

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Renata dos Santos Fernandes

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA

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

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Renata dos Santos Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

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

Ribeirão Preto
2011

RESUMO

Fernandes, R.S. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato de *Serjania erecta* Radlk *in natura* e *in vitro*: isolamento e caracterização estrutural de compostos bioativos**. 2011. 84f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

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

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

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

ABSTRACT

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

Snake venoms are a complex mixture of enzymes and toxic proteins. In Brazil, *Bothrops* snakes are responsible for most accidents with venomous animals, which cause local tissue damage (hemorrhage, edema and necrosis) and systemic effects (blood clotting disorders). Snakebites are often treated with parenteral administration of antivenom, aimed at the neutralization of toxins. However, despite the success of serum therapy, it is important to search for inhibitors that can neutralize the local tissue damage. Plant extracts constitute a rich source of pharmacologically active compounds, and many extracts present antiophidian activity. In this study, the methanolic extract of leaves of *Serjania erecta*, a medicinal plant with anti-inflammatory properties, was subjected to chromatographic fractionation, resulting in four main fractions that were evaluated by phytochemical tests, revealing the presence of saponins, terpenes, flavonoids (SF3) and tannins (SF4). The isolation and characterization of two flavone glycosides of the flavonoid-rich fraction (isovitexin and vitexin) were also achieved. Moreover, the *in vitro* cultures of *Serjania erecta* also established to allow, in the near future, the continuous production of secondary metabolites, as well as the conservation of this plant species. The aim of this study was to evaluate the effect of methanolic extract of aerial parts of *S. erecta* and its fractions, isolated compounds and methanolic extract of callus against the enzymatic and pharmacological effects induced by snake venoms and isolated toxins. The phospholipase A₂ activity induced by snake venoms of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus*, and isolated toxins (BthTX-II and crotoxin) was inhibited by the samples tested, and the fractions SF3 and SF4 completely inhibited the toxin BthTX-II, whereas crotoxin was inhibited successfully by the action of fraction SF4. The methanolic extract of *S. erecta* and fraction SF3 were able to prevent the fibrinolytic action of *B. moojeni* venom. The methanolic extracts of callus and aerial parts of *S. erecta*, fractions SF3 and SF4, and flavones promoted partial protection of fibrinogen chains when incubated together with the *B. jararacussu* venom. Vitexin, SF3 and SF4 were potent inhibitors of the coagulant activity induced by *B. jararacussu* venom. BthTX-I edema-inducing activity was inhibited by vitexin, SF3 and SF4. The hemorrhagic activity of *B. jararacussu* and *B. neuwiedi* venoms were inhibited by the action of methanolic extract of aerial parts of *S. erecta* and its fractions. This extract is a promising source of natural inhibitors, as flavonoids and tannins, which act forming complexes with metal ions and proteins, inhibiting the action of serine proteases, metalloproteases and phospholipases A₂. The molecular modeling studies done between myotoxin BthTX-I and the compounds showed that the toxin-inhibitor complex is stabilized by hydrogen bonds with the side chains of amino acid residues in the region of the catalytic site of toxin. Moreover, the circular dichroism spectra revealed no significant changes in the secondary structures of

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

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

INTRODUÇÃO

Acidentes Ofídicos

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

As serpentes estão distribuídas por quase todos os ambientes terrestres. Há aproximadamente 2900 espécies de serpente no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, sendo que apenas 410 são consideradas peçonhentas e classificadas de acordo com suas características morfológicas em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae. No Brasil, encontramos representantes das famílias Viperidae e Elapidae, sendo que 32 serpentes pertencem ao gênero *Bothrops*, 29 ao gênero *Micrurus*, seis ao gênero *Crotalus* e duas ao gênero *Lachesis* (FUNASA, 2001).

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

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

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

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

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

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

Plantas Medicinais com Atividade Antiofídica

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

idades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo ainda mantém a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002). O uso dos recursos vegetais está presente na cultura popular que é transmitida a gerações no decorrer da existência humana. Este conhecimento tende a desaparecer, quando consideramos que vastas áreas do território nacional e principalmente do cerrado estão dando lugar a regiões de pastagem e monoculturas.

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

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

Há diversos estudos demonstrando que a flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico que podem ser utilizadas no futuro como drogas ou como modelo para drogas de interesse médico-científico (Tabela 1). Mors e colaboradores (2000) citam 104 plantas indicadas pela medicina popular brasileira como antiofídicas e ainda as várias classes de compostos relacionados com ação antiofídica. Martz (1992) listou 11 espécies que se mostraram ativas contra a peçonha de serpente. Em um trabalho anterior, Mors (1991) listou 578 espécies de plantas ativas contra peçonha de serpentes, pertencentes a 94 famílias. Além disso, Otero e colaboradores (2000a, b, c) descreveram uma lista de 74 plantas coletadas na Colômbia, na presença de “curandeiros”, avaliando-se o nome popular, uso indicado, via de administração e localização. Na maioria dos casos as plantas são preparadas em infusão, decocção ou maceração e administradas por via oral. Em outras ocasiões são utilizadas diretamente sobre o local da picada, podendo-se banhar o local com o extrato da planta ou vaporizando a região afetada, além da possível aplicação do extrato na forma de cataplasma, ou seja, compressas umedecidas sobre o local da picada.

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

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

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

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

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

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

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

*: não pertencentes à flora brasileira, mas foram introduzidas por imigrantes ou colonizadores.

Tabela adaptada do artigo publicado por Soares e colaboradores (2005).

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

Flavonóides com Atividade Antiofídica

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

Em 1993, Lindahl e Tagesson chegaram à conclusão de que a quercetina é um potente inibidor de PLA₂ pertencentes ao grupo II isolada da peçonha de *Vipera russelli*. Além disso, Lindahl e Tagesson (1997) descreveram o efeito inibitório de alguns flavonóides, particularmente a atividade da rutina sobre fosfolipases isoladas das peçonhas de *Vipera russelli* e *Crotalus atrox*. Uma PLA₂ isolada da peçonha de *Crotalus durissus cascavella* foi submetida a tratamento com a morina, um flavonóide, que induz severas modificações nos aminoácidos aromáticos desta enzima (IGLESIAS et al., 2005). Girish e Kemparaju (2005) estudaram a inibição de

uma hialuronidase isolada da peçonha de *Naja naja*, onde a quercetina inibiu completamente a atividade enzimática, enquanto que a flavona e o ácido tânico inibiram a atividade enzimática em 89 e 94%, respectivamente.

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

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

Serjania erecta

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

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

Entre as espécies mais estudadas deste gênero destaca-se a *Serjania lethalis*, que é tradicionalmente indicada como antiinflamatório, analgésico (uso externo) e piscicida (TEIXEIRA et al., 1984). O extrato etanólico de *S. lethalis* inibiu a produção de óxido nítrico (NO), um importante mediador inflamatório produzido por macrófagos. Contudo, quando ocorre uma produção exagerada de NO durante uma infecção, freqüentemente ocorre dano ao tecido endotelial, que pode levar a colapso vascular e morte (NAPOLITANO et al., 2005). Ainda sobre esta espécie, Mesquita e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato etanólico das cascas das raízes

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

Outra espécie estudada é a *S. salzmanniana* que apresenta saponinas com atividade moluscicida contra a *Biomphalaria Alexandrina*, um vetor da *Schistosoma mansoni* no Vale do Nilo. Estas saponinas também demonstraram atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (EKABO; FARNSWORTH, 1996). Di Stasi e colaboradores (1988) concluíram que o extrato H₂O/MeOH 50% da espécie *S. communis* possui atividade analgésica quando administrado por via oral em ratos. A *S. glabrata*, cujo extrato metanólico apresentou atividade antioxidante contra a oxidação do β-caroteno, apresenta baixa toxicidade no Teste com *Artemia salina* (DAVID et al., 2007).

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



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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os extratos *in natura* e *in vitro* de *S. erecta* apresentaram atividade inibitória sob os efeitos das peçonhas de serpente dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, bem como de toxinas isoladas.
- A análise CLAE/UV/DAD mostrou ser uma ferramenta útil na detecção dos dois compostos fenólicos isolados do extrato das folhas de *S. erecta*. Esta análise mostrou que o extrato das folhas de *S. erecta* e o extrato das culturas *in vitro* de *S. erecta* são ricos em compostos fenólicos, mas não necessariamente os mesmos.
- A cultura de calos estabelecida durante este estudo é uma ferramenta de obtenção de compostos biologicamente ativos, e segundo as análises realizadas no CLAE a cultura de calos de *S. erecta* parece ser fonte promissora de compostos biologicamente ativos e o estudo fitoquímico preliminar indicou a presença de compostos fenólicos semelhantes aos encontrados na planta *in natura*.
- A partir do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* foi possível a obtenção de duas flavonas glicosiladas, a isovitexina (apigenina-6-C- β -D-glicopiranosídeo) e a vitexina (apigenina-8-C- β -D-glicopiranosídeo), identificadas a partir da utilização de técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , e espectro de massa.
- Este é o primeiro estudo fitoquímico da *S. erecta* onde foi realizado o isolamento e a caracterização estrutural de compostos ativos com propriedades antiofídicas presentes nesta espécie vegetal.
- As atividades fosfolipásicas induzidas pelas peçonhas de *B. jararacussu* e *C. d. terrificus*, e pelas toxinas BthTX-II e crotoxina foram inibidas em níveis diferentes

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

- O extrato metanólico *in natura* de *S. erecta* e a fração SF3 foram capazes de prevenir a degradação das cadeias do fibrinogênio sobre a ação da peçonha de *B. moojeni*. Já os extratos metanólicos *in natura* e dos calos de *S. erecta*, as frações SF3 e SF4, e as flavonas promoveram proteção parcial das cadeias do fibrinogênio quando incubados juntos com a peçonha de *B. jararacussu*.
- Nos ensaio sobre a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e a atividade indutora de edema induzida pela toxina BthTX-I, as frações SF3 e SF4, ricas em flavonóides e taninos, respectivamente, mostraram que esses compostos atuam como potentes inibidores destas atividades.
- Em comparação com a isovitexina, a vitexina possui importante propriedades anticoagulante e de inibição da atividade indutora de edema. Isto pode indicar que embora estas flavonas sejam isômeras a posição do açúcar pode influenciar na interação entre o inibidor e a toxina.
- As atividades hemorrágicas das peçonhas de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* foram inibidas pela ação do extrato metanólico das folhas de *S. erecta* e de suas frações, sendo que a fração SF4, rica em tanino, apresentou alta atividade inibitória sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. neuwiedi*.
- A miotoxicidade induzida pelo veneno de *B. jararacussu* e sua miotoxina isolada, BthTX-I, foi significativamente reduzida no ensaio onde foi feita a incubação prévia com os inibidores. Enquanto que no ensaio sem incubação prévia, foi possível observar que quanto mais rápida é a administração do inibidor, maior é a eficiência na inibição dos efeitos tóxicos provocados pela ação da toxina.

- O estudo *in silico* dos complexos formados entre BthTX-I e os compostos isolados do extrato de *S. erecta* indicam a formação de ponte de hidrogênio entre os inibidores e os aminoácidos presentes no sítio ativo da toxina, o que explicaria a inibição das atividades tóxicas de BthTX-I.
- Nos estudos por dicroísmo circular, os espectros demonstraram que a interação entre as toxinas testadas, BthTX-I e II, e as duas flavonas não revelaram mudanças significativas na estrutura secundária das toxinas, sugerindo uma interação mais específica entre essas moléculas.
- Tendo em vista que a partir do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de *S. erecta* foram obtidas outras frações com atividade antiofídica, além da fração rica em flavonóides, da qual foram extraídos as duas flavonas, seria interessante dar continuidade ao estudo fitoquímico desta espécie vegetal na busca por outros princípios ativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

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

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

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

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

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

BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHOM, J.-Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A₂ inhibitors. **Phytochemistry**. vol. 58, p. 865-874. 2001.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocinaceae) aqueous extract. **Biochimie**. vol. 85, p. 1017-1025, 2003.

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

BIONDO, R.; SOARES, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation by direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Reports**. vol. 22, p. 549-552, 2004.

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

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**. vol. 39, p. 1863-1869, 2001.

BORGES, M.H.; ALVES, D.L.; RASLAN, D.S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; DE LIMA, M.E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 98, p. 21-29, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

DA SILVA, J.O.; COPPEDE, J.S.; FERNANDES, V.C.; SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; MAZZI, M.V.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. SAMPAIO, S.V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 100, p. 145-152, 2005.

DA SILVA, J.O.; TICLI, F.K.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; MAZZI, M.V.; FRANCO, J.J.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. SAMPAIO, S.V. Triterpenoid saponin, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*: Antiproteolytic and antihemorrhagic properties. **Toxicon**. vol. 50, p.283-291, 2007.

DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**. vol. 52, p. 655-666, 2008.

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

Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. vol. 44, p. 312-321, 2009.

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

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

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

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

DIOGO, L.C.; FERNANDES, R.S.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D.L.; ROBERTO, P.G.; MATRANGULO, P.V.F.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; GIULIATTI, S.; SOARES, A.M.; LOURENÇO, M.V. Inhibition of snake venoms and phospholipases A₂ by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. vol.104, p. 293-299, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

GENÉ, J.A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**. vol. 27, p. 841-848, 1989.

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

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

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

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenin produced in Costa Rica. **Toxicon**. vol. 2, p. 411-413, 1988.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, in: R.M. Kini (Ed.), **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley & Sons, England, p. 321–352, 1997.

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

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

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

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

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

IGLESIAS, C.V.; APARÍCIO, R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CAMARGO, E.A.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D.O.; BERIAM, L.O.S.; MONTEIRO, H.S.A.; TOYAMA, M.H. Effects of morin on snake venom phospholipase A₂ (PLA₂). **Toxicon**. vol. 46, p. 751-758, 2005.

IZIDORO, L.F.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES, R.S.; FERRO, E.V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**. vol. 85, p. 669-675, 2003.

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

JANUÁRIO, A.H.; MARCUSSI, S.; SANTOS, S.L.; MAZZI, M.V.; SAMPAIO, S.V.; PIETRO, R. C.R.L.; CASTELLANO, E.E.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteradeae): Anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**. vol. 150, p. 243-251, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂. **Inflammation**. vol. 21, p. 347–356, 1997.

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

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. vol. 25, p. 429-438, 2002.

MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.; COUTO, L.B.; GOMES, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA, P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 102, p. 364-370, 2005.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STABELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. vol. 7, p. 743-756, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MORS, W. B. Plants active against snake bite. In: **Economic and Medicinal Plant Research**. vol. 5. Academic Press, New York, p. 353-373, 1991.

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

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

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

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

NAZATO, V.S.; RUBEM-MAURO, L.; VIEIRA, N.A.; ROCHA-JUNIOR, D.S.; SILVA, M.G.; LOPES, P.S.; DAL-BELO, C.A.; COGO, J.C.; DOS SANTOS, M.G.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; OSHIMA-FRANCO, Y. *In vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. **Molecules**. vol. 15, p. 5956-5970, 2010.

NEVES, P.C.A.; NEVES, M.C.A.; CRUZ, A.B.; SANT'ANA, A.E.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A₂ and phospholipase C. **European Journal of Pharmacology**. vol. 243, p. 213-219, 1993.

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

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

NISHIJIMA, C.M.; RODRIGUES, C.M.; SILVA, M.A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**. vol. 14, p.1072-80, 2009.

NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SAIDARRIAGA, M.; OSORIO, R.G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; DIAZ, A.; QUINTANA, J.C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. vol. 37, p. 969-977. 2004a.

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

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L.A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**. vol. 66, p. 1017-1025, 2005.

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

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

OTERO, R.; NUÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 71, p. 505–511. 2000b.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; DUARTE, D.S.; BORGES, M.H.; DE LIMA, M.E. Anti-PLA₂ action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bollettino Chimico Farmaceutico**. vol. 141, p. 457-460, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of a myotoxin I a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol. 373, p. 7-15, 2000a.

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

Structural and functional characterization of a BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol. 378, p. 201-209, 2000b.

SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; CECCHINI, A.L.; ARANTES, E.C.; FRANCA, S.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. vol.33, p. 877-888, 2001.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M ; GIGLIO, J.R . Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: Structure-function relationship. Review. **Current Organic Chemistry**, vol. 8, p. 1677-1690, 2004.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S.; Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medical Chemistry**. vol. 12, p. 2625-2641, 2005.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; FERNANDES, R.S.; MENALDO, D.L.; COSTA, T.R.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; PEREIRA, P.S. Medicinal plant extracts and molecules as the source of new anti-snake venom drugs. **Frontiers in Medicinal Chemistry**. Karachi-Pakistan: Bentham Science Publishers. vol. 4, p. 309-346, 2009.

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

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**. vol. 42, p. 947-962. 2003.

TICLI, F.K.; HAGE, L. I.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new phospholipases A₂ snake venom inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**. vol. 46, p. 318-327, 2005.

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

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

VALE, L.H.; MENDES, M.M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. vol. 103, p.104-7, 2008.

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

VISHWANATH B.S.; GOWDA, T.V. Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A₂: its effect on enzymatic and pathological activities. **Toxicon**. vol. 25, p. 929-37, 1987.

VISHWANATH, B.S.; FAWZY, A.A.; FRANSON, R.C. Edema inducing activity of phospholipase A₂ purified from synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. **Inflammation**. vol. 12, p. 549–561, 1988.

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

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