, Missouri, v.9, p.401-410, 1964.

ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHIMA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.262, p.3132-3135, 1987.

JIM, J.; SAKATE, M. Biologia das serpentes. In: Barraviera, B. **Venenos**: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Ed. EPUB, Rio de Janeiro, p.411, 1999.

KIM, H.K.; LEE, H.K.; SHIN, C.G.; HUH, H. HIV integrase inhibitory activity of *Agastache rugosa*. **Arch. Pharm. Res.**, New York, v.22, p.520-523, 1999.

KOLTRHOFF, I.M.; SANDEL, E.R.; MECHAN, E.J.; BANCKESTEIN, S. In: **Quantitative Chemical Analysis**, 4 ed., p.819, 1971.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, Tokyo, v.13, p.43-51.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v.227, p.680-685, 1970.

LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; PEREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. **European J. of Pharm.**, Amsterdam, v.343, p.257-263, 1998.

LIDDELL, J.R. Pyrrolizidine alkaloids. **Nat. Prod. Rep.**, Cambridge, v.18, p.441-447, 2001.

MAKINO, T.; ONO, T.; LIU, N.; NAKAMURA, T.; MUSO, E.; HONDA, G. Suppressive effects of rosmarinic acid on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. **Nephron**, Basel, v.92, p.898-904, 2002.

MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, Amsterdam, v.22, p.193-206, 1984.

MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: **Animal, Plant and Microbial Toxins**. London, Plenum Press, p.111-121, 1976.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, Amsterdam, V.3, p.1131-1142, 1992.

MATSUNO, M.; NAGATSU, A.; OGIHARA, Y.; MIZUKAMI, H. Synthesis of 2-O-(4-coumaroyl)-3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid an important intermediate of rosmarinic acid biosynthesis. **Chem. Pharm. Bull**, Hiroshima, v.49, p.1644-1646, 2001.

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

MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. Local microtomy effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, Amsterdam, v.21, p.393-404, 1983.

MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.**, New York, V.48, p.223-236, 1990.

MELO, P.A.; NASCIMENTO, M.C. do; MORS, W.B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and haemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, Amsterdam, v.32, p.595-603, 1994.

MOREIRA, F. **Plantas que curam**. Ed. Hemus, 5° ed., São Paulo, p. 256, 1996.

MOREIRA, L., BORKOW, G., OVADIA, M., GUTIÉRREZ, J.M. Pathological changes induced by *BaH1*, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, Amsterdam, v.32, p.977-987, 1994.

MORENO, J.J.; FERRER, X.; ORTEGA, E.; CARGANICO, G. PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cell. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. **Agents Action**, Berlin, v.36, p.258-263, 1992.

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

MORS, W.B. Plants against snakebites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, p.193-193, Suppl.2, 1991.

NAKADA, F.; UEZU, N.; OHSHIRO, M.; MIYAGI, K. Relation between serum creatine phosphokinase activity and the amount of Habu (*Trimeresurus flavoridis*) snake venom injected in thigh muscle in rabbits. **Toxicon**, Amsterdam, v.18, p.351-355, 1980.

NAKAZAWA, T.; OHSAWA, K. Metabolism of rosmarinic acid in rats. **J. Nat. Prod.**, Washington, v.61, p.993-996, 1998.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, Columbus, v.33, p.1843-1849, 1994.

NOAKES, T.D. Effects of exercise on serum enzyme activities in humans. **Sports Medicine**, Toronto, v.4, p.245-267, 1987.

OHSAKA, A.; OMORI-SATOH, T.; KONDO, H.; KONDO, S.; MURATA, R. Biochemical and pathological aspects of hemorrhagic principles in snake venoms with special reference to Habu (*Trimeresurus flavoviridisflavoviridis*) venom. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v.33, p.193-205, 1966.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCIA, M.E.; DIAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **J. Ethnopharm.**, Amsterdam, v.71, p.505-511, 2000.

OWNBY, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: **Rattlesnake Venoms, their Actions and Treatment**. Ed. Marcel Dekker, New York, p.109-163, 1982.

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

PEREIRA, P.S.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; DIAS, D.A. Índole alkalóids from *Tabernaemontana catharinensis*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.501, p.171-176, 1999.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M.S. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, New York, v.62, p.121-125, 2003.

PRUZANSKI, W.; VADAS, P. Phospholipase A₂ – a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. **Immunol. Today**, Londres, v.12, p.143-146, 1991.

QUEIROZ, L.S.; PETTA, C.A. Histopathological changes caused by venom of urutu sake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v.26, p.247-253, 1984.

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

ROSENBERG, P. Phospholipases. In: **Handbook of Toxinology**. Ed. Marcel Dekker, New York, p.67-277, 1990.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous Animals and their Venoms**, v.2, Ed. W.Burcherl and E. Buckley, New York, p.345, 1971.

RUFINI, S.; CESARONE, P.; DESIDERE, A.; FARIAS, R.; GUBENSEK, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; ULY, R.; MASSOUD, R.; MORENO, R.; PEDERSON, J.Z. Calcium ion independent membrane leakage by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, Columbus, v.31, p.12.424-12.430, 1992.

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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86 p.203-205, Suppl.2, 1991.

SÉRTIE, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Planta Médica**, Stuttgart, v.1, p.7-10, 1988.

SÉRTIE, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. AntInflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Médica**, Stuttgart, v.2, p.36-40, 1990.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, Ed. Guanabara Koogan, 5^a ed., Rio de Janeiro, p. 387, 1994.

SIQUEIRA, J.F. Inflamação aguda: Mediadores químicos. In: DANTAS, C.J.S.; SIQUEIRA, J.F. **Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação**. Rio de Janeiro, Ed. MEDSI, p.83-104, 2000.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULA, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, San Diego, v.373, p.7-15, 2000.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; INAZU, M.; EGASHIRA, T.; MATSUMIYA, T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.449, p.261-267, 2002.

TU, A.T. **venoms: chemistry and molecular biology**. New York, Ed. John Wiley & Sons, p.560, 1977.

TREBIEN, H.A., CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, Berlin, v.26, p.292-300, 1989.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂ ?. **Biochimie**, Paris, v.82, p.815-831, 2000.

VAN BEEK, T.A.; VERPOORTE, R.; BAERHEIM SVENDSEN, A.; LEEWENBERG, A.J.M.; BISSET, N.G. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. **J. Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.10, p.1-156, 1984.

VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S.M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: **Venenos**: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. BARRAVIERA, B. p.205-223, 1999.

VERONESE, E.L.G.; CINTRA, A.C.O.; DIAS, D.A.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; SAMPAIO, S.V. Anticrotalic activity of the ethanolic extract from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. and its fractions. **II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare.**, Mendoza – Argentina, p.356, 1997.

VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; TROMBONE, A.P.F.; SANTANA, A.E.; ANDISSON, F.A.; CAMPOS, M.I.Y.; 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 from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC (Apocynaceae). **Toxicon**, Amsterdam, 2003 (submetido).

VIDAL, J.C.; STOPPANI, A.O.M. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch. Biochem. Biophys.**, San Diego, v.145, p. 543-549, 1971.

VIDAL, J.C.; CATTANEO, P.; STOPPANI, A.O.M. Some characteristic properties of phospholipases A_2 from *Bothrops neuwieddi* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, San Diego, v.151, p.168-179, 1972.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A_2 enzymes from Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, Amsterdam, v.25, p.501-515, 1987.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: **Farmacodinâmica**. 6^o ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.1044-1074, 1982.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.V. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography Atlas**. Ed. Springer-Verlag, Berlin, p.284, 1984.

WANG, J.P.; TENG, C.M. Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A_2 enzymes isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, Belfast, v.42, p.846-850, 1990.

WOLLENWEBER, E.; WEHDE, R.; DORR, M.; STEVENS, J.F. On the occurrence of exudate flavonoids in the borage family (Boraginaceae). **Z. Naturforsch**, Tubingen, v.57, p.445-448, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981) Progress in Characterization of Venoms and Standartization of Antivenoms. Geneva: World Health Organization.

ZOU, Z.W.; XU, L.N.; TIAN, J.Y. Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from radix *Salviae miltiorrhizae* (danshen).

Yao Xue Xue Bao, Pequim, v.28, p.241-245, 1993.