

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA POMADA À BASE DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville E SUA EFICÁCIA NA NEUTRALIZAÇÃO DOS EFEITOS LOCAIS INDUZIDOS PELA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis*

MALSON NEILSON DE LUCENA⁽¹⁾, MIRIAN MACHADO MENDES⁽¹⁾, MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO⁽¹⁾

RESUMO

Os envenenamentos provocados por acidentes com serpentes são comumente tratados pela administração via parenteral de soro produzido a partir de anticorpos policlonais de cavalos ou carneiros, objetivando-se a neutralização das toxinas. Entretanto, a neutralização dos danos aos tecidos geralmente não ocorre. Atualmente, várias plantas medicinais têm sido usadas no tratamento de acidentes ofídicos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar a estabilidade da formulação à base do extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens*, bem como examinar a capacidade da formulação em neutralizar os efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. O extrato foi preparado por decocção da casca em água e liofilizado. Depois, o extrato foi incorporado em uma formulação. Foram avaliados os parâmetros organolépticos e físico-químicos desta formulação. As inibições das atividades hemorrágica e miotóxica induzidas pela peçonha bruta foram ensaiadas em camundongos *Swiss* machos (n=5). Após receberem peçonha, os grupos testes foram tratados com pomada por aplicação tópica imediatamente ou 15 minutos depois. A pomada mostrou ser estável por pelo menos três meses e também inibiu significativamente as atividades hemorrágica e miotóxica em todos os grupos tratados com a pomada. A inibição foi mais significativa nos grupos que receberam tratamento imediato. Esses estudos demonstram que a formulação à base de *S. adstringens* é estável e apresenta propriedades neutralizantes sobre a peçonha de *B. pauloensis*. Portanto, essa pomada poderá futuramente ser utilizada como um complemento de aplicação tópica à soroterapia, diminuindo ou neutralizando totalmente os efeitos locais provocados nos acidentes com serpentes.

Palavras-chaves: *Stryphnodendron adstringens*, *Bothrops pauloensis*, plantas antiofídicas, inibidores naturais, estabilidade de formulações.

¹ – Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia – Rua Pará , 1720, Uberlândia, CEP 38405-925.
Correspondência: neilson_bio@yahoo.com.br

ABSTRACT

Envenomations due to snake bites are commonly treated by parenteral administration of horse or sheep-derived polyclonal antivenoms aimed at the neutralization of toxins. However, the neutralization of local tissue damage usually does not occur. Actually, many medicinal plants have been recommended for the treatment of snakebites. This study aimed to develop and evaluate the stability of the formulation basic of the extract of the bark of *Stryphnodendron adstringens*, as well as examining the capacity of the formulation to neutralize the local effects induced by the venom of *Bothrops pauloensis*. The extract was prepared by decoction of the bark in water and lyophilized. Then the extract was incorporated into a formulation. Organoleptic and physico-chemical parameters of the formulation were evaluated. The inhibition of hemorrhagic activity and myotoxicity induced by crude venom were tested in male Swiss mice (n = 5). After receiving venom, the test groups were treated with ointment by topical application immediately or 15 minutes later. The ointment was shown to be stable for at least three months and also significantly inhibited the hemorrhagic activity and myotoxicity in all groups treated with the ointment. The inhibition was more significant in the groups receiving immediate treatment. In conclusion, the results show that the formulation based on *S. adstringens* is stable and it possesses neutralizing properties of the venom of *B. pauloensis*. Therefore, that ointment may be used in future as a addition to the topical application of serum, reducing or completely neutralizing the local effects caused in accidents with snakes.

Key-words: *Stryphnodendron adstringens*, *Bothrops pauloensis*, antiophidian plants, natural inhibitors, stability of formulations.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

No mundo, existem aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais de 10 a 14% são consideradas peçonhentas (MISE et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que ocorram no mundo 2,5 milhões de acidentes ofídicos por ano, afetando principalmente as populações rurais e provocando entre 30.000 a 40.000 mortes (CHIPPAUX, 1998).

No Brasil, no ano de 2005, os acidentes com animais peçonhentos são a segunda causa de intoxicação humana, correspondendo a 20% dos casos notificados, só sendo ultrapassado pelas intoxicações por medicamentos com 30,46% (SINITOX, 2008). Em 2005, foram notificados 28.595 casos com serpentes peçonhentas, representando uma incidência de 15 casos/100000 habitantes/ano (ARAÚJO et al., 2008). Apesar disso, as características clínico-epidemiológicas e a real magnitude dos acidentes ofídicos no Brasil ainda são precariamente conhecidas nas regiões Norte e Nordeste, devido à subnotificação ou da informação

colhida com omissões (MISE et al., 2007).

No Brasil, o gênero *Bothrops* é responsável por 87,5 % de todos os acidentes ofídicos registrados anualmente, seguido por *Crotalus* com 9,2%, *Lachesis* 2,7% e *Micrurus* 0,6% (BRASIL, 2001). A letalidade anual registrada para os acidentes ofídicos é 0,45%, correspondendo a 359 mortes para pacientes tratados com o soro antiofídico, sendo que 60% dos óbitos acontecem depois de seis horas da ocorrência do acidente e o maior índice é registrado no Nordeste (BRASIL, 2001).

Os acidentes ofídicos na região do Triângulo Mineiro, Uberlândia, são causados principalmente por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, onde se destacam *B. moojeni*, *B. pauloensis* e *Crotalus durissus collilineatus* (SILVA et al., 2003). As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, *Crotalus durissus*, dividida em seis subespécies (SBH, 2008). Cada subespécie ocupa uma região característica ao longo do território brasileiro, são popularmente conhecidas como cascáveis e

apresentam um guizo ou chocalho na cauda (BORGES, 2001).

1.2 Composição das peçonhas de serpentes

As peçonhas na sua composição variam de indivíduo para indivíduo, dependendo também da idade, hábitos alimentares, temperatura, clima e outras condições (ASSAKURA et al., 1992). No caso das serpentes botrópicas, há uma diferença entre a composição da peçonha dos filhotes, que é predominantemente coagulante, e do adulto, com maior ação proteolítica (PINHO, PEREIRA, 2001).

Peçonhas ofídicas são uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídios, íons metálicos e outros compostos orgânicos, sendo que as proteínas e os peptídeos correspondem a aproximadamente 90% do peso seco da peçonha (SOUZA et al., 2001; AIRD et al., 2002). Dentre os íons pode-se destacar o cálcio, o magnésio e o zinco (AIRD et al., 2002). O cálcio é um importante cofator da ação de algumas enzimas proteolíticas e das fosfolipases (BRAUD et al., 2000). O magnésio e o zinco são importantes para ação das principais metaloproteases da peçonha (AIRD et al., 2002).

Peçonhas de serpentes também são ricas fontes de enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂) que freqüentemente apresentam um grande número de isoformas (KINI, 2005; NEVALAINEN et al., 2008). As PLA₂s de peçonha de serpentes são enzimas de baixo peso molecular (13 kDa-15kDa) que hidrolisam glicerofosfolípidios na posição sn-2 do glicerol liberando lisofosfolípidios e ácidos graxos (JAN et al., 2007). Algumas PLA₂s de peçonhas ofídicas induzem miotoxicidade local enquanto outras provocam destruição muscular sistêmica (GUTIÉRREZ, OWNBY, 2003). Além disso, as PLA₂s podem provocar edema e apresentam atividades antimicrobiana e antitumoral (STÁBELI et al., 2006).

Nas peçonhas de serpentes Viperidae destaca-se a ação de enzimas que afetam o sistema hemostático: as metaloproteases e as serinoproteases (MARKLAND, 1998). As enzimas responsáveis pelo rápido aparecimento de hemorragia local são denominadas metaloproteases e são dependentes de íons metálicos divalentes, por exemplo, Zn²⁺, como cofator para exibirem atividade enzimática (FOX, SERRANO, 2005). Elas atuam degradando proteínas de matriz

extracelular, principalmente colágeno do tipo IV, sendo capazes de provocar o rompimento da membrana basal do endotélio (KAMIGUTI, 2005). Existem dois processos que podem explicar a hemorragia: a hemorragia “*per rhexis*” e hemorragia por “*diapedesis*”. O mecanismo de hemorragia “*per rhexis*” resulta da digestão da membrana das células do endotélio da membrana basal, enquanto a hemorragia por “*diapedesis*” ocorre devido ao rompimento das junções entre as células vizinhas (HATI et al., 1999).

As serinoproteases geralmente afetam a cascata de coagulação por ativação de componentes sanguíneos envolvidos na hemostasia, fibrinogênólise, agregação plaquetária e degradação proteolítica (SERRANO, MAROUN, 2005; PEREZ et al., 2007). Entre as serinoproteases, destacam-se as enzimas “*thrombin-like*” que possuem a habilidade de clivar as cadeias A α e B β do fibrinogênio de forma semelhante à trombina, exaurindo o estoque de fibrinogênio no sangue (MAGALHÃES, 2003). Essa ação das “*thrombin-like*” ocasiona a incoagulabilidade do sangue das vítimas de acidentes botrópicos (SILVA-JÚNIOR et al., 2007).

1.3 Características do envenenamento botrópico

As peçonhas das serpentes botrópicas apresentam ação proteolítica, coagulante e hemorrágica, podendo levar a manifestações clínicas locais e/ou sistêmicas (BORJA-OLIVEIRA et al., 2003).

As manifestações no local da picada caracterizam-se por: dor e edema de intensidade variável, equinoses e sangramentos no local da picada. Além disso, enfartamento ganglionar, bolhas e abscessos podem aparecer na evolução do quadro clínico, acompanhada ou não de necrose (BORJA-OLIVEIRA, 2007). As complicações locais também podem evoluir para complicações como a síndrome compartimental (BRASIL, 2001).

As manifestações sistêmica caracterizam-se por: sangramento em ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância como gengivorragias, epistaxes, hematênese, hematúria e alterações na coagulação sanguínea. Podem também ocorrer náuseas, vômitos, sudorese e hipotensão arterial. Nos casos mais graves há choque e insuficiência renal aguda (DURIGON et al., 2005).

Algumas peçonhas botrópicas como de *Bothrops pauloensis* possuem ação miotóxica (RODRIGUES et al.,

2007). Esta ação produz lesão da fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) com liberação de enzimas e mioglobina para o soro e que são posteriormente excretadas pela urina (BRASIL, 2001).

1.4 Processo de regeneração após o acidente ofídico

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local (ARAUJO et al., 1998). É uma resposta complexa e organizada do organismo à lesão dos tecidos com perda de sua integridade (ROCHA JUNIOR, et al., 2006).

O processo de reparação tecidual é dividido em fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: hemostasia; fase inflamatória; formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular (como colágeno, elastina e fibras reticulares); e remodelação (MENDONÇA et al., 2006; ROCHA JUNIOR et al., 2006).

Logo após o tecido ser lesionado, uma cobertura primária composta por fibrina restabelece a hemostase e fornece um ambiente para que as plaquetas secretem fatores de crescimento (FCs), citocinas e elementos da matriz extracelular (MEC). Estes mediadores do processo inflamatório recrutam macrófagos e neutrófilos, os quais secretam diversos fatores específicos que orquestram as

fases seguintes do processo de reparação tecidual (IRION, 2005).

1.5 Soroterapia

O soro antiofídico constitui-se na sua parte ativa de várias imunoglobulinas e é purificado principalmente do soro de cavalos previamente imunizados com a peçonha de determinado gênero de serpente e representa a principal terapia utilizada em todo o mundo para o acidente ofídico (CASTRO, 2006). A ação do soro antiofídico baseia-se na formação de um complexo entre antígeno com anticorpos específicos (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998). No Brasil, os laboratórios que produzem esses imunoderivados para a rede pública são: Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brasil (BRASIL, 2001).

O soro antiofídico deve ser sempre utilizado por via intravenosa, garantindo maior rapidez e eficiência na neutralização das peçonhas circulantes (PINHO, PEREIRA, 2001). A dose de soro baseia-se na identificação da serpente, no tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico, na evolução do quadro clínico e na concentração do soro (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998).

As reações à soroterapia podem ser classificadas em precoces (choque

anafilático) ou tardias (doença de soro) (BRASIL, 2001). Tais reações de hipersensibilidade atingem de 30 a 40% das pessoas submetidas a soroterapia (FRY et al., 2003). O choque anafilático ocorre imediatamente após a administração do soro no paciente ou nas duas horas subseqüentes e tem os mesmo sintomas de uma alergia, que pode afetar pele, sistema digestivo ou respiratório em função da predisposição do paciente (FRY et al., 2003). Os sinais e sintomas mais freqüentemente observados são: urticárias, tremores, tosse, náuseas, dor abdominal e rubor facial (BRASIL, 2001). O processo pode evoluir rapidamente para uma insuficiência respiratória (LÉON et al., 2008), podendo ainda os pacientes apresentarem arritmias cardíacas, hipotensão arterial e choque (BRASIL, 2001).

A doença do soro é uma reação tardia que ocorre de cinco a 24 dias após o tratamento (LÉON et al., 2008). Os pacientes podem apresentar febre, artralgia, linfadermomegalia, urticária e proteinúria (BRASIL, 2001). Os mecanismos mais prováveis incluem a formação de um complexo imune entre o soro e a peçonha, com ativação e consumo do complemento (FRY et al., 2003).

Além disso, a eficiência do soro antiofídico não é considerável quanto aos efeitos locais das peçonhas de serpentes que ocorrem muito rapidamente e geralmente não são revertidos pela soroterapia permitindo que a difusão da peçonha aconteça, o que ocasiona o quadro de intensa lesão tecidual ao redor do local da picada (FRY et al., 2003; CARDOSO et al., 2003). Alguns estudos recentes demonstraram uma inibição somente parcial da neurotoxicidade, miotoxicidade e atividade hemorrágica de peçonhas botrópicas pelo soro antibotrópico (ZAMUER et al., 2004; SILVA et al., 2007).

1.6 Extratos vegetais

Desde os primórdios da humanidade as plantas são utilizadas pelo homem como alimento e no tratamento de várias doenças (BENDAZZOLI, 2000). Neste sentido, a origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com sua própria história (NOVAIS et al., 2003; CALIXTO, 2000).

Atualmente, nota-se um crescente interesse pelas plantas medicinais, devido à grande procura por terapias alternativas (TOLEDO, 2002). Isto se deve principalmente à

ineficiência de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos medicamentos alopáticos e à busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo humano, principalmente no atendimento primário à saúde (RIBEIRO et al., 2005).

Plantas medicinais representam importante fonte de compostos capazes de auxiliar diretamente no tratamento de envenenamentos ofídicos, ou indiretamente, como complemento para a soroterapia convencional (SOARES et al., 2004). O uso de extratos vegetais de plantas como antídotos contra peçonhas animais é um hábito antigo para muitas comunidades sem acesso rápido a soroterapia (VERONESE et al., 2005; ESMERALDINO, 2005).

Estudos etnobotânicos, etnofarmacológicos e ensaios biológicos afirmam que aproximadamente 850 espécies de plantas apresentam ou podem apresentar atividade antiofídica (SOARES et al., 2005). Destas plantas, vários extratos já foram preparados e mostraram possuir atividade anti-peçonha, tais como: *Pluchea indica* (GOMES et al., 2007); *Pentaclethra macroloba* (SILVA et al., 2005); *Mikania glomerata* (MAIORANO et al., 2005); *Musa paradisiaca* (BORGES et al., 2005); *Eclipta prostrata*

(PITHAYANUKUL et al., 2004); *Baccharis trimera* (JANUÁRIO et al., 2004); *Mandevilla velutina* (BIONDO et al., 2003); *Casearia mariquitensis* (IZIDORO et al., 2003); *Casearia sylvestris* (CAVALCANTE et al., 2007; BORGES et al., 2001); *Schizolobium parahyba* (VALE et al., 2008; MENDES et al., 2008).

1.7 *Stryphnodendron adstringens*

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Conville é uma planta classificada na família Fabacea, subfamília Mimosoidae e é popularmente conhecida como barbatimão (CUNHA, 2003). O gênero *Stryphnodendron* distribui-se pelos cerrados brasileiros, possuindo cerca de 29 espécies, sendo comumente encontrado em Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Maranhão e Piauí (VASCONCELOS et al., 2004).



Figura 1. *Stryphnodendron adstringens*

Fonte: Malson Neilson de Lucena

O barbatimão tem um uso popular terapêutico amplamente diversificado, sendo empregado como cicatrizante, adstringente, antidiabético, antiinflamatório, hemostático, anti-séptico, antidiarréico, anti-úlceras, anti-hipertensivo, combate hemorragias vaginais, gonorréia. É também utilizado no tratamento da malária, febre e afecções hepáticas (LOPES et al., 2003; MACEDO, FERREIRA, 2004; OLIVEIRA, FIGUEIREDO, 2007; SOUZA et al., 2007).

Vários trabalhos têm confirmado algumas das propriedades do barbatimão: neutralizador dos efeitos de herpesvírus bovino (FELIPE et al., 2006); inibição no crescimento de *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006); inibição no crescimento de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* (LUIZE et al., 2005; HERZOG-SOARES et al., 2006; HERZOG-SOARES et al., 2002); atividade antimicrobiana (GONÇALVES et al., 2005; ORLANDO, 2005); atividade antibacteriana (SOARES et al., 2008); inibição do crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai* (HOLETZ et al., 2005); cicatrização de feridas cutâneas (LOPES et al., 2005); efeitos antiulcerogênicos (AUDI et al.,

1999) e atividade antiinflamatória (LIMA et al., 1998).

S. adstringens já teve vários compostos químicos isolados: taninos, alcalóides, flavonóides, terpenos, estilbenos, esteróides, inibidores de tripsina e de outras proteínas (VASCONCELOS et al., 2004). A casca é rica em taninos, com percentual variando de 10-37% (HOLTEZ et al., 2005; SANTOS et al., 2004). Da casca já foram isolados nove prodelphinidinas e seis flavanóis-3, todos taninos condensados, responsáveis pelo sabor adstringente e pela capacidade de precipitar proteínas solúveis (MELLO et al., 1996a, 1996b, 1999).

1.8 Estabilidade de formulações cosméticas

A estabilidade de uma formulação cosmética é definida como o intervalo de tempo que a formulação é capaz de manter sua integridade em termos de quantidade e identidade química (BILIA et al., 2001).

Os testes de estabilidade representam uma etapa crucial na produção de produtos farmacêuticos, uma vez que a instabilidade de uma formulação modifica seus três requisitos essenciais, que são segurança, qualidade

e eficácia (KOMMANABOYINA, RHODES, 1999).

Os testes de estabilidade compreendem o conjunto de testes projetados para obter informações sobre estabilidade de produtos farmacêuticos, nas variadas condições a que possa estar sujeito, desde sua fabricação até o término de sua validade, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagens e condições de armazenamento especificadas (BARBOSA, 2006; SANTOS JUNIOR; MORETTO, 2005). Para isso, amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. Isso permite que mais dados sejam coletados em um tempo curto, permitindo, por exemplo, que formulações não satisfatórias sejam eliminadas nas etapas iniciais de um estudo, reduzindo gastos (AULTON, 2005).

A avaliação da estabilidade das formas farmacêuticas pode ser realizada através do teste de estabilidade preliminar, ciclos de temperaturas, teste de estabilidade acelerada e teste de estabilidade de longa duração (BABY et al., 2006).

2 OBJETIVOS

- Desenvolver uma formulação que incorporasse o extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens*.
- Avaliar a estabilidade da formulação.
- Testar a capacidade da formulação em neutralizar os efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*.

3 MATERIAL

3.1 Obtenção da peçonha de *Bothrops pauloensis*

A peçonha de *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidas no serpentário da Pentapharm, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Obtenção da planta *Stryphnodendron adstringens*

A casca do caule da planta *Stryphnodendron adstringens* foi coletada na zona rural de Araguari (lat. - 18° 38' 50" e lon. 48° 11' 14"), Minas Gerais, Brasil.

3.3 Reagentes

Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, SDS, EDTA, azul de bromofenol, fucsina básica, Coomassie Brilliant Blue R-250, glicina, Tiopental®, soroalbumina bovina, trombina, fibrinogênio, persulfato de amônio, TAME, fibrinogênio bovino, e

padrão de peso molecular (Amersham Biosciences do Brasil Ltda) foram obtidos pelos fornecedores e os demais eram reagentes de grau analítico.

3.4 Animais

Camundongos da raça Swiss machos, (18-22g) foram fornecidos pelo Instituto Valle, Minas Gerais, Brasil e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia sob condições padrões de temperatura 25^oC, umidade relativa do ar de 60-65%, ciclo de 12h de luz/noite, dieta e água “*ad libitum*”. Todos os procedimentos foram aprovados de acordo com as regras do Comitê de Ética na Utilização de Animais, sob o número 027/08.

3.5 Equipamentos

Paquímetro digital (Digimess), espectrofotômetro PharmaBiotech, pHmetro Marte MB-10 e centrífuga Eppendorf 5402.

4 MÉTODOS

4.1 Preparação da peçonha bruta (PB)

Foram pesados 10mg de peçonhas brutas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops pauloensis* utilizando uma balança analítica. Cada peçonha foi diluída em 5mL de água deionizada e

dosada seguindo a técnica de Bradford, 1976. Depois de dosadas, as peçonhas foram alíquotadas em 500µg, 200µg e 100µg, liofilizadas por 24 horas e estocadas a -20°C. Para a realização dos experimentos, as peçonhas foram dissolvidas em solução salina (NaCl, 0,9%) para o uso.

4.2 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) e foi usada como padrão a soroalbumina bovina. Uma alíquota de cada amostra foi dissolvida para 100µL com água deionizada e adicionada a 3mL do Reagente de Bradford (100mg de Coomassie Blue G, 50mL de etanol 95%, 100mL de ácido fosfórico 85% e água suficiente para completar 1 litro de solução). As determinações foram feitas em triplicatas e a absorbância medida em 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina. A concentração de proteínas em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

4.3 Preparação do extrato vegetal (EV)

A casca de *Stryphnodendron adstringens* foi lavada, dilacerada, pesada (120g) e misturada com um

volume de água deionizada quatro vezes maior que a massa (480mL). A seguir foi feita a decocção. Após 24 horas, a mistura foi filtrada em papel e funil e centrifugada a 5000xg por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20°C.

4.4 Preparação da formulação

As matérias-primas utilizadas na formulação foram: lauriletersulfato de sódio, cocoanfocarboxiglicanato, laurilipoglicosídeo, ácido cítrico (solução aquosa 10%), extrato seco de *S. adstringens* e água destilada. A pomada foi manipulada pela dispersão dos tensoativos, do conservante e água. Em seguida, foi acrescentado a solução aquosa de ácido cítrico para correção até pH 6, valor compatível com a pele.



Figura 2. Pomada de *Stryphnodendron adstringens*

4.5 Testes de estabilidade

Para avaliar a estabilidade da formulação foram analisados parâmetros organolépticos e físico-químicos da pomada através de metodologia de avaliação da

estabilidade preliminar apresentada pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004; ANVISA, 2007). Desta forma, os parâmetros avaliados foram aspecto, cor e odor (observações feitas uma vez por semana durante três meses), bem como teste de medidas do pH realizado em pHmetro. As características organolépticas foram classificadas segundo os critérios Anvisa, 2004. A formulação foi mantida a temperatura ambiente (37° C). Para determinação da cor os produtos foram avaliados por identificação visual; e para o odor, foi utilizado o olfato como sentido.

4.6 Atividades biológicas

O efeito biológico da formulação foi avaliado no tratamento dos efeitos induzidos pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*. Em todos os ensaios foram utilizados camundongos Swiss machos (20-25g). Os camundongos foram previamente anestesiados com Tiopental que é um anestésico do tipo barbitúrico que produz anestesia geral de duração rápida. Foram aplicados 10µL de anestésico (0,02mg/mL) via intramuscular no músculo gastrocnêmico esquerdo. Depois de anestesiados os animais foram depilados no dorso ou na pata direita para melhor

absorção da pomada. Uma hora depois, a PB foi injetada nos animais e dois grupos testes foram montados. Um grupo recebeu tratamento com a pomada imediatamente após a inoculação da PB. Já o outro grupo teste foi tratado com a pomada 15 minutos depois de inoculado com a PB. A pomada foi aplicada no mesmo local de inoculação da peçonha bruta. Os grupos controles receberam apenas PB, salina ou pomada. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.6.1 Atividade hemorrágica

Essa técnica foi realizada segundo método descrito por NIKAI et al. (1984). Nos ensaios foram utilizadas 2DMH que foram injetadas por via intradérmica no dorso de camundongos de 18-22g. Após três horas, os animais foram anestesiados e sacrificados. A pele do dorso foi retirada para medida do halo hemorrágico formado. As medidas foram feitas com um paquímetro digital Digimess.

4.6.1.1 Determinação da dose mínima hemorrágica (DMH)

Uma DMH corresponde a quantidade em μg de peçonha bruta necessária para induzir a formação de um halo hemorrágico de 10mm. Para determinar o valor de uma DMH, foram injetadas via intradérmica quantidades diferentes de PB ($2\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$ e $10\mu\text{g}$). A

partir da medida de cada halo foi plotado um gráfico e o valor de uma DMH foi determinado por regressão linear.

4.6.2 Atividade miotóxica

Camundongos Swiss machos receberam injeções no músculo gastrocnêmico direito de doses de $25\mu\text{g}$ de peçonha bruta combinada ou não com o extrato vegetal. Três horas após os camundongos foram sacrificados e o sangue foi coletado na presença heparina por punção cardíaca, e posteriormente centrifugado em três ciclos de $2500\times g$ a 4°C por 10 minutos cada. A atividade da enzima creatina quinase do plasma foi determinada usando-se um kit (LaborLab). A atividade foi expressa em unidades por litro, cada unidade corresponde à produção de $1\mu\text{mol}$ de NADH por minuto a 37°C .

4.7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi determinada segundo o Teste de Lilliefors e a significância estatística ($p < 0,05$) dos resultados foi avaliada utilizando o Teste ANOVA calculado com o programa R Language (R DEVELOPMENT CORETEAM, 2006).

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio de estabilidade

Pela avaliação da estabilidade, observou-se que a incorporação do extrato seco alterou alguns dos parâmetros avaliados, aumentando o pH da formulação de 6 para 7 em um mês, após o segundo mês nenhuma alteração no pH foi detectada. No entanto, estas alterações não

prejudicaram a estabilidade da pomada e adequabilidade desta formulação para seu uso após três meses. Os parâmetros organolépticos não sofreram alterações durante o mesmo período de tempo observado, conforme pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação dos principais parâmetros organolépticos e físico-químico da pomada contendo o extrato seco de *Stryphnodendron adstringens*.

Característica	Tempo		
	1 mês	2 meses	3 meses
Cor	Normal s/ alteração	Normal s/ alteração	Modificada
Odor	Levemente alterado	Levemente alterado	Levemente alterado
Aspecto	Normal s/ alteração	Normal s/ alteração	Normal s/ alteração
pH	6-7	7	7

5.2 Atividade hemorrágica

A figura 2 mostra que 10 μ g de peçonha bruta de *B. pauloensis* induz a formação de um halo hemorrágico de 21mm, logo 10 μ g de PB correspondem a 2DMH. A atividade hemorrágica induzida pelo PB foi significativamente inibida quando os animais foram tratados imediatamente com a pomada (inibição de 70%). Os camundongos que receberam a pomada após 15 minutos também apresentaram uma

inibição significativa da atividade hemorrágica (inibição de 35%). A figura 2 também mostra que pomada não induz a formação de halo hemorrágico.

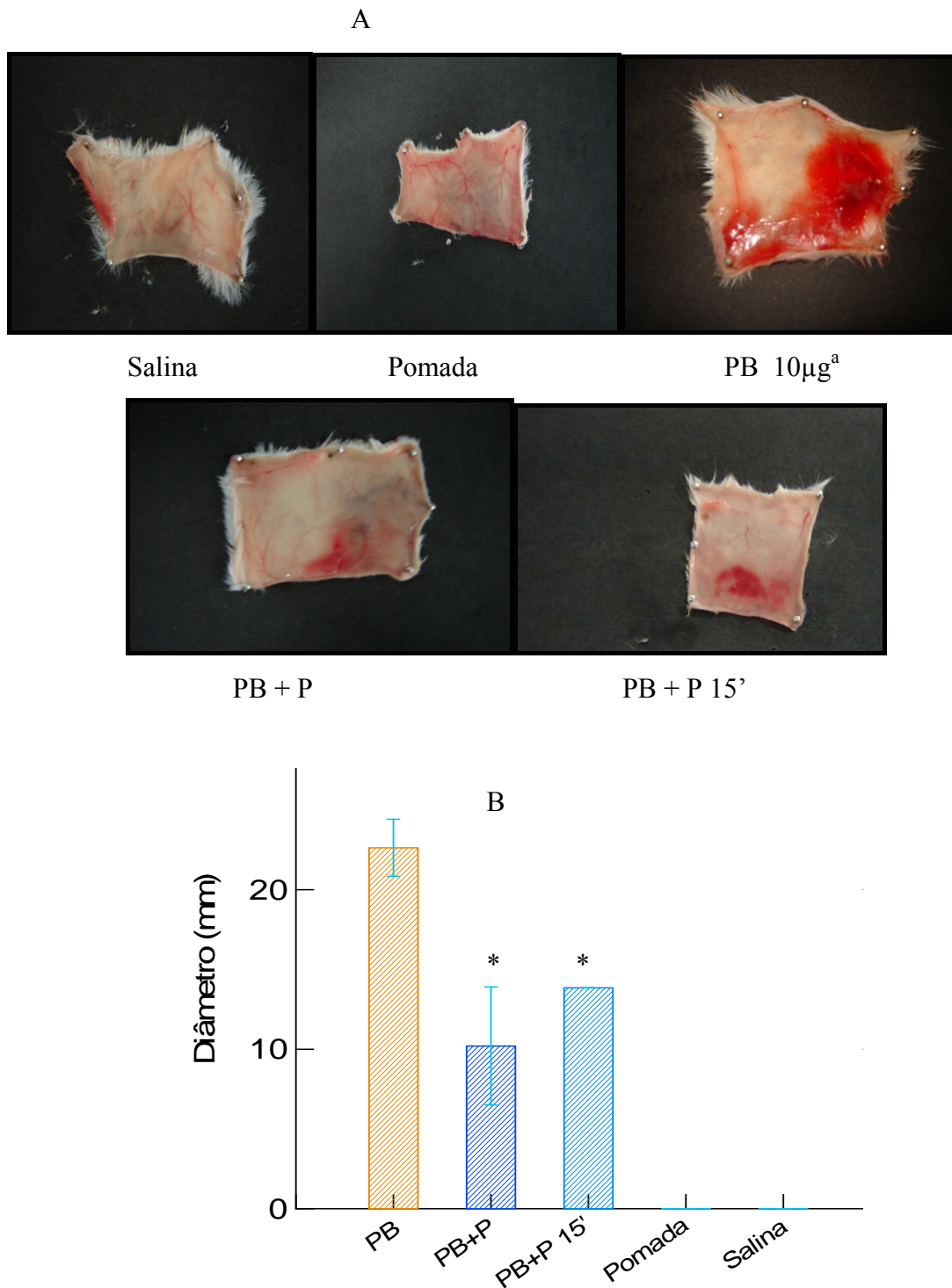


Figura 3. Efeitos da pomada de *Stryphnodendron adstringens* sobre a atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops pauloensis*. 50µL de peçonha bruta foram injetados via intradérmica em camundongos que foram tratados com a pomada de *Stryphnodendron adstringens*. (A) Superfície interna mostrando o halo hemorrágico. PB= peçonha bruta; PB+P= peçonha bruta e tratamento imediato; PB+P= peçonha bruta e tratamento após 15 minutos. ^a Massa correspondente a 2DMH. (B) Diâmetro do halo hemorrágico na derme. Cada barra representa a média e desvio padrão (n = 5). (*) diferença estatisticamente significativa (p<0.05) das inibições em relação ao controle com peçonha.

5.3 Atividade miotóxica

A figura 3 mostra que 25µg de PB aumentam os níveis plasmáticos de creatina quinase (CK). Quando os camundongos foram imediatamente tratados com a pomada, ocorreu diminuição significativa dos níveis de

creatina quinase. A atividade miotóxica induzida por PB também foi significativamente inibida nos camundongos que foram tratados com pomada 15 minutos após a injeção de PB.

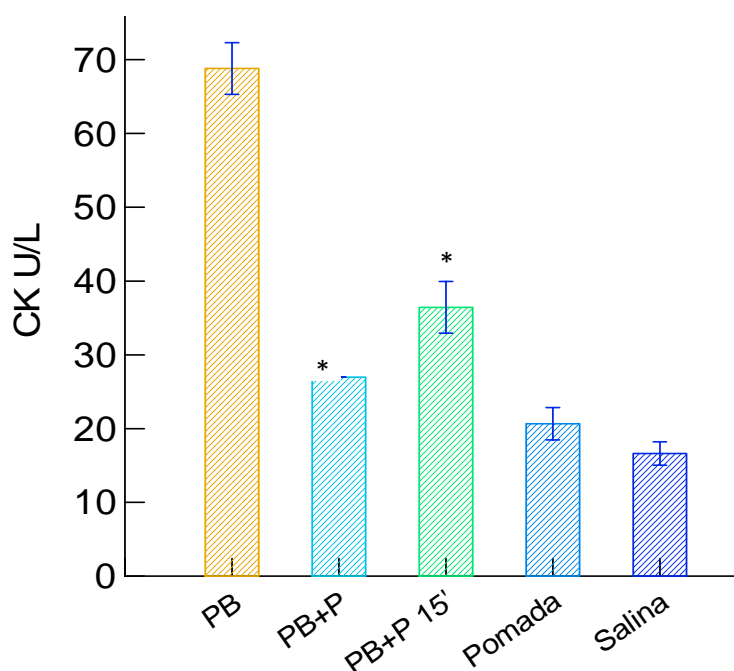


Figura 4. Inibição da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Bothrops pauloensis* pela pomada de *Stryphnodendron adstringens*. 25 µg de peçonha foram injetadas nos camundongos que posteriormente foram tratados com a pomada. PB= peçonha bruta; PB+P=peçonha bruta e tratamento imediato com a pomada; PB+P 15'= peçonha bruta e tratamento após 15 minutos. Cada barra representa a média e o desvio padrão (n = 5). (*) diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) das inibições em relação ao controle com peçonha.

6 DISCUSSÃO

6.1 Estabilidade da formulação

A estabilidade é a capacidade de uma formulação manter-se dentro das especificações físico-químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas ao longo do tempo

(BRASIL, 2001). Vários fatores, como temperatura, umidade, radiação, luz, ar (especificamente oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água), pH, propriedades dos solventes, recipientes (frascos de acondicionamento) e a presença de outras substâncias químicas

contaminantes podem afetar os componentes de uma fórmula farmacêutica, influenciando assim na sua estabilidade (MACIEL et al.,2006). Dentre esses, temperatura e umidade são os principais fatores de instabilidade das formulações, pois podem facilmente induzir a degradação das substâncias, mesmo em curto prazo (BRASIL, 2001).

Os testes de estabilidade realizados neste trabalho demonstraram que a formulação contendo *Stryphnodendron adstringens* é estável por pelo menos três meses, preservando as características iniciais. Entretanto, é necessário que o prazo de validade e outros testes de estabilidade como análise da densidade ao longo do tempo sejam determinados, a fim de se alcançar uma melhor qualidade e segurança no uso desta formulação.

6.2 Propriedades antiofídicas da pomada

O Brasil apresenta uma ampla diversidade de plantas medicinais que são freqüentemente utilizadas na medicina popular para o tratamento de alguns dos efeitos provocados por acidentes com serpentes (CALIXTO, 2000). Sendo assim, um passo importante é investigar e comprovar a

validade da utilização dessas plantas medicinais, bem como a forma que promovem a neutralização mais eficaz.

Neste trabalho foi desenvolvida uma formulação que incorporou o extrato de *Stryphnodendron adstringens*. A pomada mostrou ser capaz de neutralizar as atividades hemorrágica e miotóxica tanto quando aplicada imediatamente quanto após 15 minutos. Entretanto, a inibição foi maior quando os animais foram tratados imediatamente com a pomada do que quando foram tratados após 15 minutos.

As peçonhas de serpente contêm muitas enzimas proteolíticas que atuam degradando uma variedade de substratos naturais, tais como caseína, fibrinogênio, colágeno e outros (GUTIÉRREZ, 2002). Dentre estas enzimas pode-se destacar as toxinas hemorrágicas que são responsáveis pela degradação das proteínas da matriz extracelular e necessitam de um íon metal divalente como o Zn^{2+} para sua atividade (GUTIÉRREZ, RUCAVADO, 2000). Tais toxinas são as principais responsáveis pelo quadro hemorrágico que caracteriza o envenenamento ofídico (BORGES, 2001).

A mionecrose que ocorre no acidente com serpentes deve-se a presença de miotoxinas do tipo fosfolipase dependentes de íons Ca^{2+}

e/ou hemorraginas presentes na peçonha de serpentes (GUTIÉRREZ, 2002). Muitos soros antiofídicos são ineficientes na neutralização dos efeitos miotóxicos destas toxinas (SOARES et al., 2004).

Alguns extratos vegetais apresentam a propriedade de neutralizar as enzimas PLA₂ e toxinas hemorrágicas por inibição da ligação a cátions bivalentes (Zn²⁺ e Ca²⁺). Exercem, portanto, um efeito quelante e são responsáveis pela inibição das atividades hemorrágica e miotoxidade (USHANANDI et al., 2006; MAIORANO et al., 2005). Dessa forma, para estes autores a propriedade antiofídica dos extratos resulta de um mecanismo de ação específica, no qual ocorre degradação proteolítica das toxinas da peçonha ou quelação de íons metálicos essenciais para atividade catalítica de tais toxinas.

Por outro lado, outros estudos demonstraram alterações no perfil eletroforético das proteínas da peçonha após o tratamento com o extrato, descartando o efeito quelante induzido pelos componentes do extrato vegetal sobre as enzimas dependentes de íons metálicos divalentes e sugerindo que ocorre a formação de complexos inespecíficos entre as enzimas da peçonha e os componentes do extrato

(BORGES et al., 2005; MENDES et al., 2008).

Os taninos são polifenóis abundantes na casca de *S. adstringens* (SANTOS et al., 2002). Ardisson et al. (2002) demonstram que no processo de cicatrização, os taninos precipitam as proteínas dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor que favorece a sua regeneração (VASCONCELOS et al., 2008). Como as peçonhas ofídicas são ricas em proteínas (90-95%) de diferentes classes, as quais apresentam uma grande variedade de atividade, um possível mecanismo de inibição das toxinas presentes nas peçonhas testadas com a nossa pomada seria a ligação de tais toxinas aos polifenóis encontrados na casca de *S. adstringens* (PITHAYANUKUL et al., 2005). Conseqüentemente, como resultado desta interação as proteínas das peçonhas precipitam perdendo sua atividade.

7 CONCLUSÕES

O uso de produtos naturais de origem vegetal, como uma alternativa terapêutica para os acidentes com serpentes é uma etapa importante na caracterização de suas propriedades farmacológicas. Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que é possível desenvolver

uma formulação que incorpore o extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens* e que esta formulação é capaz de se manter estável ao longo de pelo menos três meses. Além disso, a pomada foi capaz de neutralizar os efeitos hemorrágicos e a miotoxicidade induzida pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. Estas propriedades neutralizantes provavelmente se devem a precipitação das proteínas da peçonha por componentes do extrato vegetal de

Stryphnodendron adstringens. Assim, seria interessante que mais testes de estabilidade sejam desenvolvidos para garantir uma melhor qualidade, segurança e eficácia da pomada. Portanto, essa pomada poderá futuramente ser utilizada como um complemento a soroterapia, diminuindo ou neutralizando totalmente os efeitos locais provocados nos acidentes com serpentes.

8 REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, p. 335-393, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries Temáticas: **Cosméticos-Guia de estabilidade de Produtos Cosméticos**, v. 1, 2004, 47p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**, 2007, 130p.

ARAÚJO, C. F. R.; SOUZA, F. Z. A.; GRECA, F. H.; GUERREIRO, M. H. C. P. M.; LEITE, A. L.; MANSUR, A. E. C.; KANTOR, D. C.; NASSIF, A. E. Efeitos do Agarol® e do Trigliceril® sobre a cicatrização de pele: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 232-237, 1998.

ARAÚJO, H. P.; BOURGUIGNON, S. C.; BOLLER, M. A. A.; DIAS, A. A. S. O.; LUCAS, E. P. R.; SANTOS, I. C.; DELGADO, I. F. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, p. 502-514, 2008.

ARDISSO, L.; GODOY, J. S.; FERREIRA, L. A. M.; STEHMANN, J. R.; BRADÃO, M. G. L. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville (Barbatimão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 27-34, 2002.

ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDEBAUM, F. R. Biochemical and Biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 102B, p. 727-732, 1992.

AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P.; PERES, P.G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W.K.V.; DE MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R.M.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphodendron adstringens* in rats. **Phytoterapy Research**, v.13, p.264-266, 1999.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2005. 677 p.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN FILHO, C. A.; VELASCO, M. V. R. Formas farmacêuticas emulsionadas: sinais de instabilidade e ensaios de estabilidade acelerada. **Anfarmag**, v. 12, n. 61, p. 6-10, 2006.

BARBOSA, C. M. B. **Fabricação de cosméticos e a legislação sanitária**. CETEC. Dossiê técnico, p. 1-31, nov. 2006. Disponível em: < www.sbrt.ibict.br/upload/dossies/sbrt-dossie32.pdf >. Acesso em: 15 dez. 2008.

BENDAZOLLI, W. S. **Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica**. Mundo da Saúde, v. 24, p. 123-126, 2000.

BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, p. 199-208, 2001.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M.; 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* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, p. 1017 - 1025, 2003.

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

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

BORGES, R. C. **Serpentes peçonhentas brasileiras**. Belo Horizonte: Atheneu, 2001. 164p.

BORJA-OLIVEIRA, C.R.; DURIGON, A.M.; VALLIN, A.C.C.; TOYAMA, M.H.; SOUCCAR, C.; MARANGONI, S. RODRIGUES-SIMIONI, L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 617-624, 2003.

- BORJA-OLIVEIRA, C. R.; KASSAB, B. H.; SOARES, A. M.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; RE L.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Purification and n-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂, newwieditoxin-I and newwieditoxin-II, from *Bothrops newwiedi pauloensis* (jararaca pintada) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 103-121, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001, 120p.
- BRAUD, S.; BON, C.; EISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, S. A.; HADDAD, V. J. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier, 2003, 468p.
- CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O Mundo da Saúde**, v. 30, n. 4, p. 644-653, 2006.
- CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. O.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490 - 497, 2007.
- CHIPPAUX, J. P. Snake-bite: appraisal of the global situation, Bull. **World Health Organization**, v. 76, p. 515 - 524, 1998.
- CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.
- CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, 702 p.
- DURIGON, A. M.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; DAL BELO, C. A.;

OSHIMA-FRANCO, Y.; COGO, J. C.;
LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.;
RODRIGUES-SIMIONI, L.
Neuromuscular activity of *Bothrops
neuwiedi pauloensis* snake venom in
mouse nerve-muscle preparations.
**Journal of Venomous Animals and
Toxins including Tropical Diseases**, v.
11, p. 22-33, 2005.

ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A.
M.; SAMPAIO, S. V. Evaluation of the
effect of aqueous extract of *Croton
urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on
the hemorrhagic activity induced by the
venom of *Bothrops jararaca*, using new
techniques to quantify hemorrhagic
activity in rat skin. **Phytomedicine**, v.
12, p.570-576, 2005.

FELIPE, A. M.; RINCÃO, V. P.;
BENATI, F. J.; LINHARES, R. E. C.;
GALINA, K. J.; TOLEDO, C. E. M.;
LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.;
NOZAWA, C. Antiviral effect of
Guazuma ulmifolia and
Stryphnodendron adstringens on
Boliavirus and bovine herpesvirus.
Biological & Pharmaceutical Bulletin,
v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T.
Insights into and speculations about
snake venom metalloproteinase
(SVMP) synthesis, folding and disulfide
bond formation and their contribution to
venom complexity. **The FEBS Journal**
, v.275, p. 3016-3030, 2008.

FRY, B. G.; WINKEL, K. D.;
WICKRAMARATNA, J. C.;
HODGSON, W. C.; WÜSTER, W.
Effectiveness snake antivenom: species
and regional venom variation and its
clinical impact. **Journal of Toxicology**,
v. 22, p. 23 - 24, 2003.

GOMES, A.; SAHA, A.;
CHATTERJEE, I.; CHAKRAVARTY,
A. K. Viper and cobra venom
neutralization by β -sitosterol
stigmastinol isolated from the root
extract of *Pluchea indica* Less.
(Asteraceae). **Phytomedicine**, v. 14, p.
637-643, 2007.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO,
A.; MENEZES, H. Estudo comparativo
da atividade antimicrobiana de extratos
de algumas árvores nativas. **Arquivos
do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p.
353-358, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los
venenos de serpientes: 50 años de
investigaciones en América Latina.
Revista de Biología Tropical, v. 50, p.
377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.;
Skeletal muscle degeneration induced
by venom phospholipases A₂: insights
into the mechanisms of local and
systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42,
p. 915 – 931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.
Snake venom metalloproteinases: their
role in pathogenesis of local tissue
damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850,
2000.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER,
BHATTACHARYYA, K. K. Snake
venom hemorrhagins. **Critical Reviews
in Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 1-19,
1999.

- HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 01-02, 2002.
- HERZOG-SOARES, J. D.; ISAC, E.; CASTRO, A. M.; BEZERRA, J. C. B. Bioactivity of *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum*, *Caryocar brasiliense*, plants from Brazilian's savannah on the *Trypanosoma cruzi* "in vivo". **Journal of Bioscience**, v. 22, n. 3, p. 113-118, 2006.
- HOLETZ, F. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; MELLO, J. C. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; TOLEDO, C. E. M.; NAKAMURA, C. V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.4, p. 397-401, 2005.
- IRION, G. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 390p.
- ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 942-949, 2006.
- IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and haemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacortiaceae). **Biochimie**, v.85, p. 669-675, 2003.
- JAN, V. M.; GUILLEMIN, I.; ROBBEVICENT, A.; CHOUMET, V. Phospholipase A₂ diversity and polymorphism in European viper venoms: Paradoxical molecular evolution in Viperinae. **Toxicon**, v. 50, p. 1140-1161, 2007.
- JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. I. R.; SATO, D. N.; ELLENA, I.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 243 – 251, 2004.
- KAMIGUTTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1041-1049, 2005.
- KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzyme from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, p. 1147-1161, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 857–868, 1999.

LEÓN, G.; SEGURA, A.; HERRERA, M.; OTERO R.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H.; MEDEIROS, C. R.; PRADO, J. C. L.; MALAQUE, C. M. S.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Human heterophilic antibodies against equine immunoglobulins: assessment of their role in the early adverse reactions to antivenom administration. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1115-1119, 2008.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DE SOUZA JR, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville for antiinflammatory activity. **Phytoterapy Research**, v. 12, p. 218 - 220, 1998.

LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. U.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 24-27, 2003.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 99, p. 265-272, 2005.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Planta medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, s. 1, p. 40-44, 2004.

MACIEL, R. L.; MOREIRA-CAMPOS, L. M.; SILVA, B. C.; BRANDÃO, M. G. L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica Montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.1, 2006.

MAGALHÃES, A.; FERREIRA, R. N.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; YARLEQUE, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; BLOCH, C.; SANCHEZ, E. F. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snake. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 136B, p. 255-266, 2003.

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**, v. 102, p. 364 - 370, 2005.
- MARKLAND, F.S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, p.668, 1998.
- MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCANTARA, T. M. ; IZIDORO, L. F. M. ; HAMAGUCHI, A. ; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. ; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous extract. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 859-866, 2008.
- MENDONÇA, A. C.; FERREIRA, A. S.; BARBIER, C. H.; THOMAZINE, J. A.; MAZZER, N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, p. 152-157, 2006.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDA, A. A dimeric proanthocyanidin form *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavon-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 807 - 813, 1996a.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Pronobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 857 - 862, 1996b.
- MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 569–573, 2007.
- NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂: Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1789, p. 1-9, 2008.
- NIKAI, T.; MORI, N.; SUGIHARA, H.; TU, A.T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.231, p.309-311, 1984.
- NOVAIS, T. S.; COSTA J. FO.; DAVID J. P. L.; DAVID J. M.; QUEIROZ L. P.; FRANÇA F.; GIULIETTI A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognia**, v. 13, p. 5-8, 2003.
- OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEREIDO, A. D. L. Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville (Leguminose-Mimosoidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, s. 2, p. 384-386, 2007.

ORLANDO, S. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (barbatimão)**. 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde), Universidade de Franca, Franca, 2005.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24 - 29, 2001.

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

PITHAYANUKUL, P.; RUENCAROENGSAK, P.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R.; SAEN-OON S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plants polyphenols. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 527 - 533, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria, ISBN.3-900051-07-0, 2006. Disponível em < <http://www.R-project.org> > Acessado em: Jan - 2009.

RIBEIRO A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. .. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias

comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 65-70, 2005.

ROCHA JUNIOR, A. M.; OLIVERIA, R. G.; FARIAS, R. E.; ANDRADE, L. C. F.; AARESTRUP, F. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, p. 1-7, 2006.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 152-165, 2007.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471-479, 2001.

SANTOS JUNIOR, N.; MORETTO, L. D. **Estabilidade de fármacos e medicamentos**. V. 6. São Paulo: Febrapharma, 2005. 69 p.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. Tannin composition of

barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002.

SBH. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>
Acessado em: Agosto de 2008.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serineproteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115 - 1132, 2005.

SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/>
Acessado em: Julho de 2008.

SILVA, J. C.; JORGE, T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v.41, p. 251-255, 2003.

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 *Pentachethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 145-152, 2005.

SILVA, J. O.; FERNANDES, R. S.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, C. Z.; MAZZI, M. V.; FRANCO, J. J.; GIULIATTI, S.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Triterpenoid saponins, new metalloproteases snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra*

macroloba. **Toxicon**, v. 50, p. 283-291, 2007.

SILVA-JÚNIOR, F. P.; GUEDES, H. L. M.; GARVEY, L. C.; AGUIAR, A. S.; BOURGUIGNON, S. C.; DI CERA, E.; GIAVANNI-DE-SIMONE, S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacassu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon**, v. 50, p. 18-31, 2007.

SOARES, A. M.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs of the Future**, v. 29, p. 1105-1117, 2004.

SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; 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 Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2625-2641, 2005.

SOARES, S. P.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. L.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. **Journal of Dental Science**. v. 23, n. 2, 2008.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de

- preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71-75, 2007.
- SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71-75, 2001.
- STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 132-140, 2007.
- TOLEDO, C. E. M. (2002). **Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae**. Dissertação (Mestrado), UNESP, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brasil, f.92
- USHANANDINI, S.; NAGARAJU, S.; HARISHKUMAR, K. The antisnake venom properties of *Tamarindus indica* (Leguminosae) seed extract. **Phytoterapy Research** v. 20, p. 851 – 859, 2006.
- VALE, L. H. F.; 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**, v. 103, p. 104-107, 2008.
- VASCONCELOS, M. C. A. ; RODOVALHO, N. C. M. ; POTT, A. ; POTT, V. J. ; FERREIRA, A. M. T. ; ARRUDA, A. L. A. de ; MARQUES, M. C. S. ; CASTILHO, R. O. ; BUENO, N. R. . Avaliação de atividade biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 121-127, 2004.
- VASCONCELOS, P. C. P.; KUSHIMA, H. ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R. K.; PELLIZZON, C. H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, n.2, p. 293-301, 2008.
- VERONESE, F. 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**, v. 12, p. 123-130, 2005.

ZAMUNER, S. R.; CRUZ-HOFLING, M. A. da; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMION, .
Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, p. 259-271, 2005.