

TOXICIDADE AGUDA E PROPRIEDADES ANTIOFÍDICAS DO EXTRATO AQUOSO DE *CASEARIA GRANDIFLORA* (FLACOURTIACEAE): ATIVIDADES FOSFOLIPÁSICA A₂, MIOTÓXICA E LETAL DE PEÇONHAS DE *B. MOOJENI* E *B. NEUWIEDI*

ACUTE TOXICITY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CASEARIA GRANDIFLORA AQUEOUS EXTRACT (FLACOURTIACEAE): PHOSPHOLIPASE A₂, MYOTOXIC AND LETHAL ACTIVITIES OF VENOMS OF B. MOOJENI AND B. NEUWIEDI

Francislene Glória de FREITAS¹; Tatyana de Almeida SILVA²; Fábio de OLIVEIRA¹; Benvinda Rosalina dos SANTOS¹; Maria Inês HOMSI-BRANDEBURGO¹; Amélia HAMAGUCHI¹

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi estudar a ação do extrato aquoso de *C. grandiflora* (EA) sobre as atividades PLA₂, miotóxica e letal das peçonhas (P) de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* e sua toxicidade aguda. O EA (1:160; P:EA, m/m) inibiu em 74,5% e 57,5% a atividade PLA₂ das peçonhas e, em 51%, a atividade CK do plasma de camundongos induzida pela peçonha de *B. moojeni* na proporção de 1:4 (P:EA, m/m). Houve um aumento da sobrevivência (83%) dos camundongos que receberam EA preparado com folhas coletadas em novembro (1:26; m/m), resultado não encontrado com o EA preparado a partir de folhas coletadas em junho. A efeitos colaterais do EA de *C. grandiflora* foram ptose palpebral, letargia e piloereção e, apnéia, paralisia flácida e óbito (100%), respectivamente para as doses de 250 e 500 mg. kg⁻¹. Estes resultados indicam que o EA é uma fonte de compostos capazes de neutralizar alguns efeitos tóxicos de peçonhas botrópicas, porém, investigações adicionais são necessárias para eliminar ou minimizar seus efeitos colaterais.

UNITERMOS: Atividade antiofídica, *Casearia grandiflora*, Peçonha de serpentes, Inibidores de fosfolipase A₂, Antimiotoxinas, Toxicidade aguda.

Lista de abreviaturas: EA – extrato aquoso; P – peçonha; PBS – tampão fosfato; PLA₂ – fosfolipase A₂; CK – creatina quinase; DL – dose letal.

INTRODUÇÃO

As peçonhas das serpentes são constituídas por uma complexa mistura de componentes não-protéicos (aminoácidos livres, peptídeos, carboidratos, lipídios, nucleotídeos, amins biogênicas, vários cátions e ânions) e protéicos, que desencadeiam diversos efeitos locais e sistêmicos (VARANDA; GIANNINI, 1994). Os efeitos sistêmicos mais frequentes, em acidentes botrópicos, são a indução de choque, principal causa de morte, distúrbios na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares

(BARRAVIEIRA; PEREIRA, 1994; MEBS; OWNBY, 1990;), hemorragias gastrintestinais, náuseas, vômitos e hematúria (BARRAVIEIRA; PEREIRA, 1994). Quanto aos efeitos locais, destacam-se dor, edema, hemorragia e necrose tecidual (BARRAVIEIRA; PEREIRA, 1994; OLIVEIRA et al., 1999).

As fosfolipases A₂ são enzimas que hidrolisam o grupo 2 acil de sn-3 fosfoglicerídeos, liberando ácidos graxos, incluindo o ácido aracdônico, precursor de outros eicosanóides envolvidos em processos inflamatórios (DENNIS, 1994; LENNARTZ, 1999; PRUZANSKI;

¹ Professor do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

² Mestre em Genética e Bioquímica.

Received: 01/02/04 Accept: 04/03/05

VADAS, 1997). Estas enzimas podem ocasionar a perda permanente de tecido, se a necrose local for intensa, assim como, neurotoxicidade, miotoxicidade, citotoxicidade e efeitos anticoagulantes, dentre outros (PÁRAMO *et al.*, 1998).

Para minimizar tais efeitos tóxicos, o único tratamento utilizado pela medicina convencional é a soroterapia heteróloga, a qual não possui uma eficiência satisfatória para reverter os efeitos locais, além de poder causar reações imunológicas (BARRAVIEIRA, 1997).

Um tratamento alternativo ou complementar que vem se destacando é o uso de extrato de plantas medicinais, como fonte de inibidores naturais e componentes farmacológicos ativos. Dentre elas, tem-se a *Mandevilla velutina* (jalapa) que possui componentes com ação inibitória da fosfolipase A₂ e fosfolipase C em edemas de patas de camundongos (NEVES *et al.*, 1993); a *Tabernaemontana catharinensis* que inibe a atividade miotóxica e letal provocada pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus* em camundongos e reduz os níveis de liberação de creatina quinase induzidos pela peçonha de *B. jararacussu* (VERONESE *et al.*, 2005); a planta *Eclipta prostrata* inibidora da atividade miotóxica das peçonhas de *B. jararacussu* e *C. durissus terrificus* (MELO *et al.*, 1994; MORS *et al.*, 1989); a planta *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) que destaca-se por neutralizar as atividades da fosfolipase A₂ miotóxica, hemorrágica e letal de peçonhas crotálicas (BORGES *et al.*, 2005).

O presente trabalho foi desenvolvido com uma planta da região do Cerrado (sentido amplo), a *Casearia grandiflora*, pertencente à família Flacourtiaceae, visando reportar a sua habilidade para inibir atividades enzimáticas e farmacológicas das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* e a sua possível toxicidade aguda em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Peçonhas Brutas

As peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* foram cedidas pela empresa Pentapharm Com. Exp. Ltda. e pela professora Dr^a Vera Lúcia Brites responsável pelo Centro de Répteis do Instituto de Ciências Biológicas (UFU). As peçonhas liofilizadas foram ressuspendidas em tampão fosfato (PBS) antes do uso. A concentração de proteínas foi estimada de acordo com Itzaki e Gill (1964).

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (machos, massa média de 32 g) cedidos pelo biotério da empresa

Pentapharm Brasil Com. Exp. Ltda. (Uberlândia, MG) e mantidos em condições de temperatura ambiente, água e ração *ad libitum*.

Preparação do extrato vegetal

As folhas de *C. grandiflora*, coletadas na região de cerrado de Uberlândia (MG, Brasil) nos meses de julho e novembro, foram lavadas e homogeneizadas em água deionizada. Em seguida, o homogeneizado, obtido por filtração em uma camada de gazes e papel filtro, foi centrifugado a 30.000x g por 20 minutos e o sobrenadante liofilizado e estocado a -20°C. A concentração do extrato vegetal foi expressa em termos de massa seca/mL de PBS.

Atividade Fosfolipásica

A atividade enzimática foi realizada segundo o método descrito por De Haas *et al.* (1968) utilizando gema de ovo como substrato. Para o teste de inibição, soluções contendo 20 µg de peçonha foram misturadas previamente em proporções crescente de EA: 1:0, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:80 e 1:160. P: EA (m/m, P:EA incubado por 1 minuto). A inibição foi determinada pela redução percentual de unidades de microequivalentes de NaOH consumidos/mg/min.

Atividade Miotóxica

Grupos de três camundongos foram injetados via i.m. no músculo gastrocnemius direito, com uma mistura de peçonha (60 µg) e EA, incubada por 15 minutos a 37°C, nas seguintes proporções: 1:0 (controle positivo), 1:2 e 1:4 (m/m). O controle negativo recebeu a mistura na proporção de 0:12 (m/m). O sangue foi coletado em capilares heparinizados pela secção na cauda em intervalos de 2, 4, 8 horas e por punção cardíaca, após 24 horas decorrentes da injeção da mistura. Os animais do controle negativo tiveram o seu sangue coletado após 4 horas. A atividade creatina kinase (CK) foi determinada usando o kit *CK NAC Activated 335* da Randox. A atividade CK foi expressa em unidades por litro (U/L), uma unidade resultando da produção de um micromolar de NADH por minuto a 37°C.

Letalidade

Camundongos foram separados em oito grupos (G1 a G8; n = 06) e inoculados intraperitonealmente com três doses letais a 50% (DL₅₀ = 1,66 mg.kg⁻¹) da peçonha de *B. neuwiedi*: G1 a G3 – receberam peçonha e as respectivas doses de EA, 50, 100 e 400 mg.kg⁻¹, incubados por 15 minutos à temperatura ambiente (ensaios realizados com o EA preparado nos meses de novembro e junho); G4 a G6 – receberam as mesmas doses anteriores de

EA, 15 minutos antes da administração de peçonha (ensaios realizados com o EA preparado no mês de novembro); G7- recebeu somente peçonha (controle positivo) e G8 – recebeu somente salina a 0,9%. Os animais foram acompanhados por um período de 48 horas.

Toxicidade Aguda do EA de *C. grandiflora*

A toxicidade aguda do EA foi uma avaliação preliminar testada em camundongos por um período de 48 horas. Os animais separados em dois grupos (n = 06) receberam, por via intraperitoneal, 250 mg.kg⁻¹ ou 500 mg.kg⁻¹ de massa corpórea e foram mantidos em condições de temperatura ambiente (T_{média} = 23,75 ± 1,32°C), água e ração *ad libitum*.

A observação clínica dos sintomas foi realizada em tempos previamente determinados (0-5min; 15min; 1h; 2h; 4h e 24h), analisando alguns parâmetros comportamentais como: atividades dos sistemas nervoso

central (convulsões, depressão, letargia) e periférico (respiração, diarreia, piloereção, salivação). Após 24 horas, a taxa de mortalidade dos animais foi observada. Dos animais sobreviventes do grupo tratado com a dose de 250 mg.kg⁻¹, foi realizada coleta de amostras sanguíneas para análise hematológica.

RESULTADOS

Inibição da atividade PLA₂

As peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* apresentaram as seguintes atividades PLA₂ específicas: 48,86 ± 3,45 e 81,72 ± 2,37 U/mg, respectivamente. O EA inibiu de maneira diferenciada a atividade fosfolipásica destas peçonhas: obteve-se uma maior inibição na proporção de 1:160 (m/m), para a peçonha de *B. moojeni* (74,4 ± 4,4% - Fig.01), quando comparado com a peçonha de *B. neuwiedi* (57,5 ± 4,5% - Fig.01).

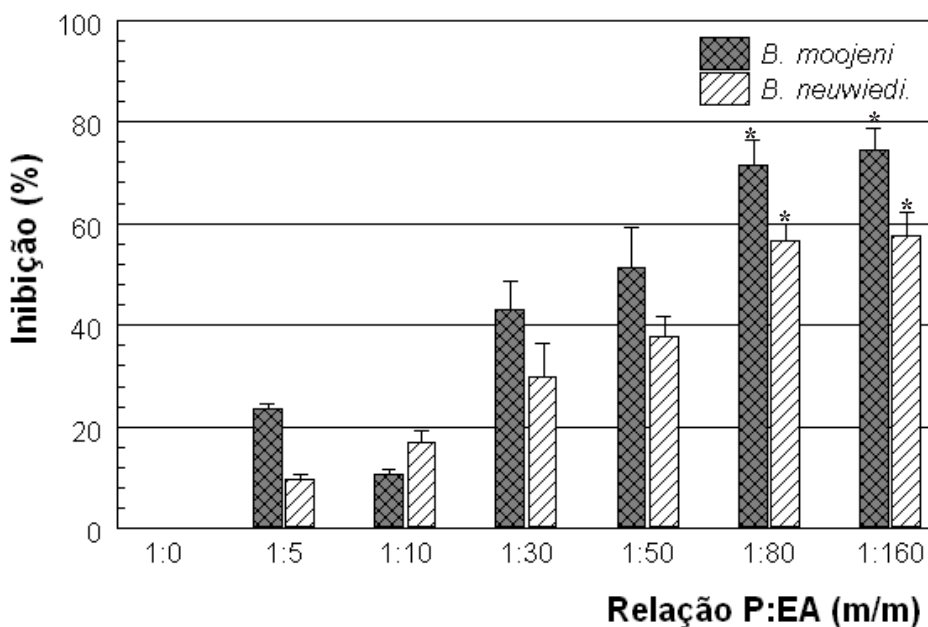


Figura 1. Efeito do EA sobre a atividade PLA₂ das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. Titulação potenciométrica de ácidos graxos liberados durante 3 min de reação à temperatura ambiente. As amostras testadas foram 20µg de peçonha para quantidades de EA crescentes (50µg-3.200µg). Os valores representam a média ± SD (desvio padrão de 3 ensaios). Testes Kruskal-Wallis e Wilcoxon; * Média com diferença do controle (P) (p < 0,05).

Inibição da Atividade Miotóxica da peçonha de *B. moojeni*

Ao se administrar intramuscularmente a peçonha de *B. moojeni* nos animais, houve aumento da atividade CK do plasma destes atingindo um pico 04 horas após administração, retornando a linha de base após 08 horas (Fig.02).

Na proporção de 1:4 (P:EA, m/m), o EA reduziu a miotoxicidade *in vivo* pois, 02 e 04 horas após a administração, houve um decréscimo da atividade CK em 38,5% e 51%, respectivamente (p < 0,05; Fig.02). A administração intramuscular de PBS (191,51 ± 41,00 U/L de plasma) e de 720 mg de EA (257,08 ± 68,97 U/L de plasma) não afetou nível de CK plasmático (p > 0,05).

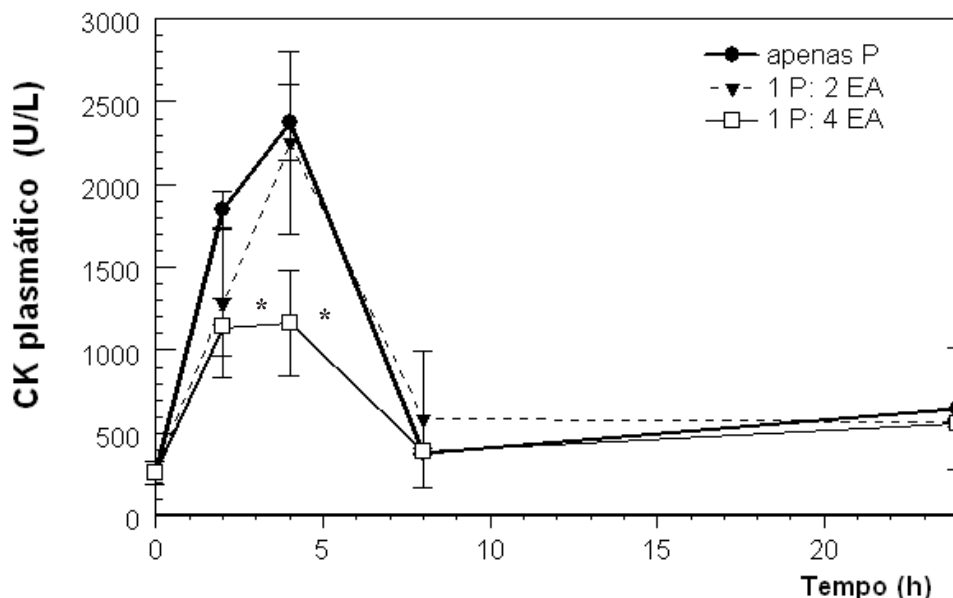
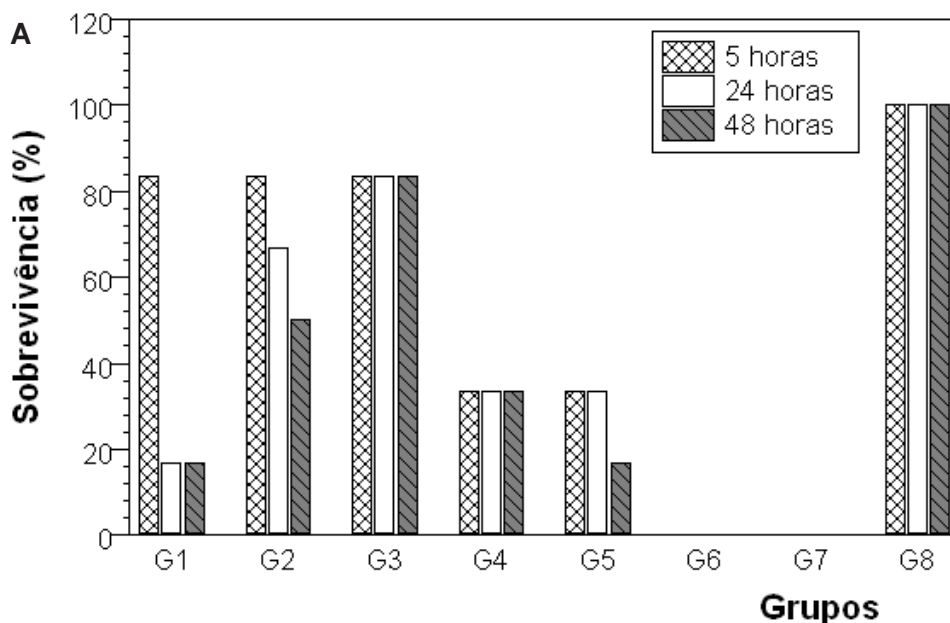


Figura 2. Efeito do EA sobre a atividade miotóxica da peçonha de *B. moojeni*. Atividade CK (U/L de plasma) do plasma de camundongos foi determinada em intervalos de 0, 2, 4, 8 e 24 horas após a administração i.m. de uma mistura de peçonha e EA, nas seguintes proporções: 1:0, 1:2 e 1:4. Os valores representam a média \pm SD (desvio padrão de 3 ensaios). Teste ANAVA e Newman-Keuls; * Média com diferença do controle (P) ($p < 0,05$).

Inibição da Letalidade da PB de *B. newwiedi*

Ao final de 48 horas, foi observado que o EA preparado com folhas coletadas no mês de novembro possibilitou uma sobrevivência maior para G1, G2 e G3 (P e EA misturados): 1, 3 e 5 animais, quando comparado com os grupos G4, G5 e G6 (EA inoculado anteriormente

ao P): 2, 1 e 0, respectivamente (Fig.03A). O G3 tratado com EA preparado a partir de folhas coletadas em junho apresentou 100% de óbito nas primeiras cinco horas, sendo que, nos G1 e G2 houve sobrevivência de apenas um animal em cada (Fig.03B).



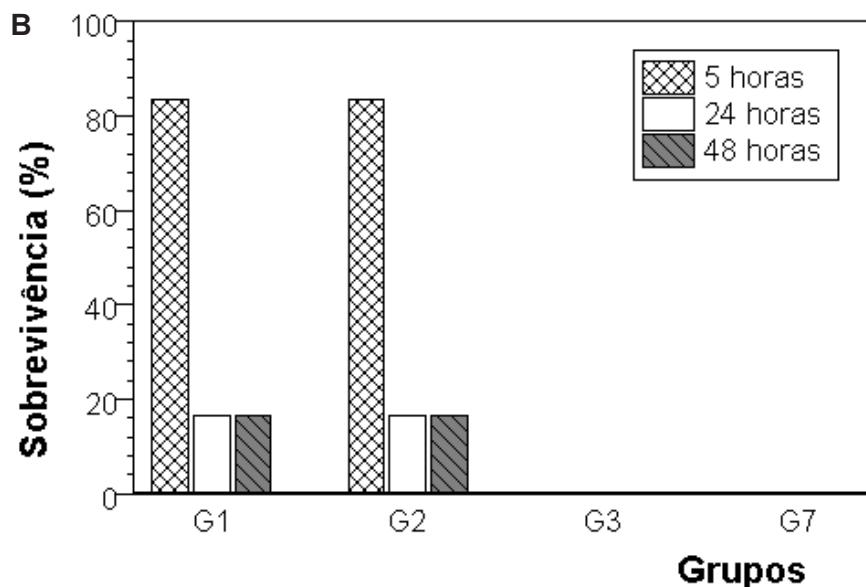


Figura 3. Sobrevivência de camundongos inoculados com 3 DL_{50} ($4,98 \text{ mg.kg}^{-1}$) de peçonha de *B. newwiedi* e EA preparado com folhas coletadas no em novembro (A) ou em junho (B). G1 a G3 receberam as doses de 50, 100 e 400 mg.kg^{-1} de EA misturadas com peçonha, respectivamente; G4 a G6 receberam EA (doses anteriores) 15 minutos antes de peçonha; G7, recebeu somente peçonha; e G8 recebeu somente salina 0,9%. $n = 06$. Teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon: * $p < 0,05$ para diferença entre o grupo tratado e o controle.

Ensaio Toxicológico com o EA de *C. grandiflora* em Camundongos

A dose de 500 mg.kg^{-1} causou mortalidade de 100% dos indivíduos nas primeiras duas horas, enquanto com a sub-dose de 250 mg.kg^{-1} não foi observado óbito durante o período de observação. Imediatamente após a

administração do EA, independentemente da dose administrada, os animais apresentavam-se letárgicos e insensíveis aos estímulos externos e, após 24 horas, os sobreviventes apresentaram recuperação da atividade exploratória (Tab.01).

Tabela 1. Análise farmacológica da toxicidade aguda do EA de *C. grandiflora*.

• 250 mg.kg^{-1} de massa corpórea							
Tempo (min ou h)	Defecação	Pelos arrepiados	Atividade motora \pm Canto da gaiola	Ptose palpebral	Tônus muscular	Morte	
0-5'	0/6	0/6	5/6	6/6	2/6	0/6	
15'	0/6	1/6	1/6	6/6	2/6	0/6	
1 h	0/6	3/6	0/6	6/6	3/6	0/6	
2 h	0/6	5/6	0/6	6/6	5/6	0/6	
4 h	0/6	6/6	0/6	6/6	6/6	0/6	
24 h	4/6	3/6	0/6	5/6	1/6	0/6	
• 500 mg.kg^{-1} de massa corpórea							
Tempo (min ou h)	Defecação	Pelos arrepiados	Atividade motora \pm Canto da gaiola	Ptose palpebral	Tônus muscular	Morte	
0-5'	0/6	0/6	6/6	6/6	0/6	0/6	
15'	0/6	0/6	1/6	6/6	0/6	0/6	
1 h	0/6	0/6	0/6	6/6	5/6	0/6	
2 h	0/6	1/6	0/6	6/6	6/6	6/6	

O EA foi administrado via intraperitoneal em camundongos nas doses de 250 mg e 500 mg.kg^{-1} de massa corpórea. Animais foram mantidos em condições de temperatura ambiente ($T_{\text{média}} = 23,75 \pm 1,32^\circ\text{C}$), água e ração *ad libitum*.

Quanto às alterações hematológicas, houve um aumento no número de plaquetas e uma queda no hematócrito ($p < 0,05$). Não houve diferença no número

médio de leucócitos entre os animais normais e tratados ($p < 0,05$ – Tab.02)

Tabela 2. Análise da toxicidade aguda do EA observada pelo hemograma do sangue de camundongos Swiss.

Elementos do sangue	Animais Normais*	Animais Tratados*
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	$8,58 \pm 0,80$	$5,33 \pm 2,72$
Hemácias ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$)	$8,13 \pm 0,54$	$7,23 \pm 0,89$
Hemoglobina (g. dl ⁻¹)	$13,72 \pm 1,11$	$11,87 \pm 1,75$
Hematócrito (%)	$44,56 \pm 2,96^{**}$	$36,65 \pm 6,00^{**}$
Plaquetas ($10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$ de sangue)	$888,6 \pm 97,41^{**}$	$1715,67 \pm 259,97^{**}$

Os animais receberam 250 mg.kg⁻¹ de EA por via intraperitoneal e foram mantidos em condições de temperatura ambiente ($T_{\text{média}} = 23,75 \pm 1,32^\circ\text{C}$), água e ração *ad libitum*. * Média e desvio-padrão referente a seis animais. ** Teste T-Student: $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde morrem cerca de 30.000 a 40.000 pessoas, vítimas de acidentes ofídicos (PINHO E PEREIRA, 2001) e os que sobrevivem apresentam seqüelas no local da picada. Sendo assim, a busca por tratamentos alternativos ou complementares é de grande valia.

Dentre estes tratamentos, o uso de extratos de plantas vem se destacando por serem uma fonte riquíssima de inibidores naturais e componentes ativos farmacologicamente, ainda não validados cientificamente em sua totalidade.

Duas espécies do gênero da *Casearia* foram estudadas em nosso laboratório quanto ao seu efeito antiofídico: o extrato de *C. sylvestris* inibe a miotoxicidade, a atividade PLA₂ e aumenta o tempo de sobrevivência dos animais inoculados com peçonha de *B. neuwiedi* (BORGES et al., 2000) e, o extrato de *C. mariquitensis* inibe a atividade PLA₂ e a letalidade de animais inoculados (IZIDORO et al., 2003). As diferenças e semelhanças na potencialidade de inibição dos extratos preparados com estas espécies são claramente devido à presença ou ausência de componentes comuns, mesmo sendo pertencentes ao mesmo gênero.

O EA de *C. grandiflora* inibiu a atividade fosfolipásica das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, assim como a atividade miotóxica da PB de *B. moojeni*.

Além disso, o EA preparado com folhas coletadas em dezembro inibiu as atividades farmacológicas multifatoriais observadas na letalidade ocasionada pela peçonha de *B. neuwiedi*, que é uma mistura complexa de toxinas. Os sobreviventes dos grupos tratados até 14º dia ganharam peso, não manifestaram nenhum sintoma

aparente de efeito colateral e foram sacrificados após o término de um período de 14 dias. Cabe ressaltar que o EA preparado com folhas coletadas em junho, não inibiu a letalidade, provavelmente, por não conter o(s) mesmo(s) princípio(s) ativo(s) contidos no EA preparado.

No ensaio de letalidade, observou-se que a peçonha ao ser incubada com o EA criou condições favoráveis (interação entre os possíveis componentes) para a inibição, quando comparado à administração separada dos mesmos. Nesta situação, ao se incubar as 3 DL₅₀ de peçonha com EA antes de inoculá-las no animal, estas perderam o seu alto grau de toxicidade, ao contrário, dos grupos que receberam os mesmos separadamente. Portanto, foi necessário um prévio contato entre peçonha e EA para ocorrer a inativação dos mesmos, pois ambos são altamente tóxicos e letais, quando administrados separadamente.

Além disso, proporções altas de EA por PB foram utilizadas com a finalidade de garantir quantidades necessárias do(s) componente(s) com ação inibitória com baixa representatividade.

Pode-se observar que, na maioria dos trabalhos relacionados a esta área de pesquisa, o extrato vegetal/composto isolado é previamente incubado com peçonha bruta/toxina, além de ser usado em altas proporções (m/m): peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e neurotoxinas isoladas e extrato de *Mandevilla. illustris* (BIONDO et al., 2004); peçonha de *Naja kaouthia* e extratos aquosos de *Pentace burmanica*, *Pithecellobium dulce*, *Areca catechu* and *Quercus infectoria* (PITHAYANUKULA et al., 2005).

A DL₅₀ do EA não foi determinada em seu valor absoluto, mas está compreendida entre as doses de 250 e 500 mg.kg⁻¹, devido a observação de 100% de óbito em

altas doses ($\geq 500 \text{ mg.kg}^{-1}$) e sobrevivência de todos indivíduos em doses menores ($d > 250 \text{ mg.kg}^{-1}$). De modo geral, sugere-se uma possível depressão no sistema nervoso central (SNC) constatado pela mudança no comportamento observado (Tab. 01). Acredita-se que, em doses inferiores a 250 mg.kg^{-1} , o sistema de enzimas metabolizadoras de fármacos foi eficiente para abolir ou diminuir a atividade farmacológica do EA como observado em curvas dose-efeito.

Inúmeros podem ser os mecanismos pelos quais o EA atuou nas atividades enzimáticas e biológicas estudadas. Alguns pesquisadores atribuem a presença de componentes quelantes, como os flavonóides, para haver inibição de enzimas dependentes de íons (CASTRO et al., 1999; RUCAVADO et al., 2000). No entanto, em testes preliminares *in vitro*, o EA não reduziu a quantidade de Ca^{+2} em solução, ao contrário do EDTA dissódico (resultados não apresentados). Sendo assim, acreditamos que a atividade PLA_2 não estaria sendo inibida pelo seqüestro dos íons essenciais à atividade enzimática.

Após manipulação do EA para minimizar ou eliminar os efeitos colaterais, este poderia ser usado associado à anti-soros, objetivando a potencialização destes, como é o caso do componente ácido 2-hidroxi-4-metoxi benzóico isolado do extrato obtido da raiz de *Hemidesmus indicus* R.Br. (salsaparilla) (ALAM; GOMES, 1998).

Assim, investigações adicionais são necessárias para avaliar sua real potencialidade como um antídoto para peçonhas botrópicas.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados, concluímos que o extrato de *C. grandiflora* preparado com folhas coletadas no mês de novembro inibiu a atividade PLA_2 das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*; a atividade de creatina quinase do plasma dos animais que receberam a peçonha de *B. moojeni* e a ação letal da peçonha de *B. neuwiedi*. Ademais, este extrato sozinho induz também toxicidade aguda experimentalmente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem gentilmente ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), como também, a Universidade Federal de Uberlândia e aos assistentes técnicos José Ferreira de Souza e Sandra Andrade Diniz do Hospital de Clínicas desta universidade. Este trabalho foi realizado para a obtenção do grau de MsC de Francislene Glória de Freitas no Curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

ABSTRACT: In Brazil, *Bothrops* snakes are responsible for 90% of the ophidian accidents and administration of serum is not entirely effective. The aim of this work was to inhibit PLA_2 , myotoxic and lethal activities of *B. moojeni* and *B. neuwiedi* venoms (V) by *C. grandiflora* aqueous extract (AE) and to test its acute toxicity. AE when mixed with (1:160; V:AE; w/w) inhibited 74,5% and 57,5% of PLA_2 activity of *B. moojeni* and *B. neuwiedi* venoms, respectively. An decrease of 51% plasmatic CK activity in mice was observed when mixing AE with venoms (1:4; V:AE; w/w). Mice lifetime increasing (83%) was found using AE prepared from the leaves collected in November (1:26; V:AE; w/w) that was not observed with leaves collected on June. These data indicated that AE is a source of compound(s) able to neutralize some toxic effects of *Bothrops* venoms and requires purification to remove its side effects.

UNITERMS: *Casearia grandiflora*, Antiophidian activity, Snake venoms, Phospholipase A_2 inhibitors, Antimyotoxins, Acute toxicity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAN, M. I.; GOMES, A. Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant "sarsaparrilla" (*Hemidesmus indicus* R.Br.). *Toxicon*, England, v. 36, n. 10, p. 1423-1431, Oct. 1998.

BARRAVIEIRA, B. Acidentes ofídicos. In: VERONESSE, R. F. (Ed.). **Tratado de infectologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1561-1577.

BARRAVIEIRA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: BARRAVIEIRA, B. (Ed.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p. 261-280.

BIONDO, R.; SOARES, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Rep.**, Germany, v. 22, n. 8, p. 549-552, Mar. 2004.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, 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. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.**, England, v. 27, n. 1, p. 21-30, Sep. 2000.

BORGES, M. H.; ALVES, D. L.; RASLAN, D. S.; PILO-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; DE LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **J. Ethnopharmacol.**, Ireland, v. 98, n. 8, p. 21-29, Apr. 2005.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J. M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMAÑA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Rev. Biol. Trop.**, Costa Rica, v. 47, n. 3, p. 605-616, Sep. 1999.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, United States, v. 269, n. 18, p. 13.057-13.060, May 1994.

DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. Purification and properties of phospholipases A₂ from porcine pancreas. **Biochim. and Biophys. Acta**, Netherlands, v. 159, p. 103-117, 1968.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, England, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, United States, v. 121, n. 9, p. 401-410, Dec. 1964.

IZIDORO, L. F.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. V.; 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.**, France, v. 85, n. 7, p. 669-675, Jul. 2003.

LENNARTZ, M. R. Phospholipases and phagocytosis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, England, v. 31, n. 3-4, p. 415-430, March-April 1999.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snakes venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol. Ther.**, England, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extract and constituents. **Toxicon**, England, v. 32, n. 5, p. 595-603, May 1994.

MORS, W. B.; 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**, England, v. 27, n. 9, p.1003-1009, Sep. 1989.

NEVES, P. C. A.; MARIA NEVES, 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. **Eur. J. Pharmacol.**, Netherlands, v. 243, n. 3, p.213-219, Oct. 1993.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, M. V.; BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Biochem. and Mol. Biol. Int.**, England, v. 47, n. 6, p.1069-1077, June 1999.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **Eur. J. Biochem.**, England, v. 253, n. 2, p. 452-461, Apr.1998.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. Rev. Ass. Med. Bras., Brasil, v. 47, p. 24–29, 2001.

PITHAYANUKULA, P.; RUENRAROENSAKA, P.; BAVOVADAB, R.; PAKMANEEC, N.; SUTTISRIB, R.; SAEN-OOND, S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. **J. Ethnopharmacol.**, Ireland, v. 97, n. 3, p. 527–533, Mar. 2005.

PRUZANSKI, W.; VADAS, P. Secretory nonpancreatic phospholipase A₂ (sPLA₂) as a mediator of inflammation. **Inflammatory Diseases**, Basel, v. 24, p. 38-42, 1997.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LEON, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinases inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, United States, v. 63, n. 5-6, p. 313-319, Nov.-Dec. 2000.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIEIRA, B. (Ed.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p. 205-223.

VERONESE, E. L.; ESMERALDINO, L. E.; TROMBONE, A. P.; SANTANA, A. E.; BECHARA, G. H.; KETTELHUT, I.; CINTRA, A. C.; 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.D.C. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, Germany, v. 12, n. 1-2, p. 123-130, Jan. 2005.