



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA

ESTUDO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DE SEMENTES DE *Stryphnodendron*  
*fissuratum* MART. (LEGUMINOSA MIMOSOIDEAE) SOBRE A  
TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Bothrops leucurus*

RECIFE

2018

RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA

ESTUDO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DE SEMENTES DE *Stryphnodendron*  
*fissuratum* MART. (LEGUMINOSA MIMOSOIDEAE) SOBRE A  
TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Bothrops leucurus*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado para o cumprimento  
parcial das exigências para obtenção  
do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas pela Universidade Federal  
Rural de Pernambuco.

**Orientador:**

Professora Dra. Marliete Maria Soares da Silva

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586e

FERREIRA SILVA, RENATTA PRISCILLA

ESTUDO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE SEMENTES DE *Stryphnodendron fissuratum* MART. (LEGUMINOSA MIMOSOIDEAE) SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA PEÇONHA DE *Bothrops leucurus*: ESTUDO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE SEMENTES DE *Stryphnodendron fissuratum* MART. (LEGUMINOSA MIMOSOIDEAE) SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA PEÇONHA DE *Bothrops leucurus* / RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA. - 2018.

33 f. : il.

Orientador: Marliete Maria Soares da .  
Coorientador: Emmanuel Viana Pontual.  
Inclui referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

1. Acidentes ofídicos. 2. *Bothrops leucurus*. 3. *Stryphnodendron fissuratum*. 4. Fitotoxicidade. 5. Atividade enzimática. I. , Marliete Maria Soares da, orient. II. Pontual, Emmanuel Viana, coorient. III. Título

---

CDD 574

RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA

ESTUDO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DE SEMENTES DE *Stryphnodendron*  
*fissuratum* MART. (LEGUMINOSA MIMOSOIDEAE) SOBRE A  
TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Bothrops leucurus*

Área de concentração: Ciências Biológicas

Data de defesa: 14/08/2018

Resultado:

---

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Marliete Maria Soares da Silva (Presidente)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (1<sup>o</sup> Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Maria Bastos de Souza (2<sup>o</sup> Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

---

Prof. Welton Aaron de Almeida

Departamento de Bioquímica da UFPE

---

## DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia a minha família, em especial a minha mãe Maria José da Silva, ao meu pai Lienaldo Querino de Amorim, ao meu avô José Pereira da Silva e as minhas avós Amara Nunes da Silva (*In memoriam*) e Maria José Amorim (*In memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, porque sem ele nada disso seria possível. Agradeço aos meus pais, Maria e Lienaldo, por toda dedicação, empenho e amor, por nunca desistirem de mim e jamais soltarem minhas mãos, A VOCÊS, MINHA ETERNA GRATIDÃO!

Aos meus familiares e amigos, dentro e fora da UFRPE, pelo carinho, atenção e por sempre confiarem em mim e me encorajarem.

A todos do LABTEC- UFRPE, em especial Jeine e Welton e a Thiago Napoleão do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da UFPE.

A Emmanuel Pontual pela confiança, carinho, atenção e ensinamentos, pela disponibilidade e por me guiar nessa trajetória que avançará para além da graduação. A VOCÊ, MEU MUITO OBRIGADA!

A minha orientadora Marliete Soares, pelos ensinamentos, oportunidade e por ter me proporcionado momentos enriquecedores durante o curso dentro do projeto de pesquisa que trabalhei, MUITO OBRIGADA!

A banca examinadora por terem aceitado meu convite e pelas contribuições e observações feitas para enriquecimento do trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e todos os funcionários. Aos órgãos de fomento pela concessão da bolsa de iniciação científica (CNPq) e de treinamento técnico (FACEPE), muito obrigada pela ajuda e oportunidade.

Por fim, mais uma vez gostaria de enaltecer meus agradecimentos a Deus, sem sombra de dúvidas a força divina me guiou, encorajou e deu forças para eu chegar até aqui. Foram anos difíceis com o falecimento de minhas duas avós e um tio, mas em todos os momentos o meu Deus esteve presente, me conduziu aos melhores caminhos e me sustentou em momentos que eu pensei que não suportaria. **GRATIDÃO A TI, SENHOR!**

## RESUMO

Acidentes envolvendo serpentes peçonhentas representam um significativo problema de saúde pública, com cerca de 2,5 milhões de casos registrados anualmente em todo o mundo. O tratamento convencional para esses acidentes é a administração do soro antiofídico, que tem alta eficácia na neutralização dos danos teciduais, porém, pode causar efeitos colaterais importantes. Em busca de alternativas, estudos têm investigado o potencial de plantas com propriedades antiofídicas, frequentemente utilizadas por trabalhadores rurais, como uma opção complementar ou alternativa ao tratamento convencional. Entre as plantas estudadas, as espécies do gênero *Stryphnodendron* têm se destacado, especialmente a *Stryphnodendron fissuratum*, encontrada exclusivamente no Brasil. No entanto, informações fitoquímicas e sobre suas propriedades biológicas são escassas. Nesse contexto, este estudo avaliou o extrato das sementes de *S. fissuratum*, investigando sua composição química, possíveis efeitos fitotóxicos em plântulas e sua capacidade de neutralizar as atividades enzimáticas da peçonha da serpente *Bothrops leucurus*, uma das mais comuns no Brasil. Para o experimento, as sementes de *S. fissuratum* foram secas, moídas e submetidas a um processo de extração utilizando uma solução de etanol/água. Posteriormente, esse extrato foi testado em plântulas de alface (*Lactuca sativa*), que foram expostas à peçonha de *B. leucurus* para avaliar os efeitos fitotóxicos e de neutralização. Os resultados mostraram que o tratamento com a peçonha não afetou a germinação das sementes, mas reduziu significativamente o crescimento das plântulas. O extrato de *S. fissuratum*, por sua vez, reduziu as atividades enzimáticas da peçonha, incluindo proteases totais, tripsina, quimotripsina e fosfolipases. Em resumo, o estudo demonstrou que o extrato das sementes de *S. fissuratum* possui potencial antiofídico, sendo capaz de reduzir a toxicidade da peçonha de *B. leucurus* em plântulas de alface. Além disso, identificou-se a presença de compostos bioativos no extrato que podem ser explorados no desenvolvimento de novas terapias contra acidentes com serpentes peçonhentas.

**Palavras - chaves:** Acidentes ofídicos; *Bothrops leucurus*; *Stryphnodendron fissuratum*; fitotoxicidade; atividade enzimática; atividade antiofídica; *Lactuca sativa*.

## ABSTRACT

Accidents involving venomous snakes represent a significant public health issue, with approximately 2.5 million cases reported annually worldwide. The conventional treatment for such accidents is the administration of antivenom serum, which effectively neutralizes tissue damage but can cause significant side effects. In search of alternatives, studies have investigated the potential of plants with antivenom properties, often used by rural workers, as a complementary or alternative option to conventional treatment. Among the studied plants, species of the genus *Stryphnodendron* have stood out, especially *Stryphnodendron fissuratum*, found exclusively in Brazil. However, phytochemical information and knowledge about its biological properties are scarce. In this context, this study evaluated the extract of *S. fissuratum* seeds, investigating its chemical composition, potential phytotoxic effects on seedlings, and its ability to neutralize the enzymatic activities of the venom of the snake *Bothrops leucurus*, one of the most common in Brazil. For the experiment, *S. fissuratum* seeds were dried, ground, and subjected to an extraction process using an ethanol/water solution. Subsequently, this extract was tested on lettuce seedlings (*Lactuca sativa*), which were exposed to *B. leucurus* venom to assess phytotoxic and neutralization effects. The results showed that venom treatment did not affect seed germination but significantly reduced seedling growth. The *S. fissuratum* extract, in turn, reduced the enzymatic activities of the venom, including total proteases, trypsin, chymotrypsin, and phospholipases. In summary, the study demonstrated that the extract of *S. fissuratum* seeds has antivenom potential, capable of reducing the toxicity of *B. leucurus* venom in lettuce seedlings. Additionally, the presence of bioactive compounds in the extract was identified, which could be explored in the development of new therapies against venomous snake accidents.

**Keywords:** ophidian accidents; *Bothrops leucurus*; *Stryphnodendron fissuratum*; phytotoxicity; enzymatic activity; antivenom activity; *Lactuca sativa*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ensaio para avaliação da fitotoxicidade da peçonha de *Bothrops leucurus* sobre sementes de *Lactuca sativa*..... **20**
- Figura 2.** Efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* na fitotoxicidade da peçonha de *B. leucurus*.....**23**
- Figura 3.** Efeito do extrato hidroalcolico de sementes de *S. fissuratum* sobre a atividade proteolítica total da peçonha de *B. leucurus*.....**24**
- Figura 4.** Efeito do extrato hidroalcolico de sementes de *S. fissuratum* sobre a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. leucurus*.....**25**
- Figura 5.** Efeito do extrato hidroalcolico de sementes de *S. fissuratum* sobre a atividade das serinoproteases tripsina (A) e quimotripsina (B) da peçonha de *B. leucurus*.....**26**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sistemas de desenvolvimento e reveladores utilizados para análise de metabólitos secundários no extrato de sementes de <i>Stryphnodendron fissuratum</i> .....	<b>18</b>
<b>Tabela 2.</b> Análise fitoquímica do extrato de sementes de <i>Stryphnodendron fissuratum</i> .....	<b>22</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>26</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Anualmente são registrados aproximadamente 20.000 óbitos de um total de 421.000 acidentes com serpentes em todo o mundo, caracterizando um problema de saúde pública (WHO, 2010). Estudos têm mostrado que países subdesenvolvidos e aqueles que utilizem a agricultura como meio de sobrevivência estão na lista dos mais susceptíveis aos acidentes, isto inclui os continentes asiático e africano, bem como a América Latina (CHIPPAUX, 1998; MACKESSEY, 2010; CHIPPAUX, 2011; WHO, 2010).

No Brasil o gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararacas, é considerado o principal causador de acidentes ofídicos, contribuindo com 90,3% do total de acidentes com serpentes peçonhentas registradas (FUNASA, 2001) e seus acidentes são caracterizados por efeitos no local da picada como: dano tecidual local induzido por mionecrose, edema, hemorragia e infiltrado celular; choque hipovolêmico e alterações na coagulação sanguínea, ocasionando incoagulabilidade sanguínea por defibrinogenação. Em casos graves, os acidentados podem apresentar hemorragias em órgãos equidistantes do local da picada (coração, pulmões, rins, intestinos e cérebro), gengivorragia, hematúria, hematêmese e insuficiência renal aguda (CARDOSO e BRANDO, 1982; VITAL BRAZIL, 1982, GUITIÉRREZ e LOMONTE, 1989; FNS, 1998).

Em Pernambuco, as vítimas de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, no período de 1995 a 1997, apresentaram predominantemente alterações no local da picada como dor (77,7%) e edema (68,3%) e em menor proporção, sangramento local, eritema, equimose, abscesso e necrose (AQUINO, 1999).

A hemorragia constitui um dos efeitos mais evidentes no acidente botrópico, a qual é causada, primariamente, por toxinas hemorrágicas ou hemorraginas e agravada por enzimas que atuam consumindo fatores de coagulação sanguínea (KAMIGUTI *et al.*, 1991). As alterações no sistema de coagulação são comuns após os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, devido à ação de proteinases, trombina-símile, ativadores de fator X, ativadores de protrombina (Fator II), enzimas fibrinolíticas e fibrinogenolíticas existentes na peçonha (GENÉ *et al.*, 1989; KAMIGUTI *et al.*, 1991).

Apesar do efeito da incoagulabilidade ser bastante alarmante, dois dias após o tratamento com soro antiofídico, as funções dos fatores de coagulação retomam as suas atividades normais, predominando apenas os fatores locais que fazem com que o paciente permaneça mais tempo hospitalizado (RIBEIRO e JORGE, 1990).

Em Pernambuco, *B. leucurus*, uma serpente de médio porte, com distribuição geográfica desde o Ceará até o Espírito Santo, está entre as principais responsáveis por acidentes na região e cuja peçonha possui 89,9% de proteínas, altos níveis dos íons Zn, Ca, Cl, Cr, Na e Se e quantidades médias dos elementos K, Sb e Br (LIRA DA SILVA, et al. 2009; LIRA DA SILVA et al., 1996c; VASCONCELOS et al., 1996). A peçonha desta espécie caracteriza-se por apresentar alta atividade fibrinogenolítica, proteolítica, hemorrágica e edemaciante e baixa atividade coagulante quando comparado com *B. jararaca*, que é um veneno de referência nacional para produção de soros antibotrópicos (SANCHEZ et al., 1992; LIRA DA SILVA et al., 1996c).

A atividade proteolítica presente nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* é refletida na sintomatologia do acidentado, apresentando grave dano local (CARDOSO e BRANDO, 1982). As proteases podem ser classificadas, assim como as toxinas hemorrágicas, em dois grupos distintos: serinoproteinases e metaloproteinases (SOUSA et al., 2001). Em algumas peçonhas de serpentes as atividades hemorrágica e proteolítica se encontram associadas, intensificando ainda mais o quadro clínico do envenenamento ofídico (SOTO et al., 1988; SOUSA et al., 2001).

Nos casos em que ocorre acidente ofídico, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde é a administração endovenosa do soro antiofídico. Este soro trata-se de um concentrado de anticorpos, que tem o objetivo de neutralizar a maior quantidade possível do veneno circulante e deve ser administrado o mais precocemente possível após o acidente (WEN, 2003).

Também chamados de antivenenos, começaram a ser produzidos em 1901 por Vital Brasil, no Instituto Soroterapêutico, localizado na Fazenda Butantan (BRASIL, 1987). Sua indicação baseia-se em critérios clínicos de gravidade e são obtidas a partir de plasma de equinos hiperimunizados. Apesar de sua eficiência em reverter os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, a soroterapia apresenta algumas desvantagens como uma série de efeitos

colaterais na vítima (reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), ineficiência no combate dos efeitos locais do veneno (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingido) e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade (CARDOSO *et al.*, 2003). Além disso, existe a dificuldade de disponibilidade do soro em algumas regiões do país (WEN, 2003).

Devido a esta série de efeitos indesejados, existe uma busca por tratamentos que possam complementar ou ser uma alternativa a atual soroterapia para neutralização dos efeitos biológicos e toxicológicos nas vítimas de acidentes com serpentes peçonhentas (DE PAULA, 2009).

Uma das alternativas que vem sendo estudada é a utilização de extratos de plantas como agente neutralizante da peçonha. O uso de plantas no combate aos efeitos dos acidentes ofídicos já é descrito em populações nativas por todo o mundo, principalmente onde a soroterapia é restrita ou nula.

A partir uso do “suco” proveniente da maceração de plantas, aplicadas sobre o local da picada ou mesmo sua ingestão oral por populações nativas, surgiram evidências científicas das propriedades antiofídicas dos extratos de plantas (MARTZ, 1992). Nos últimos vinte anos houve a intensificação dos estudos e diversas plantas de várias regiões do planeta foram identificadas como capazes de neutralizar os efeitos do envenenamento ofídico, sendo esta capacidade atribuída à classe de constituintes ativos, incluindo flavonóides, alcaloides, ligninas, taninos e outras (SOARES *et al.*, 2004).

Vários extratos têm sido testados e demonstram excelente atividade antiofídica (SOARES *et al.*, 2004). Biondo *et al.* (2003) avaliaram o extrato aquoso de *Mandevilla velutina* e observaram que a planta foi capaz de inibir a atividade farmacológica da peçonha de diversas espécies de serpentes. O extrato de *Mikonia glomerata* também demonstrou excelente atividade antiofídica (MARIANO *et al.*, 2005).

Outra planta que tem demonstrado excelentes propriedades antiofídicas, com capacidade de neutralizar todos os efeitos biológicos da peçonha de serpentes do gênero *Lachesis* é o extrato de *Stryphnodendron barbatiman* (DE PAULA, 2009).

O gênero *Stryphnodendron* está presente na região sul-americana, e é considerado tipicamente brasileiro, pois 94% de seus táxon são encontrados no Brasil com centro de dispersão provavelmente na Amazônia (OCCHIONI, 1990).

Leguminosas pertencentes à Família Fabaceae, subfamília Mimosoidea, as espécies desse gênero têm-se destacado pelo impacto negativo gerado na economia pecuária do país pela intoxicação causada em ruminantes de pequeno e grande porte e também pela presença de moléculas bioativas com ação medicinal (BORGES-FILHO E FELFILI, 2003; QUEIROZ, 2007; FERREIRA *et al.*, 2009; ALBUQUERQUE *et al.*, 2011).

Estudos farmacológicos realizados com *S. adstringens*, sugerem que a presença de tanino contribua para efeitos cicatrizantes e antioxidantes registrados (SOUZA *et al.*, 2007). Por essa razão tem sido amplamente caracterizada como planta medicinal no combate a leucorréia e hemorragias, e, na limpeza de ferimentos como agente cicatrizante (LORENZI, 2000; LORENZI E MATOS, 2002). Recentemente, Minatel *et al* (2010) comprovaram a eficácia da pomada produzida a partir de extrato de *S. adstringens* como um agente cicatrizante eficaz no tratamento de úlceras de decúbito, enquanto Benvindo *et al.* (2010) concluíram que seu extrato hidroalcolico apresentou atividade inibitória sobre *Staphylococcus aureus*, sugerindo uma alternativa para o tratamento de infecções causados por esse microrganismo.

Adicionalmente, *S. adstringens* apresenta ação anti viral e inibe o crescimento de *Herpetomonas musssouri*, trypanossomatideo não patogênico (HOLETZ *et al.*, 2005; FELIPE *et al.*, 2006), e embora sua ação não tenha sido eficaz nas larvas de miracídio, foram eficientes no combate as cercarias (VINAUD *et al.*, 2005).

Os estudos acerca das propriedades farmacológicas de extratos de *S. adstringens* são ainda mais abrangentes avaliando sua capacidade antinociceptiva (MELO *et al.*, 2007) e antiofídica para as peçonhas botrópicas (*Bothrops moojeni* e *B. pauloensis*), e laquéica (*Lachesis muta*), bem como na ação da pomada a base do extrato sobre os efeitos locais induzidos pela peçonha de *B. pauloensis* (LUCENA *et al* 2009). Essa ação inibitória dos extratos de *S. adstringens* pode ser considerada um agente antiofídico natural em potencial.

Uma espécie de distribuição restrita, *Stryphnodendron fissuratum*, com ocorrência apenas em território brasileiro, geralmente em regiões de cerrado arborizado (cerradão) e matas semidecíduas no Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Conhecida popularmente como “rosquinha” (uma referência ao formato do fruto), é considerada uma das principais responsáveis pela intoxicação de bovinos nas regiões de ocorrência da espécie (OCCHIONI, 1990, BRITO *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2005).

Ao se alimentar das favas e sementes dessa espécie, o gado apresenta quadro clínico de intoxicação caracterizado por distúrbios digestivos e nervosos tais como hiporexia, sialorréia, dificuldade em se levantar, andar desequilibrado, tremores podendo inclusive, provocar aborto (TOKARNIA *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009; ALBUQUERQUE *et al.*, 2011). Apesar de seu reconhecido efeito tóxico, pouco se sabe sobre o potencial farmacológico de *S. fissuratum*.

Os testes de toxicidades têm sido comumente realizados em animais experimentais, todavia cada vez mais a utilização de espécies vegetais específicas pode ser uma alternativa confiável para avaliar o potencial tóxico de muitos compostos e contribuir como uma espécie de triagem ou até mesmo observação inicial da ação das toxinas presentes em peçonhas. Os testes de toxicidade utilizando organismos vegetais foram constatados por vários pesquisadores que realizaram de forma concomitante modelos testes animais e vegetais (PALMIERI *et al.*, 2016; STANGE *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Tendo em vista os testes realizados para avaliação de toxicidade de substâncias biológicas, as toxinas animais são importantes referências para este tipo de investigação. Isso está ligado ao fato de que vários mecanismos celulares e moleculares estão diretamente envolvidos em processos farmacológicos, inflamatórios e de intoxicação. É de suma importância conhecer os componentes existentes em peçonhas de animais, uma vez que estas são constituídas por moléculas interessantes para o desenvolvimento de novos agentes com ação terapêutica, diante disso se tornam alvos de indústrias farmacêuticas e de biotecnologia. Enzimas isoladas de peçonhas, têm sido utilizadas para investigar os mecanismos de coagulação do sangue, formação de tumores, além de terem uso no estudo de diversas patologias e elaboração de fármacos (KING, 2012).

Sendo assim, dada à importância do gênero *Stryphnodendron* em relação às suas propriedades medicinais e aos escassos trabalhos sobre características fitoquímicas e propriedades farmacológicas de *S. fissuratum*, o presente trabalho investigou o potencial neutralizante do extrato de sementes de *Stryphnodendron fissuratum* sobre algumas atividades enzimáticas da peçonha de *Bothrops leucurus* e avaliou sua eficiência através do modelo de fitotoxicidade no monitoramento da virulência da peçonha de *Bothrops leucurus*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a capacidade neutralizante do extrato hidroalcoólico de sementes de *S. fissuratum* Mart. (Leguminosa Mimosoideae) sobre atividades da peçonha de *Bothrops leucurus*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar fitoquimicamente o extrato hidroalcoólico de sementes de *Stryphnodendron fissuratum*;
- Determinar a capacidade de neutralização de algumas atividades enzimáticas da peçonha *Bothrops leucurus* pelo extrato de sementes de *Stryphnodendron fissuratum*.
- Avaliar a eficiência do modelo de fitotoxicidade para plântulas no monitoramento da virulência da peçonha de *B. leucurus*
- Investigar o efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* sobre a ação fitotóxica da peçonha.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Obtenção do extrato concentrado e hidroalcoólico**

O extrato hidroalcoólico de *S. fissuratum* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Diagnóstico Animal. O material vegetal (sementes) foi seco em estufa com renovação e circulação de ar (Marca: MARCONI®, Modelo: MA 035) na temperatura de 32°C por 91 horas e moído em moinho de martelo (Marca: TECNAL, Modelo: TE 320, 60 ciclos) obtendo-se um rendimento de 196,81g de pó do material. Para a preparação dos extratos hidroalcoólico, através da técnica

de maceração e percolação, utilizou-se 100g do pó e 750 mL de solução etanol/água 70% (v/v). O pó foi mantido macerando por um período de 94 horas e posteriormente o conteúdo foi percolado (passou através de um meio poroso) com uma vazão de 30 gotas/minuto.

As Proteínas presentes no extrato de sementes de *S. fissuratum* foram quantificadas conforme descrito por Lowry *et al* (1951), utilizando uma curva de albumina sérica bovina (31–500 µg/ml) como padrão.

### **3.2 Caracterização do extrato de sementes de *S. fissuratum* quanto à presença de metabólitos secundários**

O extrato de sementes de *S. fissuratum* foi analisado por cromatografia em camada delgada para a investigação da composição de metabólitos secundários. Cerca de 2,4 mg do extrato foram diluídos com 2 ml de metanol e levadas ao ultrassom durante 10 minutos para completa solubilização. Os padrões foram utilizados na concentração de 1 mg/ml. O extrato e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60-F254 (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel que foi saturada durante 15 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 1 cm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5 mm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 8,5 x 5 cm. As amostras foram aplicadas a 5 mm da origem e com término 5 mm do final da placa. Após a eluição das placas as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Tabela 1). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

**Tabela 1.** Sistemas de desenvolvimento e reveladores utilizados para análise de metabólitos secundários no extrato de sementes de *S. fissuratum*.

Classe de metabólito	Sistema <sup>1</sup>	Revelador	Padrão
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	90:5:5	NEU + PEG	Ácido gálico
Taninos condensados	90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonoides	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina
Derivados Cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ácido Cafeico e Clorogênico
Terpenos e Esteroides	70:30	Lieberman- Burchard + Δ	β-Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	Lieberman- Burchard + Δ	Escina
Açúcares redutores	50:20:10:10	Timol + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% + Δ	D-frutose
Alcaloides	50:6,75:5	Dragendorf	Nitrato de pilocarpine
Antraquinonas	50:6,75:5	HNO <sub>3</sub> KOH10%	+ Senosídeo A

<sup>1</sup>Sistema: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 – Tolueno: acetato; 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água 50:6,75:5 - Acetato de etila: metanol: água.

### 3.4 Neutralização da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica total da peçonha de *B. leucurus* foi determinada de acordo com Azeez *et al.* (2007). O efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* (50 µl, 0,25 a 0,75 mg) foi determinado em presença de uma alíquota da peçonha (5 µl, 0,4 mg/mL) em NaCl 0,15 M pela adição do substrato azocaseína a 0,6% (p/v, 50 µl). Trezentos microlitros (300 µl) de tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7,5 contendo 100 µL de Triton X-100 0,1% (v/v) foram adicionados e, em seguida, foi efetuada incubação a 37°C por 3 h. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético 10% (v/v), imediatamente incubada a 4 °C por 30 min e depois centrifugada (9000 g, 10 min). A absorbância do sobrenadante a 366 nm foi determinada. Uma unidade de atividade de protease correspondeu à quantidade de enzima que promove um aumento de 0,01 na absorbância. O controle correspondeu à atividade proteolítica da peçonha na ausência do extrato de sementes. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.5 Neutralização da Atividade Serinoprotease (Tripsina e Quimiotripsina)

A atividade de tripsina foi determinada pela incubação (30 min, 37°C) da peçonha (5 µl, 0,4 mg/mL) em NaCl 0,15 M com 8 mM N-benzoil- DL-arginil-p-

nitroanilida (BApNA, 5 µl) em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações do extrato de sementes de *S. fissuratum*. A medida de absorvância a 405 nm foi determinada (KAKADE et al., 1969). Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de BApNA por minuto. Controle da hidrólise do substrato foi efetuado por incubação (60 min, 37 °C) da peçonha com 8 mM BApNA (5 µl). A atividade de quimotripsina foi determinada pela incubação (30 min, 37°C) da peçonha em NaCl 0,15 M com 8 mM N-succinil-L-fenilalanina-p-nitroanilida (SUCPHENAN, 5 µl) em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações do extrato de sementes de *S. fissuratum*. A medida de absorvância a 405 nm foi determinada. Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de SUCPHENAN por minuto. Controle da hidrólise do substrato foi efetuado por incubação (60 min, 37 °C) da peçonha (5 µg) com 8 mM SUCPHENAN (5 µl). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.6 Neutralização da Atividade Fosfolipásica**

A atividade fosfolipásica foi determinada através do método de Marinetti (1965), com algumas modificações na concentração do tampão de diluição. Uma solução contendo gema de ovo diluída em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, em uma proporção em que a densidade óptica a 925 nm correspondesse a aproximadamente 0,6, foi utilizada como substrato. À 2 mL do substrato foram adicionados 50 ml da mistura de peçonha em diferentes concentrações (20; 40; 60; 80; 100 mg/50 ml). A densidade óptica foi registrada a cada 15 segundos durante 2 minutos (a análise das amostras individuais de peçonha foi realizada, em duplicata, utilizando a concentração de 40mg/50mL, de acordo com método anteriormente citado. Uma unidade de atividade foi considerada como sendo a quantidade de peçonha capaz de reduzir 1,0 miliunidade de densidade óptica por minuto.

### **3.7 Fitotoxicidade da peçonha de *B. leucurus***

A toxicidade da peçonha de *Bothrops leucurus* foi avaliada utilizando sementes de *Lactuca sativa* (alface) seguindo a metodologia descrita por Tiquia et al. (1996). Água mineral foi usada como controle negativo e uma solução de

dicromato de potássio (1%, m/v) foi utilizada como controle positivo. Cada ensaio, realizado em duplicata, correspondeu a uma placa de Petri (90 x 15 mm) onde 15 sementes foram colocadas sobre papel filtro embebido com 2,0 ml de peçonha (0,2 mg/mL) ou das soluções controle.

Em seguida, as placas foram vedadas com Parafilm® para evitar a evaporação e incubadas por 72 horas a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após esse período, o número de sementes germinadas em cada placa, bem como o comprimento das radículas foram registrados. Os ensaios foram considerados válidos quando a germinação foi igual ou maior que 90% no controle negativo. O índice de crescimento relativo (ICR) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as equações:  $\text{IG} = (\text{SGT}/\text{SGC}) \times 100$  e  $\text{ICR} = (\text{CRT}/\text{CRC}) \times 100$ ; onde: SGT é o número de sementes germinadas nas amostras teste e SGC o número de sementes germinadas no controle; CRT é o comprimento da radícula no tratamento teste; CRC é o comprimento da radícula no controle negativo. A Figura 1 apresenta o aspecto do ensaio de fitotoxicidade.



**Figura 1.** Ensaio para avaliação da fitotoxicidade da peçonha de *B. leucurus* sobre sementes de *L. sativa*.

### **3.8 Efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* sobre a fitotoxicidade da peçonha de *B. leucurus***

O efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* sobre a fitotoxicidade da peçonha de *B. leucurus* foi determinado conforme descrito no item acima, contudo após pré-incubação da peçonha (0,2 mg/mL) com o extrato de sementes a 2,5 e 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (volume do extrato/volume de água mineral). Em seguida, o

número de sementes germinadas em cada placa, bem como o comprimento das radículas foram registrados e os valores de ICR e IG foram determinados.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O envenenamento ofídico representa um grande problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais em desenvolvimento, gerando mais de 120 mil mortes por ano. (Pinho e Pereira, 2001; Koh et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008; Gutiérrez et al., 2009). Com melhoramento biotecnológico e a introdução de novas metodologias de isolamento, purificação e sequenciamento de macro e micromoléculas, diversas toxinas encontradas nas peçonhas de serpentes já foram identificadas e seus mecanismos de ação elucidados (Fox & Serrano, 2005; Koh et al., 2006; Angulo & Lomonte, 2009). O entendimento sobre a ação dessas toxinas facilita a tentativa de neutralizá-las. Nesse sentido, a utilização da terapia antiveneno ocorre há mais de um século, e neste tempo nenhuma alternativa para o tratamento foi efetivada. Dados de literatura apontam que a busca por terapias alternativas tem se intensificado destacando-se a busca por substâncias de origem natural, como a utilização de soros de serpentes e de marsupiais como inibidores em potencial de toxinas presente nas peçonhas de serpentes (Mors et al., 2000; Vilar et al., 2005; Assafim et al., 2011), além disso extratos vegetais e substâncias isoladas, como as saponinas, têm sido utilizados na tentativa de neutralizar os efeitos provocados pelo envenenamento ofídico (da Silva et al., 2005, 2007b).

Apresentando um conteúdo proteico 24,4 mg/mL, o extrato hidroalcolico de sementes de *S. fissuratum* revelou em sua análise fitoquímica presença de flavonoides, taninos hidrolisáveis proantocianidinas e leucoantocianidinas ou proantocianidinas poliméricas, enquanto os derivados cinâmicos, fenilpropanoides, triterpenos, esteroides, monoterpenos e sesquiterpenos, alcaloides, curaminas, quinonas e açúcares redutores não foram detectados como consta na Tabela 2. Tais substâncias como terpenóides, flavonóides, além de outras fenólicas são retratadas por Mors e colaboradores (2000) como responsáveis pelas inibições das toxinas de peçonhas ofídicas o que sugere que *S. fissuratum* contribua para neutralização das atividades tóxicas da peçonha de *B.leucurus*. Todavia, Borges e colaboradores (2001) sugerem que o isolamento das substâncias características do extrato pode ser problemático devido a

possível ação sinérgica entre os componentes do mesmo, porém os autores ressaltam que para um melhor entendimento do mecanismo de ação destas substâncias é importante que se trabalhe com os produtos isolados, para que assim possa haver um melhor entendimento de quem de fato promove o processo de neutralização de atividades proteolíticas e outras mais.

**Tabela 2.** Análise fitoquímica do extrato de sementes de *S. fissuratum*. <sup>(1)</sup>ácido gálico; <sup>(2)</sup>proantocianidinas poliméricas

Flavonoides	+
Derivados cinâmicos	-
Fenilpropanoides	-
Triterpenos	-
Esteroides	-
Saponinas	Tr
Monoterpenos e Sesquiterpenos	-
Alcaloides	-
Curaminas	-
Quinonas	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	+ <sup>2</sup>
Taninos hidrolisáveis	+
Açúcares redutores	-

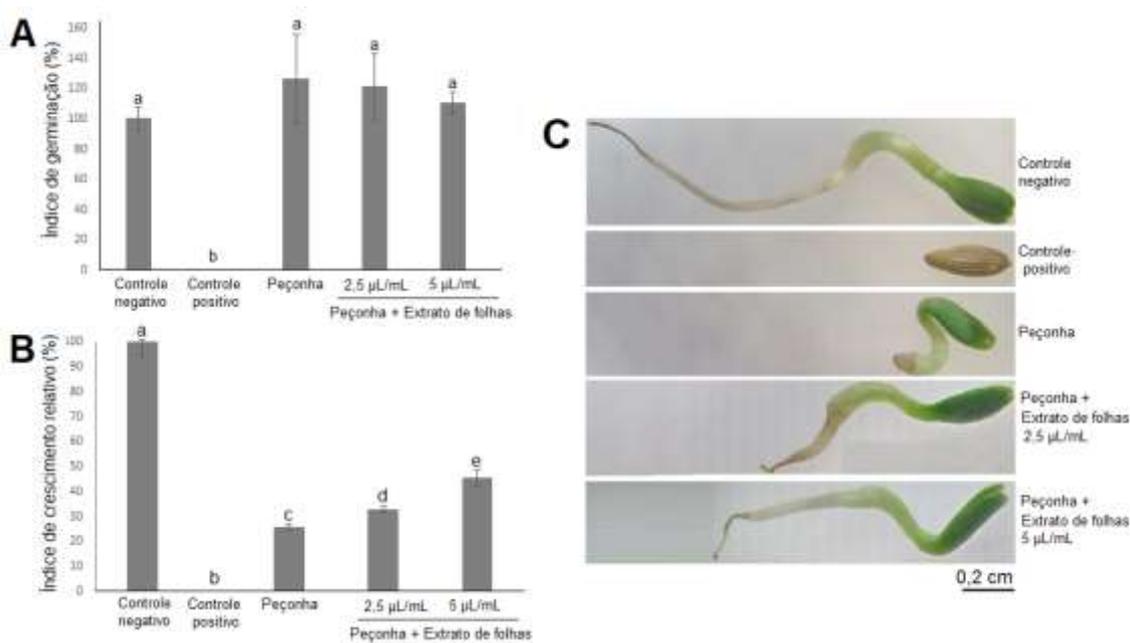
(-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte; (tr) traços

Se por um lado composição do extrato vegetal pode contribuir para neutralização de toxinas ofídicas por outro ele pode se tornar um composto altamente tóxico para um indivíduo ou animal que o consome. Tem sido reportada que as favas de *S. fissuratum*, quando consumida por bovinos promovem complicações decorrentes de úlceras multifocais no abomaso, hemorragias gastrintestinais e necrose hepática (Rodrigues et al. 2005). Sendo assim a fitotoxicidade para plântulas no monitoramento da virulência da peçonha de *Bothrops leucurus* e o efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* sobre a ação fitotóxica dessa peçonha foram realizados.

A eficiência do modelo de fitotoxicidade para plântulas no monitoramento da virulência da peçonha de *Bothrops leucurus* foi avaliada e, em seguida, o efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* sobre a ação fitotóxica dessa peçonha foi investigado. O ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *L. sativa* revelou que a peçonha não interferiu significativamente ( $p = 0,35$ ) na quantidade de sementes germinadas em relação ao controle negativo (Figuras 5A e 5C), contudo, forte ação

tóxica da peçonha foi refletida pelo crescimento das plântulas significativamente reduzido ( $p = 0,003$ ) quando comparado ao controle negativo (Figuras 5B e 5C). Quando a peçonha foi previamente incubada com o extrato de sementes de *S. fissuratum*, foi possível detectar a redução do seu potencial fitotóxico, refletido pelo maior crescimento das plântulas (Figuras 5B e 5C).

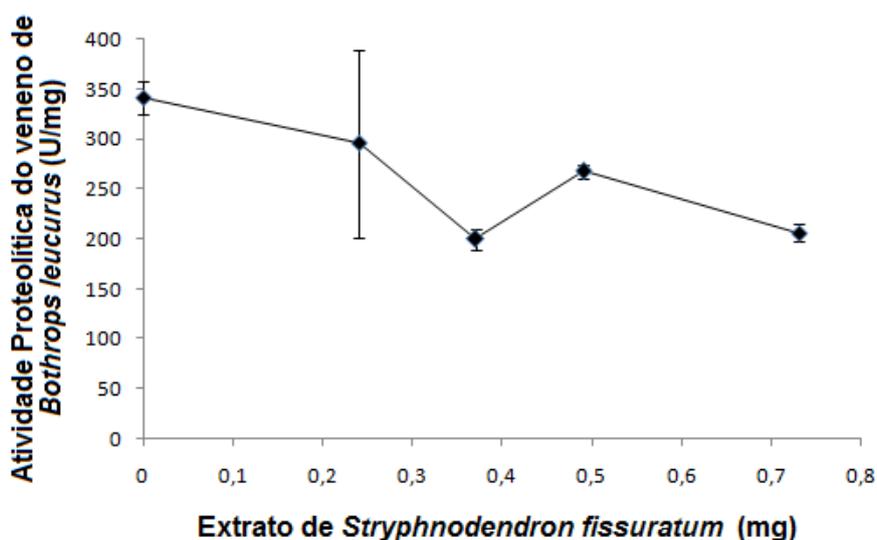
Adicionalmente, esses dados, juntamente com nossos relatos prévios, corroboram com a hipótese de que o extrato de sementes de *S. fissuratum* apresenta um interessante potencial antiofídico.



**Figura 2.** Efeito do extrato de sementes de *S. fissuratum* na fitotoxicidade da peçonha de *B. leucurus*. (A) índices de germinação (%) de sementes de *L. sativa*. (B) Índices de crescimento relativo das plântulas de *L. sativa*. (C) Aspecto das plântulas se *L. sativa* germinadas a partir de sementes tratadas com o controle negativo (água mineral), controle positivo (dicromato de potássio 1% m/v), peçonha de *B. leucurus* (0,2 mg/mL) e peçonha previamente incubada com o extrato de sementes de *S. fissuratum* a 2,5 e 5 µL/mL.

Dentre as proteínas encontradas na peçonha ofídica, destacam-se as metaloproteases (Hite et al., 1994; Fox & Serrano, 2005, 2008; Escalante et al., 2011; Takeda et al., 2011), fosfolipases A2 (PLA2) (Fuly et al., 1997, 2002; Tsai, 2007; Angulo & Lomonte, 2009; Doley & Kini, 2009; Galacci & Cavalcante, 2010; Sun et al., 2010), serinoproteases (Koh et al., 2006; Angulo & Lomonte, 2009; Teixeira et al., 2009), nucleotidasas (Antunes et al., 2010; Dhananjaya & D'Souza, 2010).

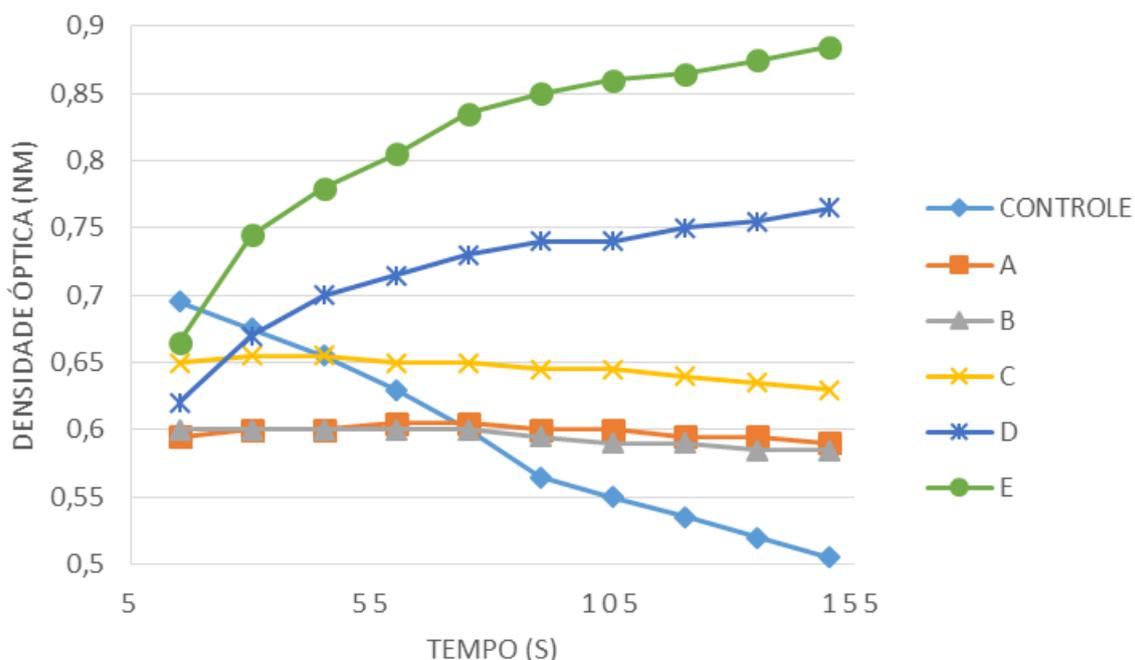
Elas atuam fortemente na matriz celular fazendo com que as mesmas percam sua integridade e resultem no aparecimento de uma sintomatologia característica do acidente botrópico. Proteases e fosfolipases A2 (PLA2) catalisam reações de hidrólise em que proteínas e fosfolipídios são o substrato. A síntese e a degradação de proteínas são processos interdependentes e essenciais ao metabolismo celular. Esses processos estão envolvidos na reciclagem e em todas as mudanças quantitativas e qualitativas das proteínas nas células podendo levar a alteração de sua permeabilidade conduzindo a um quadro clínico típico de efeito no local da picada como edema, dor, rubor e podendo evoluir para necrose (Souza et al. 2001). No teste da atividade proteolítica não específica sobre azocazeína observou-se a inibição dessa atividade, pelo extrato de sementes de *S. fissuratum*, da peçonha de *B. leucurus* (Figura 2).



**Figura 3.** Efeito do extrato hidroalcolico de sementes de *S. fissuratum* sobre a atividade proteolítica total da peçonha de *B. leucurus*.

A partir da utilização de diferentes concentrações da peçonha de *B. leucurus* (20; 40; 60; 80; 100 mg/50 ml) foi determinada uma dose considerada ótima de 40 mg/50mL capaz de degradar o conteúdo de fosfolipídios presentes no substrato. Essa dose foi utilizada para testar a capacidade neutralizante do extrato de sementes de *S. fissuratum* sobre esta atividade (Fig. 5). A ausência de redução na densidade óptica da mistura (gema de ovo + peçonha) em presença de diferentes concentrações do extrato de sementes de *S. fissuratum*

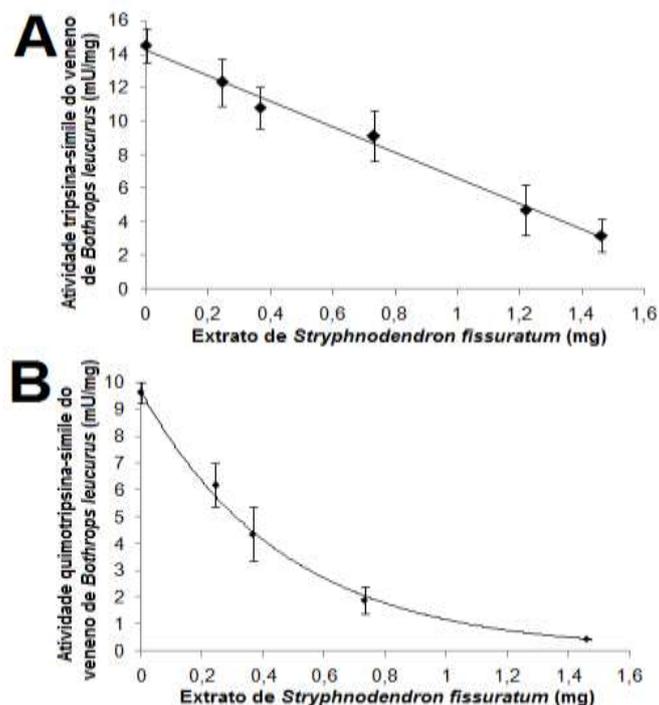
(fig. 4) revelou que este foi capaz de abolir a atividade de fosfolipases da peçonha.



**Figura 4.** Efeito do extrato hidroalcolico de sementes de *S. fissuratum* sobre a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. leucurus*.

Uma das sintomatologias proeminentes durante o envenenamento botrópico é a hemorragia decorrente de metaloproteases que agem diretamente nos capilares, com destruição da lâmina basal e degradação de proteínas da parede vascular, como integrinas, laminina, fibronectina e colágeno. (Fox & Serrano, 2005, 2008; Escalante et al., 2011). Para intensificar ainda mais o quadro hemorrágico as serinoproteases, como a trombina-símile, atua clivagem o fibrinogênio gerando fibrina, porém não ativam o fator XIII da coagulação, que é o responsável pela estabilização do coágulo. Além da clivagem do fibrinogênio, estas enzimas clivam outras proteínas da cascata da coagulação sanguínea, gerando microcoágulos pelo organismo (Koh et al., 2006; Angulo & Lomonte, 2009; Teixeira et al., 2009). O consumo exacerbado dos fatores da coagulação leva a um quadro de incoagulabilidade sanguínea intensificando o quadro hemorrágico.

Considerando a concentração do extrato de sementes de *S. fissuratum* necessária para reduzir à metade a atividade da peçonha de *B. leucurus* como CI50 nossos resultados mostraram que as atividades das serinoproteases tripsina e quimotripsina presentes na peçonha de *B. leucurus* foram sensíveis ao tratamento com o extrato de sementes de *S. fissuratum*, como mostrado na figura 3. Os valores obtidos para CI50 foram  $1,64 \pm 0,2$  mg/mL e  $4,54 \pm 0,35$  mg/mL para tripsina e quimotripsina, respectivamente, revelando que a atividade de tripsina é a mais sensível ao extrato de sementes.



**Figura 5.** Efeito do extrato hidroalcolico de sementes de *S. fissuratum* sobre a atividade das serinoproteases tripsina (A) e quimotripsina (B) da peçonha de *B. leucurus*.

## 5. CONCLUSÕES

- O extrato hidroalcolico de sementes de *Stryphnodendron fissuratum* possui componentes que pode contribuir para a neutralização das toxinas ofídicas.
- A peçonha de *B. leucurus* não interferiu na quantidade de sementes germinadas mas apresentou elevada toxicidade no desenvolvimento da plântula.

- O extrato de sementes de *S. fissuratum* reduziu o a ação fitotóxica da peçonha *B. leucurus*.
- O extrato hidroalcólico de sementes de *Stryphnodendron fissuratum* foi capaz de neutralizar parcialmente as atividades enzimáticas sobre tripsina e quimi tripsina e totalmente sobre atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops leucurus*.

## 6. REFERÊNCIAS

AERTS, T.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanodins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environments*, v.75, p.1-12, 1999.

ALBUQUERQUE, R.F.; NETO-E. J.; FREITAS S.H.; DÓRIA R.G.S.; SAURINI N.O.; COLODEL E.M.; CORREA-R. F.; MENDONÇA F.S. Abortion in goats after experimental administration of *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosoideae). *Toxicon* 58 (2011) 602–605. 2011

ANTUNES, TC; YAMASHITA, KM; BARBARO, KC; SAIKI, M; SANTORO, ML. (2010) Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 56(8): 1443-1458.

AQUINO, W. K., levantamento clínico e epidemiológico dos acidentes ofídicos no Estado de Pernambuco. 1999, 103f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

AZEEZ, A., SANE, A.P., BHATNAGAR, D., NATH, P. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1352–1357, 2007.

BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *The American Journal of Medicine*, v.116, p.478-85, 2004.

BENVINDO, F. S. et al. Avaliação da Atividade Antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcolólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *Rbac: Revista brasileira de análises clínicas*, v. 1, n. 42, p. 27-31, 2010.

BIONDO, R., Pereira, A. M. S., Marcussi, S., Pereira, P. S., Franca, S. C. & Soares, A. M. (2003). *Biochimie*, 85, 1017–1025.

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, n.12, p.1863-1869, 2001.

BORGES-FILHO, H.C.; FELFILI, J.M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. *Revista Árvore*, v. 27, n. 5, p. 735-745, 2003.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1987, 53 p.

CARDOSO, J.L.C.; WEN F.H. Introdução ao ofidismo. In: Cardoso, J.L.C. (Coord.) Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p.3-5.

CARDOSO, J.L.C. & BRANDO, R.V. Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento. São Paulo, Editora Santos. 1982.

CHIPPAUX, J.-P. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. *Toxicon*. 2011 Mar 15;57(4):586-99. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.12.022. Epub 2011 Jan 9.

CHIPPAUX, J.-P. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 1998, 76 (5): 515-524. World Health Organization.1998.

**DE PAULA, RC; CASTRO, HC; RODRIGUES, CR; MELO, PA; FULY, AL.** (2009). Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. *Prot. Pep. Lett.*, 16(8): 899-907.

DE PAULA; CISNE, R. Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente *Lachesis muta* / Rafael Cisne de Paula. – Niterói [s. n.], 2009.

FELIPE, A. M. M.; RINCÃO, V. P., BENATI, F. J.; LINHARES, R. E. C. ; GALINA, K. J., DE TOLEDO, C. E.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazumaulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.

DOLEY, R; KINI, RM. (2009) Protein complexes in snake venom. **Cell. Mol. Life Sci.** 66(17): 2851–2871.

ESCALANTE, T; RUCAVADO, A; FOX, JW; GUTIÉRREZ, JM. (2011) Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics** *In press*.

FERREIRA E.V., BOABAID F.M., ARRUDA L.P., LEMOS R.A.A, SOUZA M.A., NAKAZATO L. & COLODEL E.M. 2009. Poisoning by *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosoideae) in cattle. Intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosoideae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(11)951-957. 2009

FOX, JW; SERRANO, SMT. (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon** 45(8): 969-985.

FOX, JW; SERRANO, SMT. (2008) Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal** 275(12): 3016-3030. **FULY, AL; DE MIRANDA, ALP; ZINGALI, RB; GUIMARÃES, JA** (2002).

Purification and characterization of phospholipase A2 isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.*, 63(9):1589-1597.

**FULY, AL; MACHADO, OL; ALVES, EW, CARLINI; CR** (1997) Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(5): 1372-1380.

FUNASA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Ministério da Saúde. 2 ed. Brasília. p.14, 2001.

GALLACCI, M; CAVALCANTE, WLG. (2010) Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. *Toxicon* 55(1): 1-11.

GESLER, W.M. Therapeutic landscapes: medical issue in light of the new cultural geography. *Social Science and medicine*, v.34, p.735-46, 1992.

GENÉ, J. A.; ROY, A; ROJAS, G. GUTIÉRREZ, J. M. e CERDAS, L. Comparativestudyon coagulante, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities venom sand their neutralization by a polyvalentanti venom. *Toxicon* V.27 (8), pp. 841-48, 1989.

GLASER, K.B.; MOBILIO, D.; CRESPO, M.S.; NIETO, M.L. Secretary phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. *Trends Pharmac. Sci.*, v.14, p.92-98, 1993.

GUTIÉRREZ, J. M. e LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venom. *Areview. Mem. Inst. Butantan*, Vol. 51, pp. 211-33, 1989.

GUTIÉRREZ, JM; LOMONTE, B; LEÓN, G; ALAPE-GIRÓN, A; FLORES-DIAZ, M; SANZ, L; ANGULO, Y; CALVETE, JJ. (2009) Snake venomics and antivenomics:

Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Jornal of Proteomics* 72(2): 165-182.

HITE, LA; JIA, LG; BJARNASON, JB; FOX, JW. (1994) cDNA Sequences for Four

Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Classification, and Their Relationship to

Mammalian Reproductive Proteins. **Archives of Biochemmistry and Biophysics**

308(1): 182-191.

HOLETZ, F. B. et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonassamuel pessoai*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, July 2005.

KAKADE, M.L., SIMONS, N., LIENER, I.E. An evaluation of natural versus synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chemistry*, v. 46, pp. 518–526, 1969.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. G. e SANOMARTINS, I. S. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* Vol 29 (8), pp. 961-72. 1991.

KASTURIRATNE, A; WICKREMASINGHE, AR; DE SILVA, N; GUNAWARDENA, NK; PATHMESWARAN, A; PREMARATNA, R; SAVIOLI, L; LALLOO, DG; DE SILVA, HJ. (2008) The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLOS Medicine** 5(11): 1591-1604.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 11, n. 11, p. 1469–1484, 23 nov. 2011.

**KINI, R.M.** Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, v.42, p.827-840, 2003.

**KOH, DC; ARMUGAN, A; JEYASEELAN, K.** (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol. Life Science*, 63(24): 3030-3041.

LIRA DA SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; CASAIS E SILVA, L.L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T. Serpentes de Importância Médica no Nordeste do Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*, 79 (Supl.1):7-20. 2009.

LIRA DA SILVA, R.M.; VASCONCELOS, C.M.L., GUARNIERI, M.C. Partial characterization of *Bothrops leucurus* venom. In: IV SIMPÓSIO DA SOCIEDADE

LORENZI, H. 2000. Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª ed. Plantarum, Nova Odessa, Brasil, 620 pp.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.

LUCENA, M.N.; MENDES, M.M.; BRANDEBURGO, M.I.H. Avaliação da estabilidade da pomada a base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Convillee sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. Instituto de Genética e Bioquímica. 2009.

MACKESSY, S.P. Evolutionary trends in venom composition in the western rattlesnakes (*Crotalus viridissensulato*): toxicity vs. tenderizers. *Toxicon*. 2010 Jul;55(8):1463-74. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.028. Epub 2010 Mar 12.

MARIANO, VA; SILVANA, M; MARISTELA, AFD; CLAYTON, ZO; LUCÉLIO, BC; ODAIR, AG; SUZELEI, CF; ANDREIMAR MS; PAULO, SP(2005). Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J.of Ethnopharmacol.*, 102: 364–370.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*. 1992 Oct;30(10):1131-4

MELO, J. O.; ENDO, T. H.; BERSANI-AMADO, L. E.; SVIDZINSKI, A. E.; BARONI, S.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n.3, p.465-469, 2007.

MELO, D.S. et al. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, n.2, p.420-8, 2007.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.; PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snake bite: the molecular approach. *Phytochemistry*, v.55, n.6, p.627- 42, 2000.

MORTON, D.M. Importance of species selection in drugtoxicity testing. *Toxicology Letters*, v.102, p.545-50, 1998.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v.37, p.411-445, 1999.

OCCHIONI, E. M. L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Botânica Brasileira*, v.4, n.2, p.153-158, 1990.

OMS. (2007) **Rabies and envenomings - A Neglected Public Health Issue: Report of a Consultative Meeting**, 32p. Geneva, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A(2) inhibitors: Medicinal chemistry and 723 therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 8, p. 743-724 756, 2007.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 227, n. 5, p. 156, 23 maio 2016.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista Assoc. Med.Bras**, v. 47, n 1, jan./mar., 2001.

RIBEIRO, L. A. e JORGE, M. T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes, Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo, Vol. 32 (6), pp. 436-42, 1990.

RODRIGUES, A.S., Chaves N.S.T., Damasceno A.D., Trindade B.R., Martins G.H.L. & Arantes A.F. 2005. Aspectos clínicos da intoxicação experimental de bovinos pelos frutos de *Stryphnodendron fissuratum* Mart. ("rosquinha"). *Ciênc. Anim. Bras.* 6:119-126.

SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ, M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-COTTA, G., DINIZ C.R. Biological

activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, Oxford, v. 30, n. 1, p. 95-103. 1992.

SERRANO, S.M.T.; FOX, J.W. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, n.45, v.8, p. 969-985, 2005.

Silva, N.L.A., Miranda, F.A.A., Conceição, G.M., 2010. Triagem fitoquímica de plantas do cerrado, da área de proteção ambiental do Inhamun, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena* 6.

Silva, N.L.A., Miranda, F.A.A., Conceição, G.M., 2010. Triagem fitoquímica de plantas do cerrado, da área de proteção ambiental do Inhamun, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena* 6.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1488, n.1-2, p.1-19, 2000.

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

SOARES, A. M.; JANUARIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects off Brazilian plants against snake venoms. *Drugfuture*, Barcelona, v.29, n.11, p. 1105- 1117. 2004.

SOTO, J.G.; PEREZ, J.C e MINTON, S.A. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snakes venoms. *Toxicon*, Vol. 26 (9), pp. 875-82, 1988.

SOUSA, J. R. F., MONTEIRO, R., Q., CASTRO, H. C. e ZINGALI, R.B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom up on its own constituents. *Toxicon*, Vol. 39, pp.787-92, 2001.

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*, São Paulo, v.17, n. 1, p. 71-75, 2007.

SUN, GY; SHELAT, PB; JENSEN, MB; HE, Y; SUN, YA; SIMONYI, A. (2010) Phospholipases A2 and Inflammatory Responses in the Central Nervous System. **Neuromol Med.** 12(2): 133–148.

TAKEDA, S; TAKEYA, H; IWANAGA, S. (2011) Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Bioch. Biophys. Acta.** *In press*.

TALALAY, P. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. *Academic Medicine*, v.76, p.238-47, 2001.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake. **International journal of experimental pathology**. V. 86. P. 107-115, 2005

TIQUIA, S.M., Tam, N.F.Y., Hodgkiss. I.J., 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.* 93, 249-256.

TSAI, IH. (2007) Evolutionary Reduction of Enzymatic Activities of Snake Venom Phospholipases A2. **Toxin Reviews** 26: 123-142.

TOKARNIA, C.H., Brito M.F., Driemeier D., Costa J.B.D. & Camargo A.J.R. 1998. Aborto em vacas na intoxicação experimental por *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). *Pesq. Vet. Bras.* 18(1):35-38.

VINAUD, M. C. et al. Avaliação da atividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* SSP. Sobre Miracídios e Cercárias de *Schistosoma mansoni*. *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, v. 34, n. 2, p. 137-143, mai./aug. 2005.

WEN, F.H. Soroterapia. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003. p.p. 381