

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Marsypianthes chamaedrys*
(VAHL) KUNTZ (LAMIACEAE) FRENTE AO VENENO
DE *Bothrops atrox*.

ALCINEIDE LIMA MAGALHÃES

MANAUS
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ALCINEIDE LIMA MAGALHÃES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Marsypianthes chamaedrys*
(VAHL) KUNTZ (LAMIACEAE) FRENTE AO VENENO DE *Bothrops atrox*.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Multi-institucional em
Biotecnologia da Universidade Federal
do Amazonas para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia, com ênfase
em Farmacologia de Plantas Medicinais.

Orientadora: Profa. Doutora Maria Cristina dos Santos

Co-Orientador: Prof. Doutor Emerson Lima

MANAUS
2010

Dedico este trabalho ao professor Luis Frederico Mendes dos Reis
Arruda e a todos os pesquisadores que trabalham com dedicação e
respeito ao conhecimento tradicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Quem tudo pertence, e ao Mestre Jesus, princípio e fim.

A minha orientadora, Dra. Maria Cristina dos Santos, uma verdadeira mãe-acadêmica. Muito obrigada porque, como sempre, você foi além do que precisava ser.

Ao meu companheiro, Victor, pela ajuda incansável e por ser compreensivo em todas as horas.

A minha querida família, pelo apoio e pelas orações.

A Gleyce dos Santos Barbosa e Maria Cristina dos Santos Verdam, não somente pela enorme generosidade em ensinar e aprender juntas, mas como também pela disposição em construir uma bela amizade.

Aos colegas do setor de Farmacologia do Centro de Biotecnologia da Amazônia, pelo apoio inicial.

Ao Sr. Dinho, mateiro e distinto habitante de Novo Airão (AM), que tão gentilmente nos recebeu em sua casa e nos acompanhou nas coletas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, pela concessão de bolsa de mestrado.

À Coordenação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas e aos professores Dra. Débora Ohana e Dr. Emerson Lima, pela confiança e disponibilidade em ceder os laboratórios.

A todos os funcionários da FCF/UFAM, especialmente a Sra. Luciana.

Ao Dr José Lapa, pela iniciativa em realizar um curso de Farmacologia de Plantas Medicinais no Amazonas.

A Dra. Adriana Malheiro, por dispor os laboratórios do HEMOAM e pela contribuição no desenvolvimento dos experimentos.

A Liziara Fraporti e Nadjia Garcia, pelo apoio técnico.

Ao Dr. Paulo Nogueira, por gentilmente ceder seu laboratório.

A Maria Carolina Scheffer, pela paciência em ensinar, por não desanimar e topar nossas “idéias loucas”.

Ao colega Antônio Boechat, por incentivar essas “idéias”.

"Lembraí-vos das coisas passadas da antiguidade: que eu sou Deus, e não há outro, eu sou Deus, e não há outro semelhante a mim; que desde o princípio anuncio o que há de acontecer e desde a antiguidade, as coisas que ainda não sucederam; que digo: o meu conselho permanecerá de pé, farei toda a minha vontade; que chamo a ave de rapina desde o Oriente e de uma terra longínqua, o homem do meu conselho. Eu o disse, eu também o cumprirei; tomei este propósito, também o executarei. Ouvi-me vós, os que sois de obstinado coração, que estais longe da justiça. Faço chegar a minha justiça, e não está longe; a minha salvação não tardará; mas estabelecerei em Sião o livramento e em Israel, a minha glória"

RESUMO

Marsypianthes chamaedrys, espécie vegetal amplamente distribuída no Brasil, é utilizada popularmente em acidentes ofídicos e reações inflamatórias locais. No presente trabalho *M. chamaedrys* foi testada frente às seguintes atividades do veneno de *Bothrops atrox*: inflamatória (fosfolipásica A_2 , migração de leucócitos, liberação de citocinas e aumento da permeabilidade vascular) e coagulante. In vitro, *Marsypianthes chamaedrys* foi eficaz em bloquear as atividades fosfolipásica A_2 e coagulante, apresentando também atividade anticoagulante frente aos testes TAP e TTPA. Dos extratos obtidos, a forma de contuso apresentou melhor atividade inibitória nos ensaios in vitro, demonstrando que a atividade biológica é afetada pelo modo de obtenção dos extratos. In vivo, os extratos inibiram a migração de leucócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , sem alterar significativamente, a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10; porém, não inibiram o aumento da permeabilidade vascular. Em ensaios preliminares, *M. chamaedrys* não demonstrou efeitos toxicológicos agudos ou efeitos citotóxicos. A caracterização dos mecanismos anti-inflamatórios induzidos por *Marsypianthes chamaedrys* é de extrema importância para que extratos obtidos dessa espécie vegetal possam, futuramente, ser utilizados como coadjuvante no tratamento, visto que os antivenenos específicos não são eficazes na neutralização das atividades locais, nos acidentes botrópicos.

Palavras-chave: *Marsypiantes chamaedrys*, plantas antiofídicas, atividade anti-inflamatória, *Bothrops atrox*.

ABSTRACT

This study investigated the efficacy of *Marsypianthes chamaedrys* Vahl inflorescence and leaf extracts in inhibiting the inflammatory and coagulant actions of *Bothrops atrox* venom. *M. chamaedrys*, which is used in Brazil as a folk medicine to treat snakebites and local inflammatory reactions, was tested in vitro to determine its ability to block indirect phospholipase A₂ and direct coagulant activities and in vivo to determine its ability to inhibit leukocyte migration, cytokine release and an increase in vascular permeability. In vitro, *M. chamaedrys* showed antiphospholipase A₂ and anticoagulant activities; the latter activity was also confirmed by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) in the absence of venom. Of the extracts used, those obtained from the crushed plant had the greater inhibitory activity in in vitro tests, showing that biological activity is affected by the way extracts are obtained. In vivo, *M. chamaedrys* inhibited leukocyte migration and the release of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α without altering the concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10; however, it did not inhibit an increase in vascular permeability. In preliminary tests, *M. chamaedrys* showed no acute toxicological or cytotoxic effects. As specific antivenoms are not effective in neutralizing the local action of *Bothrops* venoms, characterization of the anti-inflammatory mechanisms induced by *M. chamaedrys* is of vital importance if the extracts of this plant species are to be used in future as adjuvants in the treatment of snakebites.

Keywords: *Marsypianthes chamaedrys*; antiophidian plants; Anti-inflammatory activity; *Bothrops atrox*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- A: <i>Bothrops atrox</i> . B: Distribuição de <i>B. atrox</i> no território brasileiro.	22
Figura 2- Visão simplificada da atividade de principais grupos de toxinas presentes em venenos botrópicos nas diversas etapas da coagulação sanguínea. PL= fosfolipídios.	33
Figura 3- <i>Marsypianthes chamaedrys</i> . A: aspecto geral. B: flor. C: cálice aberto mostrando o gineceu. D: corola. E: núcula.	40
Figura 4 - A : Aspecto geral de <i>M. chamaedrys</i> . B: Detalhes das inflorescências.	41
Figura 5– Coleta do líquido peritoneal	53
Figura 6 – A) Animal logo após a injeção do corante Azul de Evans; B) Fragmentos de tecido animal após 24 h diluído em formamida	57
Figura 7 – Atividade anticoagulante direta de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> frente ao veneno de <i>Bothrops atrox</i> (0,5 mg/mL).	61
Figura 8 - Inibição da atividade antifosfolipásica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5mg/mL) pelos extratos de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> .	65
Figura 9 – Migração celular quatro horas após a injeção do veneno de <i>Bothrops atrox</i> .	67
Figura 10 – Migração celular induzida em diferentes horários (0h , 2h e 4h) após a injeção do veneno de <i>Bothrops atrox</i> .	68
Figura 11 - Concentração (pg/mL) de IL-6 (A); TNF- α (B) e IL-10 (C) em líquido peritoneal de camundongos, nos diferentes horários analisados (0 h, 2 h e 4 h).	71
Figura 12 – Cinética da concentração (pg/mL) de IL-6 (A); TNF- α (B) e IL-10 (C) nos diferentes horários analisados (0 h, 2 h e 4 h).	72
Figura 13 - Cinética do aumento de permeabilidade capilar induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	74
Figura 14 - Atividade de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> frente à permeabilidade vascular induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i> .	75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Resumo da composição bioquímica do veneno botrópico: principais frações protéicas, não-protéicas e peptídicas identificado no veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .	26
Quadro 2 – Principais substâncias naturais, com atividade anti-inflamatória conhecida, presentes em <i>M. chamaedrys</i> e comuns a outras plantas com atividade antiofídica confirmada cientificamente.	36
Quadro 3- Classificação taxonômica de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> .	39
Tabela 1 - Percentagem de viabilidade celular comparado ao controle branco (RPMI) nos dois horários testados (2 h e 24 h).	58
Tabela 2 – Percentagem de atividade coagulante de extratos de <i>Marsypiantes chamaedrys</i> frente ao veneno de <i>Bothrops atrox</i> (0,5 mg/mL).	60
Tabela 3 – Percentagem da ação anticoagulante de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> na atividade TAP e TTPa.	62
Tabela 4 – Rendimento médio dos extratos e teor de voláteis em extratos liofilizados.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP	Difosfato de adenosina
AFL	Extrato aquoso de inflorescências de <i>Marsypianthes chamaedrys</i>
AFO	Extrato aquoso de folhas de <i>M. chamaerys</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CFL	Contuso de inflorescências de <i>M. chamaedrys</i>
CFO	Contuso de folhas de <i>M. chamaedrys</i>
COX-2	Ciclooxigenase -2
DMC	Dose mínima coagulante
DMSO	Dimetilsulfóxido (C ₂ H ₆ OS)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (Enzyme-linked immuno sorbet Assay)
i.d.	Via de administração intra-dérmica
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
i.p.	Intra-peritonal
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
kDa	Quilodalton
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
P.A.	Padrão analítico
PBS	Tampão fosfato de sódio (phosphate buffered saline)
PLA ₂	Fosfolipases A ₂

p.o	(<i>per oros</i>) Via oral
p/v	Peso por volume
RPM	Rotações por minuto
SAB	Soro Antibotrópico
s.pl	Sub-plantar
SVMP	Metaloproteinases de venenos de serpentes
SVSP	Serinoproteases de venenos de serpentes
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TXA ₂	Tromboxano A ₂
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Acidentes ofídicos no Brasil	21
3.1.1 O gênero <i>Bothrops</i> sp.	21
3.1.2 Quadro Clínico do Acidente Botrópico	23
3.1.3 Fisiopatologia do envenenamento botrópico	25
3.1.3.1 Principais componentes do veneno botrópico com atividade tóxica	25
3.1.3.2 Atividades biológicas do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	29
3.2 Metabólitos vegetais: relações entre ação anti-inflamatória e antiofídica	34
3.3 <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntz	37
3.3.1 Dados taxonômicos - Família Lamiaceae	37
3.3.2 Dados taxonômicos - O gênero <i>Marsypianthes</i> sp.	38
3.3.3 Dados Botânicos de <i>Marsypianthes chamaedrys</i>	39
3.3.4 Dados etnofarmacológicos	41
3.3.5 Constituintes fitoquímicos	42
3.3.6 Atividades farmacológicas	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Coleta de material botânico	44
4.2 Preparações dos extratos	44

4.2.1 Determinação de voláteis	45
4.3 Material Biológico	45
4.3.1 Veneno e Soro Antibotrópico	45
4.3.2 Seleção de voluntários	46
4.3.3. Animais	46
4.4 Testes farmacológicos	47
4.4.1 Ensaio preliminares de toxicidade	47
4.4.1.1 Citotoxicidade	47
4.4.1.2 Testes Hipocráticos	48
4.4.2 Atividades na coagulação	49
4.4.2.1 Atividade direta na coagulação induzida por veneno de <i>Bothrops atrox</i>	49
4.4.2.2 Atividade indireta na coagulação	50
4.4.3 Inibição da atividade da Fosfolipase A ₂ do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	51
4.4.4 Atividade anti-inflamatória frente ao veneno de <i>Bothrops atrox</i>	52
4.4.4.1 Peritonite induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	52
4.4.4.2 Inibição da liberação de citocinas	54
4.4.4.3 Aumento da permeabilidade vascular	55
4.5 Análise Estatística	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Estudos preliminares de toxicidade	58
5.1.1 Citotoxicidade	58
5.1.2 Testes hipocráticos	59
5.2 Atividades na coagulação	59

5.2.1 Atividade direta na coagulação induzida por veneno de <i>Bothrops atrox</i>	59
5.2.2 Atividade indireta na coagulação	61
5.3 Inibição da atividade da Fosfolipase A₂ do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	64
5.4 Atividade anti-inflamatória frente ao veneno de <i>Bothrops atrox</i>	66
5.4.1 Peritonite induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	66
5.4.2 Dosagens de citocinas in vivo	69
5.4.3 Aumento da permeabilidade vascular	73
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

As serpentes peçonhentas existentes, no Brasil, pertencem às famílias Viperidae, Colubridae e Elapidae. Os acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública nos países tropicais devido à alta frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam. Os dados epidemiológicos mostram que 72,6% dos acidentes ocorridos, em 2009 no Brasil, foram causados por espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* sp., que constitui o mais importante envenenamento ofídico (BRASIL, 2009).

Bothrops atrox é a espécie responsável pela maioria dos acidentes na região Norte do Brasil e seu envenenamento desencadeia ações locais e sistêmicas em suas vítimas (BORGES et al., 1999). Lesões locais são apontadas como de maior importância clínica e incluem edema, dor, eritema, cianose, necrose e celulite (PETRETSKI et al., 2000a, para revisão). Atividades hemorrágicas, fosfolipásicas e proteolíticas dos venenos botrópicos têm sido relacionadas à patogênese destas lesões e sintomas (GUTIERREZ; LOMONTE, 2003). Estes eventos relacionados à inflamação, como o aumento da permeabilidade vascular e dor, têm sido atribuídos à liberação local de mediadores como histamina, bradicinina e anafilotoxinas (C3a e C5a). As coagulopatias provocadas por acidentes botrópicos resultam da depleção de fatores da coagulação, enquanto os sangramentos espontâneos são atribuídos à hemorraginas causadoras de danos ao endotélio vascular, sendo algumas bem caracterizadas como metaloproteinases (PAINE et al., 1992).

O tratamento preconizado para os acidentes ofídicos são os antivenenos, imunobiológicos produzidos pela imunização de animais com os venenos das principais serpentes causadoras de acidentes. Tais imunobiológicos neutralizam, por meio de seus anticorpos, os componentes responsáveis pela indução das ações biológicas dos venenos. Os antivenenos-botrópicos não são

eficazes em neutralizar essas ações locais, principalmente, quando o tratamento não é imediato (MORAIS et al., 1994; PICOLO et al., 2002). Sendo assim, a amputação de membros acometidos ainda é uma realidade, em algumas regiões do Brasil. No Amazonas, devido às longas distâncias existentes entre os locais onde ocorre o acidente e o atendimento médico, os pacientes demoram a receber o tratamento soroterápico específico (BORGES et al., 1999; DOS-SANTOS, 2003).

Novas tendências em terapia do envenenamento apontam para a possibilidade de se interferir na lesão tissular local e nos efeitos sistêmicos, induzidos pelo veneno, não apenas com o tratamento soroterápico, mas também, pela modulação de alguns mediadores inflamatórios endógenos produzidos após o envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 2007).

A procura por novos compostos oriundos de extratos vegetais capazes de complementar a soroterapia é uma abordagem que já despertou a atenção de vários pesquisadores (MARTZ, 1992; HOUGHTON; OSINBOGUN, 1993; BORGES et al., 1996; MORS, 2000; COSTA et al., 2008). Na região Amazônica, os pacientes utilizam plantas medicinais pela dificuldade de obter tratamento soroterápico. Trabalhos do nosso grupo constataram a eficácia de *Peltodon radicans* Pohl (BORGES et al., 1996) e *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntz (equivocadamente tida como *Peltodon radicans*) no bloqueio da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* (COSTA et al., 2008). Especificamente o trabalho de Costa e colaboradores (2008) demonstrou maior eficácia de extratos brutos (contusos) em relação a frações isoladas de flores e folhas de *M. chamaedrys* testadas para a citada atividade. Tal informação corrobora com o conceito de sinergismo entre os compostos responsáveis por uma ação farmacológica, o que tem motivado muitos pesquisadores a “nadar contra a corrente” das pesquisas voltadas ao isolamento e síntese de produtos naturais e dedicar-se ao desenvolvimento de fitoterápicos (DUKE, 2000).

As partes aéreas de *Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae), popularmente conhecida como paracari ou boia-caá (do tupi ‘erva de cobra’), são utilizadas no Estado do Amazonas (Norte do Brasil), tanto por via oral como na forma de cataplasmas, no local da picada, para aliviar os efeitos secundários da peçonha. Apesar de ser uma espécie pouco estudada quimicamente (MENEZES et al., 1998a; MENEZES et al., 1998b; FERREIRA, 2001), alguns dos compostos isolados como esteróides (lupeol, α e β -sitosterol), terpenóides (ácido ursólico, α e β -amirina) e flavonóides (rutina) têm ação anti-inflamatória conhecida e estão presentes em inúmeras outras plantas com atividade antiofídica comprovada (MORS, 2000).

Alguns aspectos de correlação entre atividade antiofídica e atividades farmacológicas relacionadas à propriedade anti-inflamatória de *Marsypianthes chamaedrys* (ação antinociceptiva, antiedematogênica e diminuição da permeabilidade vascular) foram testadas para o veneno de *Bothropoides jararaca* (anteriormente *Bothrops jararaca*), com resultados promissores (PEREIRA; PEREIRA, 1989; RUPPELT et al., 1990; RUPPELT et al., 1991; PEREIRA et al., 1992). No entanto, muitos destes ensaios foram *screening*, o que não permitiu uma correlação adequada de dose-efeito do ponto de vista farmacológico. Além disso, os testes foram realizados com o veneno de *Bothropoides jararaca* (anteriormente *Bothrops jararaca*), considerado menos potente que o veneno de *Bothrops atrox* para ações farmacológicas que se relacionam aos efeitos locais: edema, hemorragia e necrose (FURTADO et al., 1991). Com base nos dados citados, o presente trabalho teve por objetivo investigar os extratos aquosos e contusos de folhas e flores de *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntz (Lamiaceae) frente às seguintes atividades do veneno de *Bothrops atrox*: inflamatória - fosfolipásica A_2 , migração de leucócitos, liberação de citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α), aumento da permeabilidade vascular- e coagulante. Acredita-se que as informações obtidas neste trabalho serão benéficas para a população que se utiliza do

conhecimento tradicional, bem como incentivará a prospecção e o desenvolvimento de novos medicamentos para minimizar as ações locais induzidas pelos acidentes ofídicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de inibição das atividades inflamatória e coagulante do veneno de *Bothrops atrox* pelos extratos aquosos e contusos de folhas e flores de *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntz (Lamiaceae).

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem toxicológica, in vitro e in vivo, dos extratos a serem utilizados nos experimentos.
- Caracterizar atividades farmacológicas, in vitro, dos extratos aquosos e dos contusos de folhas e flores de *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntz, relacionadas às propriedades inibitórias da ação inflamatória (fosfolipase A₂) e coagulante do veneno de *Bothrops atrox*.
- Investigar, in vivo, a inibição da atividade inflamatória (migração celular, permeabilidade vascular e liberação de citocinas) do veneno de *Bothrops atrox*, pelos contusos de folhas e flores de *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntz.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

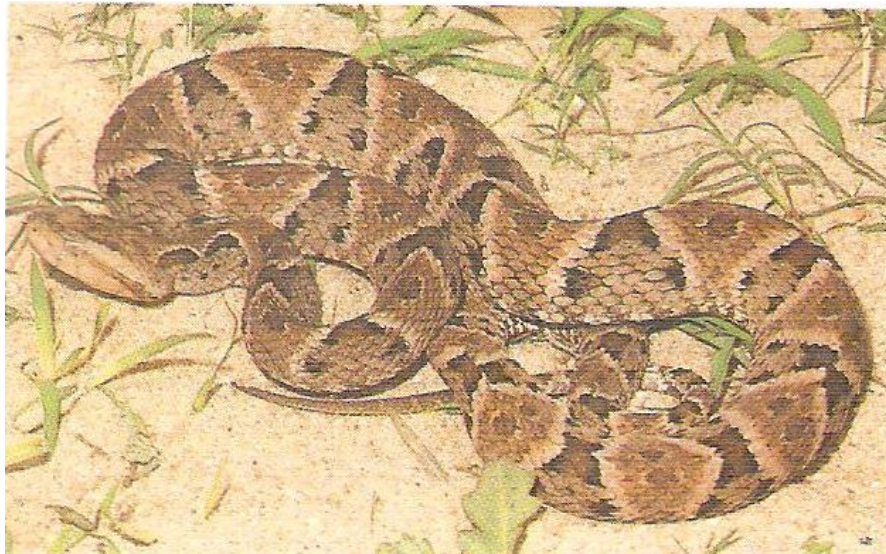
3.1 Acidentes ofídicos no Brasil

No mundo, são encontradas, aproximadamente, 3000 espécies de serpentes, das quais 10 a 14% são consideradas peçonhentas (WHO, 2010). No Brasil existem cerca de 250 espécies de serpentes, sendo que destas, 70 são peçonhentas e responsáveis por 27 mil acidentes ofídicos notificados, em 2009. A maioria destes acidentes devem-se as serpentes dos gêneros *Bothropoides* sp., *Rhinocerothis* sp., *Bothrops* sp. (jararacas) e *Caudisona* sp. (anteriormente *Crotalus* sp.- cascavel), sendo raros os ocorridos por *Lachesis* sp. (surucucu, surucutinga) e *Micrurus* sp. (corais verdadeiras) (BRASIL, 2009; BÉRNILS, 2010).

3.1.1 O gênero *Bothrops* sp.

Atualmente, as serpentes do gênero *Bothrops* sp. compreendem cerca de oito espécies, distribuídas por todo o território nacional (BÉRNILS, 2010). Possuem cauda lisa, não têm chocalho e as suas cores variam muito, dependendo da espécie e da região onde vivem. São popularmente conhecidas como jararaca, ouricana, jararacuçu, jararaca-do-rabo-branco, malha de sapo, surucucurana, combóia e caíçaca. Habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares, apesar de muitos acidentes ofídicos ocorrerem no período diurno (PINHO; PEREIRA, 2001).

1A



1B



Figura 1- A: *Bothrops atrox*. B: Distribuição de *B. atrox* no território brasileiro.
FONTE: SCHVARTSMAN, 1992.

3.1.2 Quadro Clínico do Acidente Botrópico

Os venenos de serpentes são misturas complexas de moléculas farmacologicamente ativas, incluindo as de baixo peso molecular e componentes inorgânicos. Os efeitos biológicos são complexos devido a ações distintas de diferentes componentes e à possibilidade de agirem coordenadamente com outras moléculas do veneno. A ação sinérgica das proteínas dos venenos pode potencializar suas atividades, ou seja, diferentes toxinas podem atuar para induzir um único efeito e uma dada toxina pode ter várias atividades (CALVETE et al., 2009).

França e Málaque (2003) descreveram de modo didático três atividades fisiopatológicas do veneno botrópico: inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica. Tais atividades são responsáveis pelo quadro clínico local e sistêmico do envenenamento botrópico. No local da mordedura, há presença de edema, influxo de neutrófilos, hemorragia e mionecrose. Quanto aos efeitos sistêmicos, pequenos sangramentos podem ocorrer nos acidentes leves e moderados, sem repercussão hemodinâmica. São comuns a gengivorragia, hematúria microscópica, púrpuras (principalmente equimoses espontâneas pelo corpo) e sangramentos em feridas recentes. Menos frequentes são descritos hematúria macroscópica, hemoptise, epistaxe, sangramento conjuntival, hipermenorragia e hematêmese.

Fato intrigante é saber que os venenos que possuem intensa atividade coagulante, in vitro, promovem o prolongamento do tempo de coagulação em pacientes envenenados sem o aparecimento de quadros trombóticos. Os venenos ofídicos coagulantes, quando inoculados no tecido subcutâneo ou muscular, atingem a circulação sanguínea vagarosamente, de modo a produzir um consumo gradativo e contínuo de alguns fatores da coagulação, induzindo a incogulabilidade do sangue circulante de pacientes envenenados. Desta forma, o fibrinogênio é hidrolisado em fibrina intravascular e, pela ativação da fibrinólise, é rapidamente transformado

em produtos de degradação da fibrina. Assim, o consumo do fibrinogênio circulante é a causa do prolongamento do tempo, ou mesmo da incoagulabilidade, do sangue circulante dos pacientes envenenados. Além disto, os pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops* sp. (atualmente: *Bothriopsis* sp., *Bothropoides* sp., *Bothrops* sp. e *Rhinocerophis* sp.) também apresentam consumo de fibrinogênio e fatores X, V e VIII plasmáticos, em testes laboratoriais. A razão parece ser tanto do consumo direto do fibrinogênio pelo componente trombina-símile, como formação de trombina intravascular pelos componentes pró-coagulantes dos venenos botrópicos (MARKLAND, 1998; SANO-MARTINS; SANTORO, 2003).

A complicação sistêmica de maior gravidade nos acidentes botrópicos trata-se da Insuficiência Renal Aguda (IRA), geralmente secundária à necrose tubular aguda, à necrose cortical renal e, ocasionalmente, à glomerulonefrite. A IRA pode se instalar, além da ação direta do veneno, por desidratação, hipotensão arterial ou secundariamente a complicações em que o choque está presente. Admite-se também, que a formação de microtrombos, pelas ações coagulante e vasculotóxica, é capaz de produzir isquemia renal por obstrução da microcirculação (AMARAL et al., 1985; CASTRO et al., 2004).

Apesar de o soro antibotrópico ser eficaz na neutralização dos efeitos sistêmicos, particularmente das alterações da coagulação sanguínea, (CARDOSO et al., 1993) a experiência clínica mostra que esses efeitos locais são difíceis de ser neutralizados pelos antivenenos e por outros recursos terapêuticos complementares. Podem ocorrer complicações como infecções, o que dificulta ainda mais o manejo desse quadro. Nos casos mais graves, pode-se desencadear a síndrome compartimental, que requer fasciotomia (descompressão cirúrgica), procedimento perigoso que aumenta os riscos de infecção, prolonga o tempo de internação e imobilização do paciente (FRANÇA; MALAQUE, 2003). Tal fato sustenta a prática de amputação do

seguimento do membro afetado, um procedimento ainda presente na terapêutica atual. Trabalhos como o de Ribeiro e Jorge (1997) e Borges e colaboradores (1999) registram, respectivamente, a utilização da amputação em 0,7% dos casos de acidentes botrópicos, no Sudeste do país, e em 10,5% dos acidentes ofídicos, no Estado do Amazonas, fato este que demonstra a importância das complicações clínicas locais do acidente botrópico, no Norte do Brasil.

3.1.3 Fisiopatologia do envenenamento botrópico

3.1.3.1 Principais componentes do veneno botrópico com atividade tóxica

Os componentes protéicos ativos presentes nos venenos de serpentes, em geral, podem ser classificados como enzimáticos e não-enzimáticos. Apesar de sua complexa composição, as ações de maior toxicidade (proteolítica local, hemorrágica e nefrotóxica) provocadas pelo envenenamento botrópico estão ligadas aos seus componentes protéicos enzimáticos (CASTRO, 2006). Dentre os componentes enzimáticos podemos citar as fosfolipases A_2 (PLA_2), as fosfodiesterases, metaloproteases, serinoproteases, acetilcolinesterases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, dentre outras (TAN; SAIFUDDIN, 1990). De acordo com Neiva e colaboradores (2009), que estudaram o transcriptoma da glândula de *Bothrops atrox* Amazônica, os componentes majoritários expressos neste veneno são metaloproteinasas (61,6%), fosfolipases A_2 (14,6%) e serinoproteinasas (8,2%).

Principais Componentes Bioativos do Veneno Botrópico				
Protéicos		Não-protéicos		Peptídeos
Enzimáticos	Não Enzimáticos	Orgânicos	Inorgânicos	Citotóxicos; Miotóxicos; Desintegrinas; Potenciadores de Bradicinina; Natriuréticos.
Metaloproteases; Fosfolipases; Serinoproteases; Fosfoesterases; L-aminoácido oxidases; Acetilcolinesterase; Hialuronidasas; Catalases; Aminotransferases; Cininogenases; Ativadores de fator X.	Lectinas; Ativadores de Proteína C; Fatores de Crescimento de Nervos (GNF); Precusores de Peptídeos Bioativos.	Aminas Biogênicas; Carboidratos; Aminoácidos; Citratos; Nucleotídeos.	Cálcio; Cobre; Ferro; Potássio; Magnésio; Manganês; Sódio; Fósforo; Cobalto; Zinco.	

Quadro 1. Resumo da composição bioquímica do veneno botrópico: principais frações protéicas, não-protéicas e peptídicas identificadas no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

FONTE: Adaptado de CORREA-NETO, 2007.

Em geral, venenos ofídicos contêm proteínas compostas de um domínio catalítico e um ou vários domínios não-catalíticos. Metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMP) são enzimas de massa molecular entre 20 a 100 kDa, que se caracterizam por conter um domínio catalítico associado ou não a um domínio rico em cisteína e/ou desintegrina e/ou um domínio lectina tipo C. Sua classificação estrutural (PI, PII, PIII, PIV) depende da presença de domínios adicionais na região carboxil ao domínio metaloprotease. A classe PI possui apenas o domínio metaloprotease, enquanto a classe PII possui, além desse, um domínio desintegrina em sua estrutura. A classe PIII possui um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina-símile e outro domínio rico em cisteína. A classe PIV, além dos domínios citados, possui um domínio lectina em sua estrutura (BJARNASON; FOX, 1994).

Algumas metaloproteinases induzem hemorragia por afetar diretamente a maioria dos vasos sanguíneos capilares. Acredita-se que essas enzimas hemorrágicas clivam, de forma

altamente seletiva, ligações peptídicas chaves dos componentes da membrana basal, afetando assim a interação entre a membrana basal e células endoteliais. Eventualmente, lacunas (gaps) são formadas nas células endoteliais através da qual ocorre o extravasamento. Além de hemorragia, as SVMP induzem lesão muscular esquelética, mionecrose, o que parece ser secundário à isquemia, que se segue no tecido muscular como consequência de hemorragias e perfusão reduzida. A ruptura de microvasos por SVMP também prejudica a regeneração do músculo esquelético, sendo, portanto, responsável pela fibrose e perda de tecido permanente, após acidentes (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Estudos recentes têm mostrado que tanto metaloproteinases do tipo PII como a do tipo III são capazes de acionar as funções de leucócitos e de sinalização celular em vias inflamatórias, *in vitro*, e que domínios proteolíticos, por si só, podem induzir eventos inflamatórios, *in vivo*. Além disso, estudos sobre a caracterização das interações proteína-ligante têm evidenciado que integrinas presentes na superfície de membrana de neutrófilos e macrófagos são receptores importantes para metaloproteinases e seus domínios (TEIXEIRA et al., 2005). Uma nova abordagem associa uma região hiper-variável de domínio rico em cisteína de SVMP, que constitui uma potente interface de ligação proteína-proteína, à ativação do rolamento (“rolling”) de leucócitos na microcirculação, sugerindo também um importante papel dessas enzimas no estabelecimento do quadro inflamatório local (MENEZES et al., 2008).

As isoformas de fosfolipases A_2 (PLA₂), presentes em peçonhas ofídicas, são um dos principais componentes tóxicos devido à variedade de ações fisiológicas que promovem. A maioria das PLA₂ é classificada em dois grupos: Grupo I (Elapidae) e Grupo II (Viperidae) com base na modalidade de pares de pontes dissulfeto. As PLA₂ do Grupo II são divididas em dois subgrupos: formas [Asp⁴⁹]PLA₂ e formas [Lys⁴⁹]PLA₂ (OHNO, 2003).

Além da ação lipolítica intrínseca (catalisam a hidrólise da ligação éster 2-acil de 3-sn-fosfoglicerídeos com a exigência de Ca^{2+} , para produzir 3-sn-lisofosfoglicerides e ácidos graxos), algumas PLA_2 , de peçonhas ofídicas, atuam como anticoagulantes por hidrolisarem, de forma eficiente, superfícies de fosfolipídeos carregados negativamente. Já, outras hidrolisam fosfolipídeos de membranas plaquetárias e induzem agregação por liberação de ácido araquidônico e/ou fatores agregantes (KINI; EVANS, 1989). Porém, sua ação catalítica não parece ser a única propriedade de PLA_2 que justificam sua ação biológica. Ao observar as diferentes atividades farmacológicas de PLA_2 , in vitro e in vivo, Kini (2003) propôs a presença de um sítio de ligação específico, na molécula de PLA_2 , independente de sua ação catalítica, promovendo assim, uma nova discussão a respeito da interação com moléculas-alvo.

As PLA_2 do Grupo II possuem importante ação miotóxica, porém, seu mecanismo causador de dano celular ainda não está bem esclarecido. Essas toxinas parecem induzir a formação de “lesões deltas” seguidas por hipercontrações de miofilamentos, devido ao aumento do nível intracelular de íons de cálcio (MEBS; OWNBY, 1990). Gutiérrez e Lomonte (1995) sugeriram um modelo para este mecanismo: estas miotoxinas penetram a bicamada celular por uma interação hidrofóbica, mediada pela região citotóxica destas moléculas, diferente da região catalítica. Porém, não se pode descartar o evidente dano celular causado por sua propriedade de desestabilização da molécula, que potencializa a degradação enzimática de fosfolipídeos. Além da miotoxicidade, estas PLA_2 induzem, in vitro e in vivo, eventos inflamatórios e a liberação de importantes mediadores inflamatórios como LBT_4 , TXA_2 , e citocinas pró-inflamatórias (LOMONTE et al., 1993; CHAVES et al., 1998; ZULIANI et al., 2005a). As PLA_2 também são capazes de estimular a quimiotaxia de neutrófilos (GAMBERO et al., 2002, 2004), a degranulação de mastócitos (LANDUCCI et al., 1998) e a ativação de macrófagos, incluindo sua

atividade fagocitária e liberação de vários mediadores, como peróxido de hidrogênio (ZULIANI et al., 2005b).

As serinoproteases de venenos de serpentes (SVSP) são frequentemente associadas aos distúrbios hemostáticos, devido à sua atuação em componentes da cascata de coagulação sanguínea e do sistema fibrino(geno)lítico. Apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa, dependendo do número de glicosilações, pertencem a uma grande família de peptidases, que possuem estrutura e especificidade semelhante à tripsina, apesar de atuarem em substratos macromoleculares específicos (SERRANO; MAROUN, 2005). Em geral, interferem na homeostasia de duas formas: ou ativando especificamente componentes do sangue envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária; ou inibindo essas vias de degradação proteolítica (BRAUD et al., 2000). Desta forma as SVSP são classificadas em diversos grupos, de acordo com sua atividade: coagulante sobre o fibrinogênio; fibrino(geno)líticas; ativadoras do plasminogênio; ativadoras da protrombina; ativadoras do fator V e X, e inibidoras ou ativadoras da agregação plaquetária (MARKLAND, 1998) (Ver Figura 2).

3.1.3.2 Atividades biológicas do veneno de *Bothrops atrox*

De forma geral, pode-se observar que, além de agirem de uma maneira sinérgica, a grande maioria dos compostos, isolados do veneno de *Bothrops atrox*, concorre direta ou indiretamente para indução de quadro inflamatório agudo. Além do que foi citado anteriormente, França e Málaque (2003) ressaltam que a atividade coagulante desencadeia a formação de trombos na microvasculatura, com consequente hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual; e que a atividade hemorrágica, causada pelas hemorraginas (metaloproteinases com atividade hemorrágica), pode ampliar o quadro inflamatório, devido a sua atividade sobre fator de necrose tumoral (TNF) pré-formado, liberando a citocina ativa (TNF- α).

Citocinas parecem ter um papel importante na mediação inflamatória induzida por venenos botrópicos. Ao estudar a ação do veneno de *Bothrops asper*, no modelo de edema de pata de camundongo, Lomonte e colaboradores (1993) observaram um rápido aumento da concentração sérica de IL-6, com pico entre a terceira e a sexta hora. Porém, as concentrações de TNF- α e IL-1 α não foram obtidas, nos tempos estudados. Estudos clínicos demonstram não somente elevação da IL-6 sérica, mas também de IL-8 (atualmente CXCL-8) em pacientes vítimas de acidente botrópico (BARRAVIERA et al. 1995), com um pico de TNF- α após a décima segunda hora (ÁVILA-AGÜERO et al., 2001). O veneno de *Bothrops atrox* é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IFN- γ) e anti-inflamatória (IL-10), além de óxido nítrico (BARROS et al., 1998).

Escocard e colaboradores (2006) descreveram o papel de neutrófilos, infiltrados em tecidos injetados com veneno de *Bothrops atrox*, na produção de algumas citocinas, pela expressão de mRNA de IL-1 β e de IL-6, inclusive de óxido nítrico sintetase (iNOS). Núñez e colaboradores (2004) isolaram uma miotoxina I, do veneno de *B. atrox*, capaz de apresentar atividades fosfolipásica e anticoagulante, in vitro, e induzir mionecrose local, edema e resposta sistêmica de IL-6, in vivo. Nesse mesmo trabalho, utilizando o modelo farmacológico de afluxo local de células inflamatórias, os autores caracterizaram linfócitos, macrófagos e neutrófilos como as principais células presentes no líquido peritônio da inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. Estas células quando ativadas liberam diversas citocinas que são responsáveis por uma variedade de efeitos parácrinos e endócrinos. Dentre estas, IL-1 β , IL-6 e TNF- α desempenham papel crítico na produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, atuam no hipotálamo induzindo febre e agem no endotélio da medula óssea para liberar neutrófilos, que constituem a primeira população celular que atravessa as paredes dos vasos e penetram nos locais da inflamação. A IL-

6 possui papel importante na hematopoiese, participando de uma via de diferenciação que induz a geração de monócitos, neutrófilos e de outros leucócitos da linhagem mielóide. A IL-10 possui papel regulatório importante na resposta de fase aguda, graças a sua capacidade primária de suprimir a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α por macrófagos (FIORENTINO et al., 1991).

Kanashiro e colaboradores (2002) identificaram duas fosfolipases A_2 (BaPLA $_2$ I e BaPLA $_2$ III) do veneno de *Bothrops atrox* e as relacionaram com suas atividades biológicas. Ambas foram capazes, in vitro, de induzir a degranulação de mastócitos e, in vivo, de provocar a liberação de creatina quinase, edema e mionecrose típica de PLA $_2$ de venenos ofídicos, caracterizada pelo rápido rompimento da membrana plasmática, das células musculares esqueléticas.

Ao trabalhar com a fração de metaloproteinase P-III hemorrágica isolada do veneno de *Bothrops atrox*, Petretski e colaboradores (2000a) cogitaram a possibilidade de um mecanismo não-enzimático para o aumento da permeabilidade, provavelmente mediado por ligações distintas entre os domínios desintegrinas e/ou ricos em cisteína aos sítios específicos no endotélio vascular. Recentemente, Sanchez e colaboradores (2010) isolaram e descreveram o mecanismo hemorrágico de uma metaloproteinase tipo I do veneno de *B. atrox*, denominada atroxlysin-I que, além de clivar a fibronectina, outras proteínas de matriz extracelular (colágeno I e IV) e o fragmento CB3 do colágeno IV, é capaz de inibir a agregação plaquetária, induzida por colágeno e ADP.

Em 1937, Eagle diferenciou duas atividades coagulantes no veneno de *Bothrops atrox*: uma trombina-símile, que transforma diretamente o fibrinogênio em fibrina, e outra ativadora da protrombina. Posteriormente, Stocker e Barlow (1976) isolaram uma serinoprotease com atividade trombina-símile, denominada batroxobin, capaz de clivar o fibrinogênio sem ser afetado

pela presença de antitrombina e/ou heparina. Devido a estas propriedades específicas, a descoberta da batroxobin possibilitou o desenvolvimento de um produto eficaz na dosagem dos níveis séricos de fibrinogênio, além de originar um medicamento voltado para o tratamento de trombose venosa profunda e doenças vasculares periféricas oclusivas (BRAUD et al., 2000). Outros compostos com atividade trombina-símile também foram isolados do veneno de *Bothrops atrox* (PETRETSKI et al., 2000b).

Hofmann e Bon (1987a) isolaram, do veneno de *Bothrops atrox*, dois ativadores do Fator X da coagulação. Apesar desses ativadores apresentarem características funcionais similares, clivam o Fator X em duas posições distintas das comumente observadas, causadas por outros ativadores do Fator X. Os mesmos autores isolaram também uma metaloproteinase, de massa molecular 70kDa, que apresenta propriedade ativadora de protrombina (HOFMANN; BON, 1987b)

Porém, existem outras serinoproteases que possuem atividade múltipla na ativação do Sistema de Coagulação. A trombocitina é capaz de ativar os fatores V, VIII e XIII da coagulação, além de induzir a agregação plaquetária por secreção de ADP, contração e secreção plaquetária sem ocorrência da lise plaquetária (NIEWIAROWSKI et al., 1979; SANO-MARTINS; SANTORO, 2003). Além de sua ação sobre as plaquetas, estudos demonstraram também sua influência na liberação de PGI₂ e NO pelas células endoteliais (GLUSA et al., 1991).

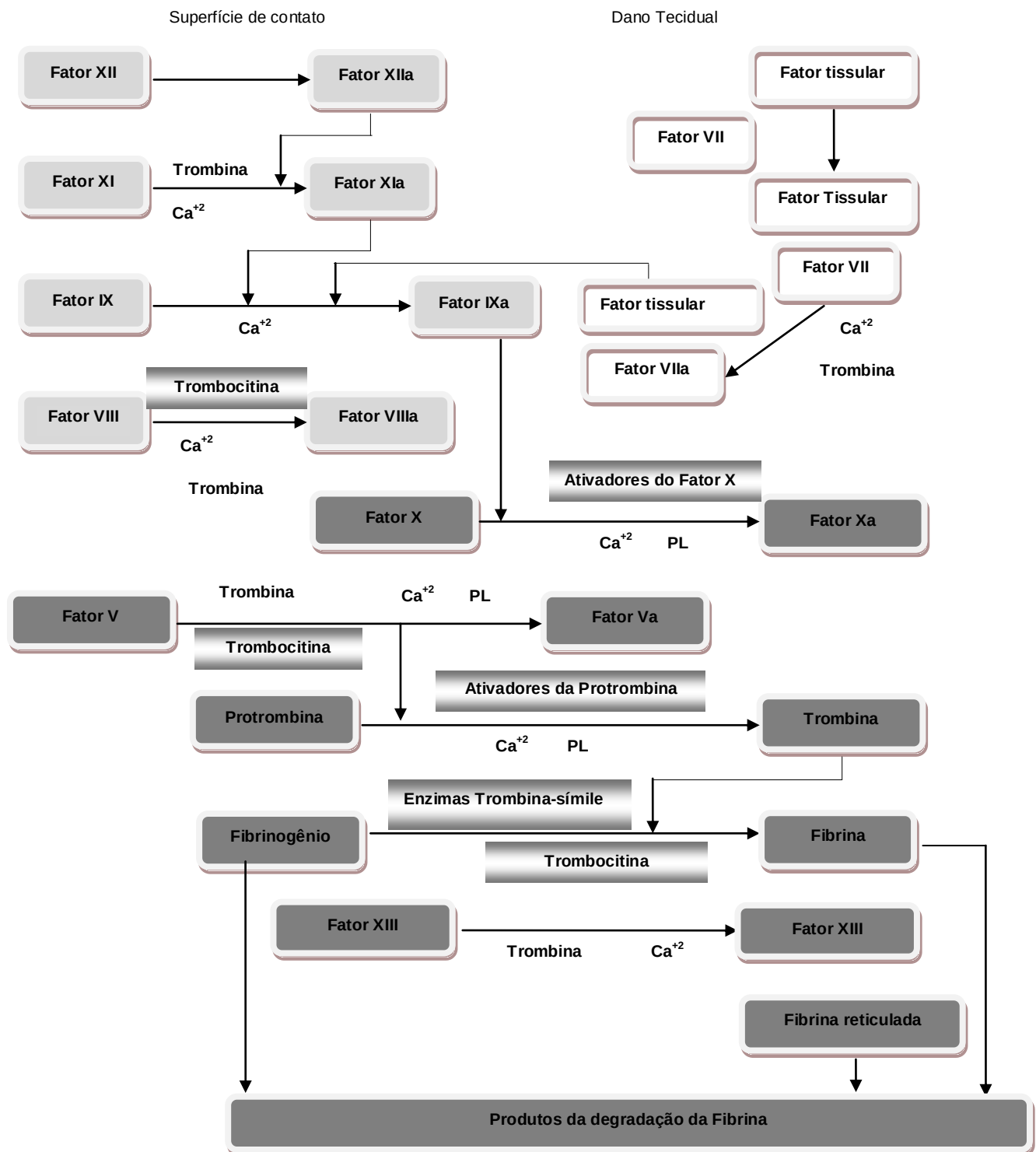


Figura 2- Visão simplificada da atividade de principais grupos de toxinas pró-coagulantes presentes em venenos botrópicos nas diversas etapas da coagulação sanguínea. PL= fosfolipídios. FONTE: Adaptado de SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L., 2003.

3.2 Metabólitos vegetais: relações entre ação anti-inflamatória e antiofídica

O tratamento de acidentes ofídicos por produtos naturais oriundos de plantas medicinais já despertou a atenção de vários pesquisadores (MARTZ, 1992; HOUGHTON; OSIBONGUN, 1993; BORGES et al., 1996; MORS et al, 2000; COSTA et al., 2008). Este interesse serviu para minimizar a falta de informações a respeito da eficácia química e da atividade farmacológica das plantas em questão.

As abordagens tendem a estabelecer um mecanismo de inibição molecular ao conjunto de ações induzidas especialmente pelos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* sp., as quais apresentam maior número de registros etnofarmacológicos sobre plantas antiofídicas (SOARES, 2005).

Trabalhos como o de Ticli e colaboradores (2005) abordam a função de um produto natural conhecido por sua atividade anti-inflamatória, o ácido rosmarínico, na neutralização de edema e miotoxicidade induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e por suas principais fosfolipases A_2 homólogas (bothropstoxinas I e II), reforçando a associação de domínios catalíticos aos sítios farmacóforos.

Assafim e colaboradores (2006) determinaram a ação inibitória da glycyrrhizina, uma saponina triterpenóide natural extraída das raízes de *Glycyrrhiza glabra* (Leguminosae), no combate aos efeitos hemostáticos anormais do veneno de *Bothropoides jararaca* (anteriormente *Bothrops jararaca*). Este componente é conhecido por sua ação anti-inflamatória e tem sua atividade, como inibidor da trombina, bem caracterizada (FRANCISCHETTI et al., 1997).

Gomes e colaboradores (2007) estudaram a neutralização de peçonhas ofídicas por uma fração rica em β -sitosterol e estigmasterol isolada do extrato de raízes de *Pluchea indica* Less.

(Asteraceae). A fração foi capaz não somente de antagonizar a neurotoxicidade, a cardiotoxicidade, as alterações respiratórias, a ação fosfolipásica e a letalidade, como demonstrou ser um importante fator na inibição das mudanças na peroxidação lipídica e na atividade da superóxido-dismutase induzidas pelos venenos estudados.

Mors e colaboradores (2000) e Soares e colaboradores (2005) listaram as principais classes de metabólitos isolados de plantas medicinais, que parecem influenciar tanto na resistência à letalidade de venenos, quanto nas atividades edematogênica, hemorrágica, fosfolipásica, miotóxica e desfibrinante desencadeadas no envenenamento ofídico. *Marsypianthes chamaedrys* destacou-se por possuir grupos de constituintes químicos que apresentam mecanismos de ação relacionados à inibição de processos inflamatórios, também comuns em outras plantas validadas para atividade antiofídica (ver Quadro 2).

Classe	Substância	Mecanismo(s) de ação	Fontes naturais (plantas utilizadas tradicionalmente no acidente ofídico)
Esteróide	Sitosterol	- Inibição in vitro de IL-6 e do fator de necrose tumoral (TNF-α), liberado por monócitos; - Diminuição dos níveis de IL-6 in vivo (BOUIC; LAMPRECHT, 1999).	<i>Achillea millefolium</i> ; <i>Aegle marmelos</i> ; <i>Aristolochia serpentaria</i> ; <i>Caesalpinia bonduc</i> ; <i>Calendula officinalis</i> ; <i>Cissampelos glaberrima</i> ; <i>Cocculus hirsutus</i> ; <i>Cynanchum paniculatum</i> ; <i>Eclipta prostrata</i> ; <i>Euphorbia hirta</i> ; <i>Gloriosa superba</i> ; <i>Ocimum basilicum</i> ; <i>Ophiorrhiza mungos</i> ; <i>Oldenlandia diffusa</i> ; <i>Pluchea indica</i> ; <i>Pothomorphe umbellata</i> ; <i>Prestonia coalita</i> ; <i>Serenoa repens</i> ; <i>Sophora subprostrata</i> ; <i>Taraxacum officinale</i> .
	Lupeol	- Redução da produção de prostaglandina E₂ por macrófagos (FERNANDEZ et al, 2001) - Supressão da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (DZUBAK et al, 2005).	<i>Aegle marmelos</i> ; <i>Centipeda minima</i> ; <i>Crataeva benthami</i> ; <i>Elephantopus scaber</i> ; <i>Hemidesmus indicus</i> ; <i>Phyllanthus emblica</i> ; <i>Sophora subprostrata</i> ; <i>Alstonia boonei</i> .
Terpenóide	Ácido ursólico	- Redução da permeabilidade vascular; - Inibição da liberação de histamina; - Supressão da lipooxigenase e ciclooxigenase; - Inibição da elastase; inibição do Sistema Complemento (C3-convertase) (LIU, 1995, para revisão); - Inibidor específico da síntese de prostaglandina catalizada por COX- 2 (RINGBOM et al., 1998).	<i>Chiococca alba</i> ; <i>Ehretia buxifolia</i> ; <i>Nerium oleander</i> ; <i>Oldenlandia diffusa</i> ; <i>Rabdosia amethystoides</i> ; <i>Thymus vulgaris</i> .
	α - e β -amirina	- Supressão da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (DZUBAK et al, 2005). - Inibição de agregação plaquetária induzidas por ADP, colágeno e ácido araquidônico (ARAGÃO, 2008).	<i>Chiococca alba</i> ; <i>Ehretia buxifolia</i> ; <i>Euphorbia hirta</i> ; <i>Alstonia boonei</i> .
Flavonóide	Rutina	- Inibição da atividade da lipoxigenase, ciclooxigenase e da fosfolipase A₂. - Inibição da síntese de lipooxigenase; - Inibição da produção de radicais livres por neutrófilos (SILVA et al, 2002).	<i>Achillea millefolium</i> ; <i>Euphorbia hirta</i> ; <i>Forsythia suspens</i> ; <i>Nerium oleander</i> ; <i>Ruta graveolens</i> .

Quadro 2 – Principais substâncias naturais, com atividade anti-inflamatória conhecida, presentes em *Marsypianthes chamaedrys* e comuns a outras plantas com atividade antiofídica confirmada cientificamente.

FONTE: baseado em MORS et al, 2000.

3.3 *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntz

3.3.1 Dados taxonômicos - Família Lamiaceae

A família Lamiaceae inclui aproximadamente 220 gêneros e cerca de 3500 a 4000 espécies. Com uma vasta distribuição, tem representantes cosmopolitas (*Salvia* sp. e *Scutellaria* sp), e é especialmente abundante na região mediterrânea. Cresce em vários habitats e altitudes: das regiões Árticas ao Himalaia, Sudeste da Ásia ao Havaí, Austrália, África e Américas. (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002).

A sistemática de classificação das espécies dessa família está baseada na inflorescência, sendo dividida em oito subfamílias: Ajugoideae, Chloanthoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Pogostemonoideae, Scutellarioideae, Teucrioideae e Viticoideae (RYDING, 2007). As suas plantas são ervas ou arbustos, raras vezes árvores pequenas chegando a 1,8 m como a *Hyptis arborea*, com vários tipos de pêlos, providos geralmente de glândulas epidérmicas pedunculadas com características essenciais, apresentando terpenóides. Possuem folhas opostas ou, algumas vezes, verticiladas (alternas), simples e com ausência de estípulas. As inflorescências são de vários tipos. Porém, a maioria delas apresenta-se em pequenas cimeiras na axila de brácteas ou folhas, formando um verticilastro e, quando reunidas, formando um tirso. As cimeiras são axilares, reduzidas a uma flor, e a inflorescência é essencialmente um racimo. Flores menores são bracteoladas, perfeitas ou algumas unissexuadas. O cálice é geralmente persistente (HARLEY, 2007).

Algumas espécies da família Lamiaceae são utilizadas como ervas medicinais, condimentos e na elaboração de perfumes sendo a existência desta prática secular, principalmente entre os povos mediterrâneos (CORRÊA, 1984). No entanto, a grande importância econômica da família Lamiaceae está na presença de óleos voláteis de alto valor comercial e de utilização

crescente nas indústrias de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), de cosméticos (perfumes e produtos de higiene) e farmacêutica (aromatizantes e preparações galênicas). Embora seja difícil de estimar, avalia-se que, para obtenção de óleos de espécies desta família, sejam cultivados mais de 500 mil hectares (LAWRENCE, 1992), destacando-se espécies de maior utilização e respectiva produção em toneladas/ano: *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Holmes. (8600), *Mentha piperita* L. (2367), *Mentha spicata* L.(880), *Lavandula intermédia* Emeric ex Liosel. (768), *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (563), *Mentha gracilis* Sole. (530), *Lavandula augustifolia* Mill. (462) e *Rosmarinus officinails* L. (295).

Segundo a literatura, vários tipos de iridóides e flavonóides glicosilados, triterpenóides, flavonas, esteróides (principalmente sitosteróis) e semiquinonas têm sido isolados das folhas de espécies da família Lamiaceae. Apesar dos ácidos rosmarínico e clorogênico serem marcadores quimiotaxonômicos dessa família, esses dois ácidos não têm sido isolados de algumas de suas espécies (PEDERSEN, 2000).

3.3.2 Dados taxonômicos - O gênero *Marsypianthes* sp.

O gênero *Marsypianthes* sp. é exclusivamente americano e possui em torno de seis espécies (*M. chamaedrys*, *M. montana*, *M. foliosa*, *M. arenosa*, *M. burchellii*, *M. hassleri*) que se distribuem na América Latina, desde o México, Guatemala e Porto Rico até Peru, Bolívia, Paraguai, Brasil e Noroeste da Argentina. A origem do nome se dá graças ao formato do lóbulo inferior das flores, que se assemelha a uma bolsa marsupial. A vegetação dominante é a selva subtropical que em muitas zonas deixa lugar a savanas gramíneas, com arbustos e árvores (MALLO; XIFREDA, 2004). A classificação taxonômica da espécie em estudo está representada no quadro a seguir:

Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Lamiales
Família	Lamiaceae
Subfamília	Nepetoideae
Tribo	Ocimeae
Subtribo	Hyptidinae
Gênero	<i>Marsypianthes</i>
Espécie	<i>M. chamaedrys</i>
Nome científico	<i>Marsypianthes chamaedrys</i>

Quadro 3- Classificação taxonômica de *Marsypianthes chamaedrys*.

FONTE: Adaptado de RYDING, 2007.

3.3.3 Dados Botânicos de *Marsypianthes chamaedrys*

Erva pegajosa, com 75 cm, galhos prostados ou eretos, fracas vilosidades, frequentemente com pelos glandulares. As folhas são ovaladas a ovalada-lanceolatas, ápice agudo, base cuneata a truncada ligeiramente atenuada ao longo do pecíolo e pecíolo de 3-9 mm. As flores nascem em cimeiras de 1,2 a 2 cm de diâmetros, pedúnculos 5 a 17 mm, a partir de brácteas similares a folhas, cálice-tubo em forma de funil, lobos agudos, largamente triangulares; corola azul-violeta ou lilás pálido, dotada de minúsculo lábio inferior. Cálice de frutificação com lobos convergentes, mas não unidos, que se tocam pelos vértices. Núculas com 2 a 3 mm de comprimento, superfície dorsal lisa, pálida, ventral de superfície côncava (HARLEY, 2007). Tem como sinonímia *Marsypianthes hyptoides* Benth e *Clinopodium chamaedrys* Vahl. (MALLO; XIFREDA, 2004).

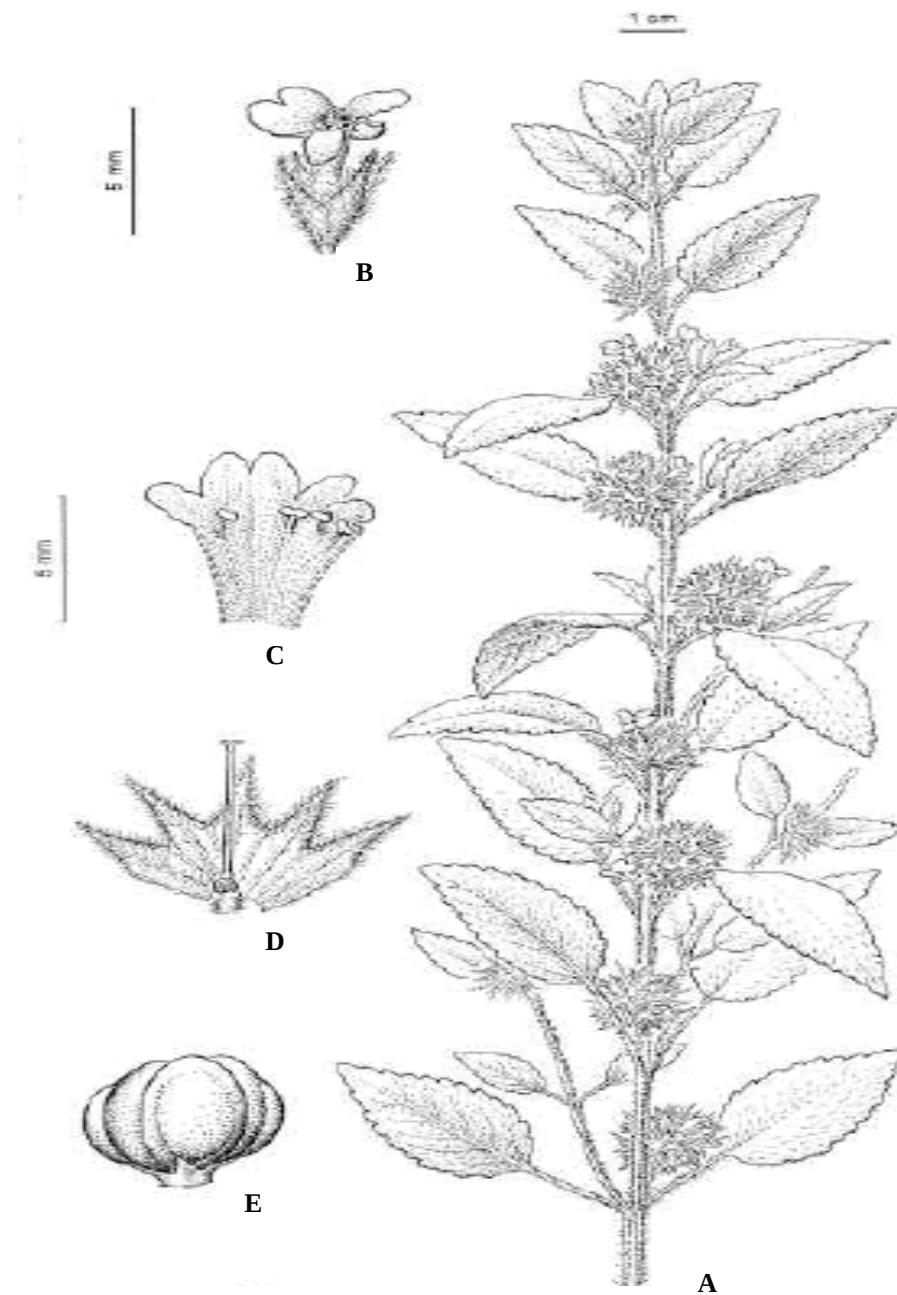


Figura 3- *Marsypianthes chamaedrys*. A: aspecto geral. B: flor. C: cálice aberto mostrando o gineceu. D: corola. E: núcula.

FONTE: Adaptado de MALLO; XIFREDA, 2004.

3.3.4 Dados etnofarmacológicos

Marsypianthes chamaedrys (Vahl) Kuntze é conhecida popularmente como boia-caá (do tupi, erva de cobra), hortelã-do-mato, mentrasto, bentônica-brava; sua principal utilização é como antídoto para picadas de serpentes (RUPPELT et al., 1990; PEREIRA et al., 1992; MENEZES et al., 1998a). No Norte do Brasil, é mais conhecida como paracari, o que pode causar certa confusão com outra planta da tribo Ocimeae, *Peltodon radicans* Pohl, que compartilha do mesmo nome popular e também é conhecida como antiofídica (PEREIRA; PEREIRA, 1989). Nessa região, o sumo das folhas e flores é utilizado tanto por via oral como aplicado no local da picada sob a forma de cataplasmas, aliviando os efeitos secundários da peçonha. Há registros da sua utilização como antidiarréico pelos Tikunas, do Noroeste do Estado do Amazonas (HEINRICH, 1992 *apud* MALLO; XIFREDA, 2004). No Nordeste do Brasil, é chamada também de meladinha e alfavaca-de-cheiro, sendo utilizada como estimulante e antiespasmódica (SOUSA; FELFILI, 2006). Agra e colaboradores (2008) registraram a utilização da infusão da planta inteira como carminativa e digestiva; além de preparação de xarope das folhas para tratamento de bronquites e tosses.

4A



4B



Figura 4 - A : Aspecto geral de *M. chamaedrys*. B: Detalhes das inflorescências.

Disponível em: <http://www.plantesrizieresguyane.cirad.fr>

3.3.5 Constituintes fitoquímicos

A primeira investigação química de *Marsypianthes chamaedrys* mostrou a presença de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol), triterpenos (incluindo os ácidos oleanólico, ursólico e tormêntico) e também o flavonóide rutina (MENEZES et al., 1998a). A partir do extrato hexânico de seus galhos, os mesmos autores identificaram a presença de um novo triterpeno, denominado chamaedrydiol, em mistura com castanopsol, epigermanidiol e lup-20(29)-ene-2 α ,3 β -diol, além da presença de outra mistura contendo α -amirina, β -amirina, lupeol e germanicol (MENEZES et al., 1998b). O trabalho de Ferreira (2001) foi pioneiro em demonstrar a presença de ácido protocatéquico e seu derivado aldeído protocatéquico, como também, ácido rosmarínico e seu derivado butil rosmarinato, em frações isoladas das partes aéreas de *M. chamaedrys*.

3.3.6 Atividades farmacológicas

Alguns aspectos de correlação entre atividade antiofídica e atividades farmacológicas relacionadas à propriedade anti-inflamatória (ação antinociceptiva, antiedematogênica e diminuição da permeabilidade vascular induzida por *Bothropoides jararaca* - anteriormente *Bothrops jararaca*) foram estudados em *Marsypianthes chamaedrys* com resultados positivos (PEREIRA; PEREIRA, 1989; RUPPELT et al., 1990; RUPPELT et al., 1991; PEREIRA et al., 1992). No entanto, muitos destes ensaios foram realizados em regime de *screening*, sendo utilizada apenas uma única dose e um único tipo de extrato para cada ensaio, além de uma única parte da planta (folhas), o que não permite uma correlação adequada de dose-efeito do ponto de vista farmacológico. Com base nestes dados, torna-se necessária uma investigação sistemática da propriedade anti-inflamatória de *Marsypianthes chamaedrys* frente a venenos ofídicos.

Ferreira (2001) demonstrou a alta capacidade antioxidante in vivo do extrato bruto e frações das partes aéreas de *Marsypianthes chamaedrys*. Sabe-se que muitos produtos naturais

são conhecidos por acumular ação antioxidante e anti-inflamatória graças a mecanismos de ação convergentes aos dois eventos, como inibição da peroxidação lipídica e supressão da produção de espécies reativas de oxigênio, por neutrófilos (SILVA, 2002; DZUBAK, 2005)

Castro e colaboradores (2003) trabalharam com diferentes extratos de *Marsypianthes chamaedrys* para estudar a inibição do sistema fibrinolítico induzido pelas peçonhas de oito diferentes serpentes distribuídas em dois grupos: (I) *Bothropoides insularis* (anteriormente *Bothrops insularis*), *Bothropoides neuwiedi* (anteriormente *Bothrops neuwiedi*), *Bothropoides jararaca* (anteriormente *Bothrops jararaca*), *Rhinocerothis alternatus* (anteriormente *Bothrops alternatus*), e (II) *Bothrops jararacussu*, *Bothrops atrox*, *Lachesis muta*, *Caudisona durissa* (anteriormente *Crotalus durissus terrificus*). Todos os extratos testados inibiram também essa atividade quando ativados pela trombina. A fração metanólica (MF) foi mais potente contra a fibrinocoagulação induzida pelo veneno de *Bothropoides jararaca* quando comparado com a fração aquosa (AF) ou extrato liofilizado (LE) apresentando, aparentemente, uma maior concentração de componentes ativos. A mesma potência em inibir a fibrinocoagulação foi observada em MF quando comparada a AF ou LE. As frações aquosa e metanólica de *Marsypianthes chamaedrys* também apresentaram atividade antiproteolítica, inibindo a atividade azocaseinolítica da peçonha de *Bothropoides jararaca* e da tripsina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de material botânico

Duas coletas de *Marsypianthes chamaedrys* foram realizadas: a primeira, no mês de novembro de 2008 e a segunda, em janeiro de 2009, meses correspondentes ao período final de seca dos rios da Região Amazônica (início do período da seca ocorre no final do mês de junho e termina em janeiro). O local escolhido trata-se de um terreno arenoso, correspondente a uma mata de vegetação secundária, localizado no município de Novo Airão (AM), a 180 km da capital Manaus (latitude S – 2,62139° e longitude W- 60,94417°). Uma exsicata da espécie está registrada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob identificação de número 228003.

4.2 Preparações dos extratos

Optou-se por trabalhar com dois modos de extração: contuso e extrato aquoso liofilizados. O primeiro foi escolhido com base em informações populares, de acordo com a prática dos próprios habitantes de Novo Airão (AM), que costumam espremer um punhado das partes aéreas de *Marsypianthes chamaedrys* e tomar o sumo ou colocar sobre a picada como cataplasma.

Imediatamente após a coleta, partes das inflorescências e folhas foram separadas, pesadas para obtenção de 100g de cada, higienizadas em água corrente, maceradas em graal de porcelana e filtradas em papel de filtro, sendo os sumos mantidos em recipiente fechado, protegido da luz e sob refrigeração para o devido congelamento e posterior liofilização, que resultou nos contusos: CFL (contuso de inflorescências) e CFO (contuso de folhas).

O material botânico restante foi seco ao ar livre, separado, pulverizado e pesado em balança eletrônica semi-analítica. As folhas e as inflorescências separadas desse material foram

submetidas à infusão em água destilada a 70°C, durante 30 minutos, o que resultaram em dois diferentes extratos: AFL (aquoso das inflorescências), AFO (aquoso das folhas). Estas preparações foram filtradas em papel de filtro, concentradas em aparelho de rotavapor MA 120 Marconi, liofilizadas em aparelho liofilizador Edwards, acoplado à bomba Edwards modelo E2W3 e ajustadas para obtenção de extratos em uma concentração de 2,5% p/v.

4.2.1 Determinação de voláteis

A determinação da concentração de compostos voláteis nos extratos foi realizada pelo método de Determinação da Perda por Dessecação de acordo com a Farmacopéia Brasileira. (1988). Após a liofilização, os extratos foram pesados exatamente a 1 g em pesa-filtro chato (previamente dessecado durante 30 minutos nas mesmas condições empregadas no ensaio). Os pesa-filtros contendo as amostras foram tampados e agitados brandamente para uniformização dos extratos ao fundo do recipiente e colocados na estufa com a tampa aberta por 2 h a 105 °C. Após este tempo os pesa-filtros foram levados a um dessecador até que atingissem temperatura ambiente para logo depois serem pesados. A operação foi feita até peso constante e o ensaio foi feito em triplicata. O resultado foi expresso em percentagem de perda por dessecação, diretamente proporcional aos compostos voláteis perdidos, dada pela equação: $[(P_u - P_s) / P_a] \times 100$; em que P_a = peso da amostra, P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dissecação e P_s = peso do pesa-filtro contendo a amostra após dessecação.

4.3 Material Biológico

4.3.1 Veneno e Soro antibotrópico

O veneno liofilizado de *Bothrops atrox*, utilizado nos experimentos in vivo e in vitro, foi fornecido pelo Núcleo de Animais Peçonhentos do Instituto de Medicina Tropical de Manaus

(NAP-IMTM). O veneno foi estocado a -20°C e para cada teste foi pesado e diluído no momento do uso.

O soro antibotrópico (SAB) utilizado nos experimentos in vivo e in vitro (potência do soro: 1 mL neutraliza 5 mg do veneno de *Bothrops jararaca*) foi produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP (Lote: 709179B), aliquotado e estocado a 4°C.

4.3.2 Seleção de voluntários

Devido à necessidade de utilização de plasma humano em alguns ensaios in vitro, o projeto desta dissertação foi, anteriormente, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sendo aprovado e possuindo código de registro CAAE – 0210.0.115.000-09. A coleta do sangue foi realizada por técnicos treinados do Laboratório de Bioquímica Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis.

Participaram da seleção ao todo onze indivíduos do sexo masculino, adultos saudáveis, que não tinham utilizado medicamentos nos dias anteriores, principalmente analgésicos e anti-inflamatórios, com seu devido consentimento registrado em um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

4.3.3. Animais

Nos experimentos foram utilizados camundongos não-isogênicos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, machos, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A manipulação desses animais seguiu as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFAM (009/2010-CEEA). No ensaio de *screening* toxicológico (teste Hipocrático), foram utilizadas fêmeas de camundongos. Os animais foram mantidos em ambiente com

fotoperíodo controlado (ciclo claro escuro 12/12 h), temperatura constante, água e ração *ad libitum*.

4.4 Testes farmacológicos

4.4.1 Ensaio preliminares de toxicidade

4.4.1.1 Citotoxicidade

A ação citotóxica dos contusos de *Marsypianthes chamaedrys* foi investigada pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT – [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium]), segundo Sieuwerts e colaboradores (1995). Células da linhagem Vero, ATCC-CCL 81, foram cultivadas no meio de cultura celular RPMI (CultiLab), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco BRL) e 100 unidades por mililitro (U/mL) de estreptomicina/penicilina/fungizona (Gibco BRL), sendo incubadas a 37°C por 24 h, 5% de CO₂ e 95% de O₂. Para manutenção das células foi utilizado somente 1,5% de SFB.

As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades (2x10⁴ células/100 µL/cavidade). Após 24 h de incubação, o meio de cultura da placa foi descartado por aspiração e, em seguida, foram adicionados 200µL de cada substância teste, diluídas em RPMI sem SFB nas seguintes concentrações: CFL ou CFO a 1000mg/mL; 100 mg/mL; 10 mg/mL e 1 mg/mL; ou DMSO (Merck _controle negativo).

As placas foram incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas, e após 2 h ou 24 h o meio de cultura da placa foi descartado por aspiração. Em seguida, foram adicionados 50 µL da solução do MTT (1,0 mg/mL em meio RPMI), em todos os poços das placas. Após incubação à 37°C por 4 horas, a solução foi removida de cada poço, cuidadosamente, sem

danificar as células e 100 µL de DMSO foram adicionados, em todos os poços, para solubilizar o MTT degradado em formazan. Em seguida, as placas foram agitadas, levemente, a temperatura ambiente, por 7 min, para que todo o formazan fosse solubilizado. Logo após, as placas foram levadas ao leitor tipo ELISA (Bio-Tek, ELx800) para avaliar a citotoxicidade dos extratos e para isso, foi usado o comprimento de onda de 540 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação ao controle branco, no qual foi adicionado apenas meio de cultura RPMI.

4.4.1.2 Testes Hipocráticos

A escolha deste teste para a metodologia foi feita pela necessidade de um “screening” farmacológico e pelos dados toxicológicos escassos referentes à *Marsypianthes chamaedrys*, seguindo metodologia descrita por Malone & Ribichaud (1962) e adaptada por Pires e colaboradores (2004).

Foram utilizados três grupos teste com quatro camundongos, para cada dose preconizada de 0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg dos contusos e extratos aquosos de folhas e inflorescências, e um grupo controle que recebeu o veículo (água). Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, pesando $25g \pm 2$. Após administração por via oral dos extratos brutos e da água, os animais foram observados no tempo de 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h e diariamente até o 14º dia, com o objetivo de quantificar os efeitos destes extratos sobre os parâmetros:

- a) estado de consciência e disposição (aparência geral, frêmito vocal, irritabilidade);
- b) coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, marcha, reflexo de endireitamento);
- c) tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia);

- d) reflexos (auricular corneal);
- e) atividade do Sistema Nervoso Central (tremores, convulsões, estimulações, sedação, hipnose, anestesia);
- f) atividade do Sistema Nervoso Autônomo (lacrimação, ptose, piloereção, hipotermia, respiração) e
- g) ingesta hídrica e alimentar, assim como produção de excretas.

Estes eventos foram registrados em tabela (Anexo B), classificados de acordo com sua intensidade, e as doses utilizadas serviram como parâmetro na observação de dose-efeito de outros ensaios realizados.

4.4.2 Atividades na coagulação

Para estes testes foram utilizados plasma humano, devidamente coletados em tubos com o anticoagulante, citrato de sódio, e centrifugados a 2.500 rpm, por 10 minutos. A determinação do tempo de coagulação foi realizada com auxílio do aparelho Coatron M1[®] (TECO Medical Instruments) e, para cada amostra a ser testada, foram utilizados 50 µL do plasma pobre em plaquetas (PPP), sobrenadante obtido na centrifugação dos tubos com plasma, previamente incubado a 37°C.

4.4.2.1 Atividade direta na coagulação induzida por veneno de *Bothrops atrox*

Inicialmente para a realização deste teste foi determinada a dose mínima coagulante do veneno (DMC). Para tal foi necessária a utilização de um *pool* de plasma, obtido de três voluntários, sobre o qual foram testadas cinco diluições 1:1 v/v de uma solução de veneno a 1mg/mL em solução salina (0,9%). A DMC equivale à concentração de veneno capaz de induzir

a coagulação do plasma no tempo médio de 60 segundos (GENÉ et al., 1989), sendo este valor tido como controle branco.

Para verificar a ação dos extratos sobre o plasma, 10 µL da solução de veneno equivalente à DMC foram adicionados a cada 10 µL das diferentes soluções de extratos diluídos em solução salina (0,9%) e incubados por 15 minutos, a temperatura de 37 °C. As soluções dos extratos foram utilizadas nas concentrações de 0,625; 1,25 e 2,5 mg/ml. O ensaio de coagulação foi iniciado após adição de 10 µL de cada uma dessas soluções (veneno e extrato) em 50 µL de plasma previamente incubado a 37°C. O resultado foi expresso em percentagem desta atividade, utilizando-se a fórmula:

$$\% = ((T_{DMC} - T_a) \times 100) / T_{DMC} ,$$

na qual T_{DMC} é o tempo de coagulação (s) encontrado na dose mínima coagulante do veneno e T_a é o tempo de coagulação das amostras (s). Os resultados em algarismos negativos representam a inibição da atividade, ou seja, extratos que possuem provável atividade anticoagulante.

4.4.2.2 Atividade indireta na coagulação

As determinações do tempo de ativação de protrombina (TAP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) são de particular importância no diagnóstico de anormalidades hemostáticas e na monitorização de terapêutica anticoagulante, inclusive no acompanhamento clínico de pacientes acometidos por acidente botrópico. Na execução desses testes in vitro, foram criadas, no tubo de reação, as condições para ativação preferencial das vias ditas extrínseca (avaliada pelo TAP) e intrínseca (avaliada pelo TTPA), divisão puramente didática do sistema de coagulação por uma necessidade de facilitar a compreensão da sua fisiologia (CARLOS; FREITAS, 2007). O objetivo deste ensaio foi verificar as propriedades

intrínsecas dos extratos de *Marsypianthes chamaedrys* na cascata de coagulação, portanto o veneno de *Bothrops atrox* não foi utilizado nestes testes.

Os ensaios foram realizados utilizando-se kits de reagentes Hemostasis[®] (Labtest); em metodologia adaptada de Yuk e colaboradores (2000). O PPP foi incubado com cada extrato diluído em DMSO (Merck) a 40% nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg/mL. A coagulação foi estimulada pela adição de CaCl₂ (20 mmol/mL), e o tempo de coagulação foi expresso em segundos. A atividade anticoagulante representa a percentagem de inibição das amostras em relação ao teste branco (PPP), sendo mensurada pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (Ta/Tb) \times 100,$$

na qual o *Ta* é o tempo de coagulação da amostra em segundos e o *Tb* é o tempo de coagulação do teste branco.

4.4.3 Inibição da atividade da Fosfolipase A₂ do veneno de *Bothrops atrox*

Para avaliar esta atividade foi utilizado o método descrito por Gutiérrez e colaboradores, em 1988. A atividade hemolítica in vitro (fosfolipásica) é avaliada pela presença da enzima fosfolipase A₂ do veneno, que atua sobre a lecitina (substrato) convertendo-a em lisolecitina. A lisolecitina age sobre a membrana das hemácias promovendo a lise. Cem microlitros da solução de veneno de *Bothrops atrox*, a 5 mg/mL, foram incubados com 100 µL de cada extrato, nas concentrações de 30 ou 70 mg/mL, ou com 100 µL de salina (controle), ou com 100 µL do soro antibotrópico (SAB), por 30 minutos, a 37 °C. Dez microlitros de cada solução foram aplicados nos poços sobre as placas de vidro previamente cobertas com a mistura de agarose (0,8%), contendo hemácias de carneiro (1%) e gema de ovo a 1% como fonte de lecitina. As placas foram

incubadas, a 35°C, por 20 horas. Após a incubação, foi realizada a medida, em mm², dos halos formados pelo veneno não-bloqueado pelos extratos ou não-neutralizado, pelo SAB.

O experimento foi realizado em duplicata. A atividade inibitória enzimática foi obtida em percentagem pela da fórmula:

$$\% = ((M_v - M_a) \times 100) / M_v ,$$

na qual M_v é a média (mm²) da medida dos halos do veneno e M_a é a média (mm²) da medida dos halos das amostras.

4.4.4 Atividade anti-inflamatória frente ao veneno de *Bothrops atrox*

4.4.4.1 Peritonite induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*

Este modelo foi escolhido porque permite qualificar e quantificar o fluido extravasado, o acúmulo de células e a produção de mediadores químicos.

A reação de peritonite para contagem de células foi induzida em grupos contendo seis camundongos, machos e pesando 25g ± 2, pela injeção intraperitoneal do veneno de *Bothrops atrox* na dose de 0,5 µg/animal, capaz de induzir a migração celular sem causar hemorragia local significativa (SOUSA, 2006). Os tratamentos e as vias de administração utilizados para os animais de cada grupo foram os seguintes: extratos CFL e CFO por via oral nas doses de 0,1; 0,3 e 0,6 mg/kg; grupo controle-água, por via oral; grupo controle SAB, via plexo venoso oftálmico na dose de 100 µL/animal; grupo controle dexametasona (Novofarma 4mg/mL, L: 1170077), pela via intraperitoneal, na dose 100 µL/animal. Os grupos-teste e o grupo-controle-água foram tratados 60 minutos antes da administração do veneno. O que recebeu SAB foi tratado

imediatamente após receber o veneno e o gupo-dexametasona recebeu tratamento 15 minutos antes da aplicação do veneno. Os tratamentos dos grupos, para este teste, foram realizados em tempos diferentes levando-se em consideração a farmacocinética relacionada à forma de administração e absorção de cada droga utilizada.

Após quatro horas, os animais foram mortos por deslocamento cervical. O exudato peritoneal foi coletado com uma pipeta Pauster plástica através de laparoscopia abdominal. Para facilitar a coleta, todos os animais receberam uma injeção de 2,0 mL de PBS heparinizado (10 UI/ml) e o abdômen de cada animal foi massageado para soltar as células aderidas. Uma amostra do lavado peritoneal foi diluída 1:20, em líquido de Turk (0,2% de cristal violeta em 30% de ácido acético) e as células foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio OLYMPUS®, CBA. Os resultados foram expressos em número total de células por cavidade peritoneal.



Figura 5– Coleta do líquido peritoneal

Este ensaio foi repetido, utilizando-se nos grupos-teste dos extratos CFL ou CFO, a dose que apresentou a melhor resposta inibitória (0,6 mg/Kg). Grupos-teste e grupos-controle água e SAB (n = 5) foram separados para a observação dos tratamentos realizados em diferentes

horários, com o objetivo de verificar a eficácia de cada extrato ou do SAB, após a indução da inflamação pelo veneno. Quatro grupos (extratos CFO ou CFL 0,6 mg/kg p.o.; controle água p.o. e controle SAB 100 µL/animal i.v.) foram tratados logo após a injeção do veneno, i.p., na dose de 0,5µg/animal. Outros quatro grupos foram tratados, nas mesmas doses, duas horas após a aplicação do veneno e os últimos quatro grupos foram tratados, quatro horas após a aplicação do veneno. Quatro horas após a aplicação do tratamento, os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical. Os procedimentos para a coleta do exudato peritonial e contagem de células foram semelhantes aos descritos anteriormente. Parte do exudato foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm, aliquotado e conservado a - 80°C para utilização em ensaios de dosagens de citocinas.

4.4.4.2 Inibição da liberação de citocinas

Amostras dos exudatos peritoniais obtidas no ensaio de peritonite (vide item 4.4.4.1), induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, foram utilizadas para dosagens de citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α pelo método ELISA *sandwich*. Neste método, foram utilizados anticorpos monoclonais de captura (anticorpos primários), anticorpos monoclonais de detecção (anticorpos secundários), a enzima estreptavidina-peroxidase (SAv-HRP), solução cromógena de tetrametilbenzidina (TMB) e o substrato da peroxidase, o peróxido de hidrogênio. Os ensaios foram feitos de acordo com as instruções do fabricante ELISA Mouse BD OptEIA[®] Kits (BD Biosciences) como descrito a seguir: para sensibilização das placas de ELISA (poços de fundo chato), em cada poço foram adicionados 100 µL de anticorpo primário (anti-IL-6 ou anti-IL-10 ou anti-TNF- α) diluído 1:250 em tampão de cobertura (Na₂CO₃ 0,1M; pH 9,5). As placas foram incubadas a 4°C e, após 20 h, foram submetidas a três lavagens em aparelho específico (ASYS[®]). Logo após, foram adicionados 200 µL de diluente de ensaio (solução PBS e soro bovino fetal a 1:10), em cada

poço, e as placas foram incubadas, por 1h, em temperatura ambiente (25 °C). Após as três lavagens das placas, foram adicionados, nos poços correspondentes, 50 µL de cada exudato peritoneal, 50 µL da solução de diluente de ensaio (branco) ou 50 µL de cada solução da curva padrão da citocina a ser pesquisada (1.000 pg/ml; 500pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml; 31,3 pg/ml; 15,6 pg/ml; 7,8 pg/ml e 3,9 pg/ml). Duas horas após a incubação, em temperatura ambiente, as placas foram lavadas cinco vezes e, então, foram adicionados, em cada poço, 44µL de solução de anticorpo secundário e diluente de ensaio 1:250. As placas foram novamente incubadas, por 1h, em temperatura ambiente e lavadas cinco vezes. Em seguida, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de enzima SAV-HRP (1:250 em diluente de ensaio). Trinta minutos após, as placas foram lavadas sete vezes e, após lavagens, adicionados 100 µL da solução cromógena TMB na presença do substrato, o peróxido de hidrogênio. As placas foram incubadas no escuro, por 30 minutos. O bloqueio das reações foi realizado pela adição, em cada poço, de 50 µL de H₂OSO₄, 2N. As leituras foram feitas 15 minutos após, no aparelho ELISA ASYS[®], no comprimento de onda de 450 nm e as concentrações de citocinas expressas em pg/mL.

4.4.4.3 Aumento da permeabilidade vascular

A grande maioria dos modelos utilizados para avaliar este parâmetro baseia-se na medida da quantidade de proteínas extravasadas graças ao aumento de permeabilidade que ocorre durante a “retração” de células endoteliais no momento da inflamação (YAMAKAWA et al, 1976). Neste ensaio, o azul de Evans é utilizado pela sua propriedade de ligar-se às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina.

A verificação da cinética do aumento da permeabilidade vascular, induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, foi realizada por ensaio somente com grupos-controle-água (n= 5). Após a

injeção intravenosa (plexo oftálmico) de 100µL de azul de Evans (solução 5% em salina), foram aplicados, na região dorsal previamente depilada de cada camundongo, 50 µL do veneno i.d., na dose de 6,0 µg/animal, equivalente a cinco doses mínimas edematogênicas (BORGES et al., 1996). Cada grupo foi sacrificado, por deslocamento cervical, em diferentes tempos (1h, 2h, 3h, 4h e 6h). Logo após, a pele do dorso de cada animal foi separada do tecido muscular subjacente, e a área corada, correspondente ao local da injeção do veneno, foi removida com auxílio de um cortador de couro (diâmetro 12 mm). Desta forma, foi obtido um pedaço de pele no formato de disco, para cada animal. Cada disco de pele foi cortado em pequenos fragmentos, mergulhados em tubos contendo quatro mL de formamida P.A. e mantidos a 37°C, por 24h, para extração do corante. Logo após, os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm, durante 30 minutos. A quantidade do azul de Evans, presente no sobrenadante, foi estimada colorimetricamente, no comprimento de onda de 600 nm. A leitura da absorbância interpolada em curva padrão, de Azul de Evans diluído em formamida, forneceu a quantidade de corante extravasado e foi tomado como índice do extravasamento protéico.

Com base nos resultados obtidos na cinética, o ensaio foi repetido com os grupos-teste e os animais foram sacrificados quatro horas após a injeção do veneno. Grupos de seis camundongos machos, previamente depilados no dorso e pesando 25 ± 2 g, foram tratados p.o. com água (controle negativo) ou com os extratos CFO ou CFL em diferentes doses (0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg; 0,9 mg/kg), 1h antes da aplicação do veneno. O grupo que recebeu SAB (100µL i.v., controle positivo) foi tratado imediatamente após a aplicação do veneno e corante, de acordo com a farmacocinética de absorção de cada via.

6A



6B



Figura 6— A) Animal logo após a injeção do corante Azul de Evans; B) Fragmentos de tecido animal após 24 h diluído em formamida.

4.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de variância a 5% de probabilidade (ANOVA), com o auxílio do programa GraphPad Prism[®]. O teste de Turkey (comparação múltipla das médias) foi utilizado como pós-teste para determinação da significância ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos em gráficos e tabelas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos preliminares de toxicidade

5.1.1 Citotoxicidade

Todos os extratos testados não apresentaram atividade citotóxica, mesmo quando utilizada a concentração considerada alta para testes com extratos botânicos (1000 mg/mL). Curiosamente, após 2 h de contato com extrato, todos os grupos testes, com exceção a CFO 100 mg/mL, apresentaram percentagem de viabilidade celular superior ao branco.

Tabela 1 - Percentagem de viabilidade celular comparado ao controle branco (RPMI) nos dois horários testados (2 h e 24 h). DMSO = controle negativo; CFL = Contuso de inflorescências; CFO= Contuso de folhas.

Amostra/ Extrato	% Viabilidade Celular	
	2 h	24 h
DMSO	5,18 %	9,09 %
CFL 1 mg/mL	106,18 %	97,21 %
CFL 10 mg/mL	105,75 %	97,87 %
CFL 100mg/mL	101,48 %	98,25 %
CFL 1000mg/mL	101,52 %	97,94 %
CFO 1 mg/mL	102,28 %	98,80 %
CFO 10 mg/mL	105,11 %	97,50 %
CFO 100 mg/mL	97,29 %	98,78 %
CFO 1000 mg/mL	106,91 %	97,94 %

5.1.2 Testes hipocráticos

O *screening* hipocrático é um ensaio bastante útil e comumente usado na triagem preliminar de plantas para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas. Todos os extratos testados (CFL, CFO, AFL, AFO) não apresentaram indícios de atividade analgésica, estimulante ou depressora do Sistema Nervoso Central e Autônomo e estas características não foram alteradas por dose ou tempo após administração dos extratos.

O único efeito observado, durante todo experimento, foi o comportamento estereotipado (*climb behavior*: perdurar-se na grade e girar repetidamente) apresentado durante a terceira e quarta hora de observação, pelos grupos tratados com AFL (aquoso de inflorescências), na dose intermediária (0,3 mg/mL). Tal resultado evidencia as influências do tipo de extração e do material botânico utilizado para a determinação das atividades farmacológicas de *Marsypianthes chamaedrys*, além de efeitos específicos da dose, como observado para a dose de 0,3 mg/mL.

5.2 Atividades na coagulação

5.2.1 Atividade direta na coagulação induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*

Todos os extratos apresentaram alta atividade anticoagulante frente ao veneno de *Bothrops atrox*, destacando-se a ação de CFO, que aumentou o tempo de coagulação em até 3,21 vezes. Tal atividade demonstrou ser dose-dependente para todos os extratos (Figura 8) e estar relacionada com a forma de obtenção.

Dentre os venenos de seu gênero, o de *Bothrops atrox* possui a maior atividade promotora da coagulação *in vitro* (FURTADO et al., 1991), classificados como ativadores do tipo trombina-símile. Clinicamente, estas características desencadeiam a formação de trombos na microvasculatura, com consequente hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual (FRANÇA E MÁLAQUE, 2003). Portanto, substâncias capazes de inibir a atividade de toxinas

trombina-símile possuem importante alvo farmacológico para o tratamento dos efeitos locais e sistêmicos do acidente botrópico.

Tabela 2 – Percentagem de atividade coagulante e tempo de coagulação direta (média e desvio padrão em segundos) do veneno de *Bothrops atrox* (0,5 mg/mL) inibida pelos extratos de *Marsypianthes chamaedrys*. Os valores negativos expressam a inibição da atividade coagulante, do veneno de *Bothrops atrox*, pelos extratos (atividade anticoagulante).

Ensaio	Extratos	mg/mL		
		2.5	1.25	0.625
Coagulação Direta	CFL	- 109.49 % 128.57 ± 6.0 s	- 87.75 % 115.83 ± 6.5 s	-68.00 % 103.10 ± 13.5 s
	CFO	- 221.38 % 197.23 ± 2.6 s	-97.71 % 121.33 ±15.2 s	-79.84 % 110.37 ± 15.4 s
	AFL	- 65.06 % 101.3 ± 4.0 s	- 59.04 % 97.60 ± 1,3 s	- 30.14 % 79.87 ± 3.1 s
	AFO	- 108.03 % 127.67 ± 7.3 s	- 95.43 % 119.93 ±12.6 s	- 58.11 % 97.03 ± 3.9 s

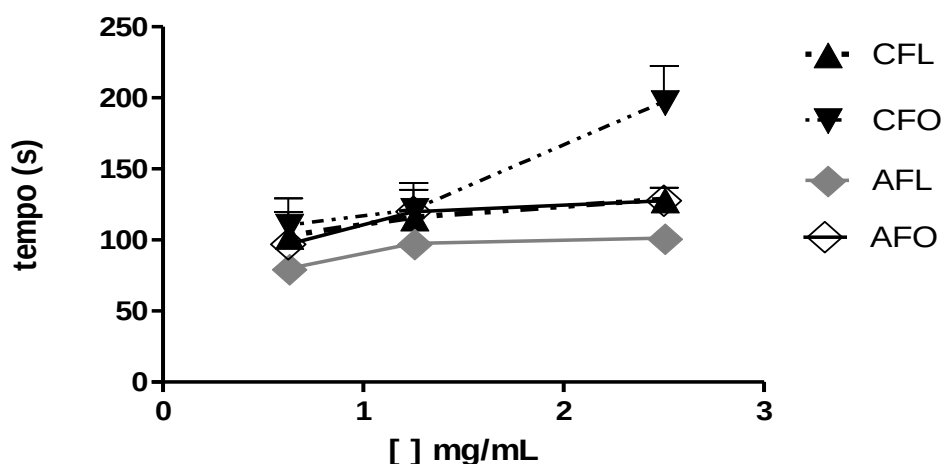


Figura 7 – Atividade anticoagulante direta de *Marsypianthes chamaedrys* frente ao veneno de *Bothrops atrox* (0,5 mg/mL). Os pontos representam a diferença no tempo de coagulação (s) de cada extrato nas concentrações testadas (0,625 mg/mL; 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL) em relação à DMC. CFL = contuso de inflorescências; CFO = contuso de folhas; AFL = extrato aquoso de inflorescências; AFO = extrato aquoso de folhas.

5.2.2 Atividade indireta na coagulação

A atividade anticoagulante dos extratos foi confirmada pelos testes de tempo de protrombina (TAP) e tempo de protrombina parcialmente ativada (TTPa). No ensaio de TTPa, além das concentrações de 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL, foram testadas também as concentrações de 5 e 10 mg/mL de cada extrato, porém estas doses retardaram a coagulação de tal forma que superaram a capacidade de aferição de tempo do equipamento (Tabela 3). Todos os extratos apresentaram atividade anticoagulante no ensaio de TTPa. No ensaio de TAP, somente os extratos na forma de contuso apresentaram atividade anticoagulante significativa, com obtenção da resposta dose-dependente. A atividade do contuso de folhas foi a mais potente em ambos os ensaios.

A maior atividade encontrada no ensaio de TTPa pode relacionar-se a uma afinidade de componentes químicos presentes tanto nas folhas como nas inflorescências, à via intrínseca da cascata de coagulação (Fatores VIII, IX, XI XII). As principais proteínas ativadoras da coagulação, presentes no veneno de *Bothrops atrox*, têm ação essencialmente na via comum da cascata (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003), o que pode indicar uma ação dos extratos tanto na inibição da trombina-símile, do veneno de *B. atrox*, quanto na inibição da trombina endógena (Figura 2).

Tabela 3 – Percentagem da ação anticoagulante e média±desvpad de tempo (s) de coagulação de *Marsypianthes chamaedrys* nos testes de TAP e TTPa. O retardo no tempo de coagulação é expresso em algarismos negativos. O símbolo (>>) significa que a contagem do tempo ultrapassou o limite do aparelho e (-), ausência de atividade anticoagulante.

Ensaio	Extratos	mg/mL				
		10	5	2.5	1.25	0.625
TAP	CFL	- 54.20 % 26.93 ± 0.8 s	- 13.81 % 20.60 ± 0.1 s	-10.50 % 20.0 ± 0.1 s	4.42 % 17.3± 0.2 s	–
	CFO	- 153.24 % 44.23 ± 16.6 s	- 13.08% 20.47 ± 1.1 s	- 1.66% 18.40 ± 0.4 s	5.71% 17.07 ± 0.6 s	–
	AFL	4.01 % 16.77 ± 0.46 s	4.42 % 17.30 ± 0.46 s	6.45 % 16.93 ± 0.35 s	6.63 % 16.90 ± 0.70 s	–
	AFO	-13.93 % 19.9 ± 0.7 s	1.66 % 17.80 ± 0 s	7.00 % 16.83 ± 0.2 s	8.47 % 17.57 ± 1.7 s	–
TTPa	CFL	>>	>>	- 295.81 % 144.87 ± 4.7 s	- 97.72 % 72.37 ± 3.6 s	- 28.01 % 69.77 ± 1.6 s
	CFO	>>	>>	- 296.17 % 145.0 ± 33.6 s	- 105.01 % 75.07 ± 1.1 s	- 10.40 % 60.17 ± 3.5 s
	AFL	>>	>>	- 296.81 % 145.23 ± 7.4 s	- 39.25 % 50.97 ± 2.9 s	- 6.30 % 57.93 ± 2.9 s
	AFO	>>	>>	- 107.01 % 75.77 ± 10.7 s	- 70.86 % 62.53 ± 8.4 s	- 13.39 % 61.50 ± 25.4 s

Os resultados encontrados apontam novamente para a importância do modo de obtenção dos extratos utilizados na avaliação da atividade biológica. Os extratos obtidos por contuso apresentaram maior concentração de compostos voláteis do que os obtidos por infusão (Tabela 4). Provavelmente, estes componentes presentes no contuso são os responsáveis pela atividade anticoagulante no TAP, que se relaciona a uma maior afinidade à via extrínseca da cascata de coagulação (Fatores II, V, VII, X).

Tabela 4 – Rendimento médio dos extratos e teor de voláteis em extratos liofilizados. * = Peso de cada alíquota fresca contida em gral. ** = Método de perda por dessecação, segundo Farmacopéia Brasileira, 1988.

Extrato	Peso amostra	Rendimento	Teor de Voláteis**
CFL	100 g*	2,29%	13,35 %
CFO	100 g*	7,44%	9,57 %
AFL	58,01g	5,43%	8,39 %
AFO	238,37g	3,78%	8,82 %

Castro e colaboradores (2003) demonstraram a atividade antifibrinogenolítica do extrato aquoso de *Marsypianthes chamaedrys* e de sua fração metanólica para o veneno de *Bothrops jararaca* (atualmente *Bothropoides jararaca*) e para trombina, sugerindo que o efeito observado poderia resultar de uma ação direta em serinoproteases similares à trombina e mesmo à própria trombina. A provável ação dos extratos de *Marsypianthes chamaedrys* na inibição mútua de toxinas e fatores ativadores da cascata de coagulação torna seu efeito ainda mais significativo.

5.3 Inibição da atividade da Fosfolipase A₂ do veneno de *Bothrops atrox*

Todos os extratos testados apresentaram atividade antifosfolipásica A₂ no modelo testado. Porém, apenas os extratos obtidos por contuso foram mais eficazes que o soro antibotrópico (SAB). Quando foi comparada a atividade biológica com o material botânico, observou-se que os extratos de inflorescências, AFL e CFL, apresentaram melhores resultados, sendo que o contuso (CFL) obteve um percentual de inibição 20,9 % superior a do SAB (1:1, v/v) (Figura 8).

Os resultados obtidos tornam-se ainda mais expressivos quando se compara a proporção utilizada de veneno: extrato para outras plantas com atividade antiofídica. Para maior concentração de extratos utilizada (70 mg/mL), foi utilizada uma proporção de 1:14 (veneno/extrato, p/p) na concentração de veneno (5mg/mL) e obteve-se uma inibição de até 75,79% pelo CFL. Neste mesmo modelo, *Mikania glomerata* inibiu em 30% a atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararacussu* a uma proporção de 1:200 (p/p) (MAIORANO et al, 2005).

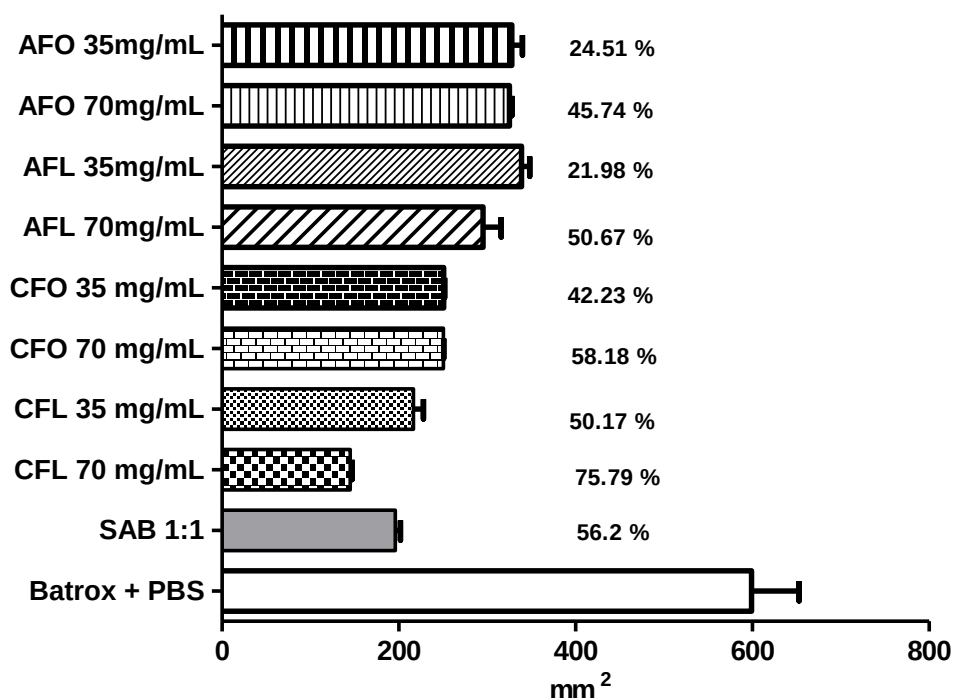


Figura 8 – Inibição da atividade antifosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox* (5mg/mL) pelos extratos de *Marsypianthes chamaedrys*. As barras representam a média±desvpad da extensão dos halos (mm²) formados pela ação do veneno. Ao lado, os valores de percentagem de inibição comparado ao controle negativo veneno diluído em PBS (*Batrox* + PBS).; SAB 1:1= controle positivo SAB (v/v); CFL = contuso de inflorescências; CFO = contuso de folhas; AFL = extrato aquoso de inflorescências; AFO = extrato aquoso de folhas.

Os resultados de todos os ensaios farmacológicos, in vitro, testados demonstram que a atividade biológica é afetada pelo modo de obtenção dos extratos de *Marsypianthes chamaedrys*. Tal fato nos induziu a resgatar as condições “tradicionais” de preparo da espécie vegetal e adequá-las aos protocolos da investigação científica. Portanto, apenas os extratos obtidos por meio da liofilização de contusos de inflorescências e folhas foram utilizados nos ensaios in vivo.

5.4 Atividade anti-inflamatória frente ao veneno de *Bothrops atrox*

5.4.1 Peritonite induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*

Os contusos de *Marsypianthes chamaedrys* foram capazes de inibir a migração de células inflamatórias para o local de injeção do veneno, por resposta dose-dependente e mesmo em doses mais baixas, após 4 h (Figura 9). Observa-se que a dexametasona inibiu eficazmente o influxo leucocitário, sugerindo a participação da PLA₂ endógena no modelo de inflamação utilizado neste estudo. A hipótese do envolvimento de mediadores derivados da lipoxigenase na migração de leucócitos, in vivo, também foi sugerida na indução de inflamação pelas peçonhas de *Bothropoides erythromelas*, *Rhinocerophis alternatus* (FLORES et al., 1993) e *Bothrops moojeni* (MORENO, 1994; SOUZA, 2006).

O sistema hemostático também está interligado à resposta inflamatória aguda por dois componentes específicos do sistema de coagulação, que funcionam como elo entre a inflamação e a coagulação sanguínea: a trombina e o Fator Xa. A trombina cliva o fibrinogênio em fibrina e durante esta conversão, são gerados fibrinopeptídeos, que induzem um aumento de permeabilidade vascular e quimiotaxia para leucócitos. Ocorre ainda, a clivagem do plasminogênio, pela trombina, formando a plasmina que, como a trombina, ativa os componentes da cascata do Sistema Complemento levando a formação, dentre outros fragmentos, de C3a e C5a. Estas anafilotoxinas, C3a e C5a, induzem aumento da permeabilidade vascular por se ligarem a receptores presentes na membrana de mastócitos, induzindo a liberação de histamina, como também atuam recrutando fagócitos, principalmente neutrófilos. A trombina, ainda pode induz a formação de C5a na ausência de C3 (HUBER-LANG et al., 2006). O fator Xa, após ligação aos seus receptores, causa aumento de permeabilidade vascular (SIQUEIRA JR;

DANTAS, 2000). Portanto, teoricamente, pode-se correlacionar a atividade anticoagulante dos extratos de *Marsypianthes chamaedrys* com sua ação anti-inflamatória aguda.

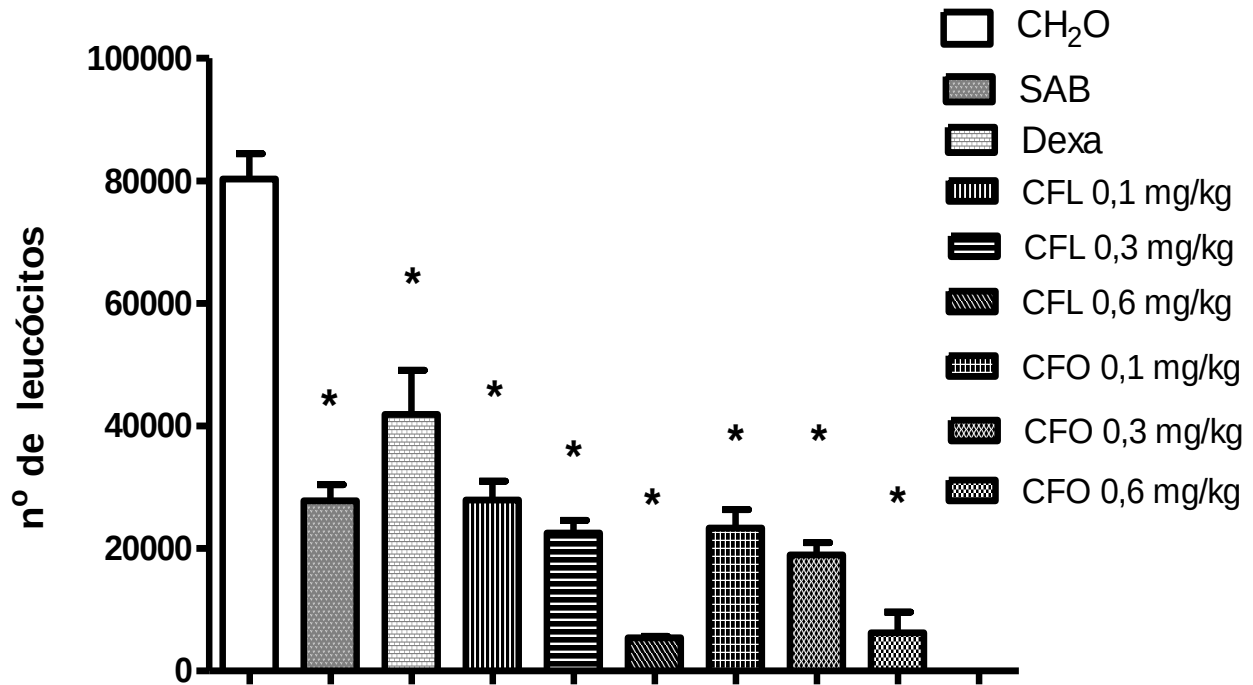


Figura 9 – Migração celular quatro horas após a injeção do veneno de *Bothrops atrox*. As barras representam média do número de leucócitos $\pm$ desvpad (100 μ L/cavidade pleural), n = 6, p < 0,0001 comparado ao controle tratado com água. CH₂O = Controle negativo água; SAB = Controle positivo SAB (100 μ L/animal); Dexta = Controle positivo Dexametasona (4mg/mL); CFL = Contusos de inflorescências; CFO = Contusos de folhas.

Resultados satisfatórios também foram obtidos quando os animais foram tratados, imediatamente ou na quarta hora, após injeção do veneno. Ambos os contusos mantiveram suas potências, porém para este modelo, o contuso de folhas (CFO) demonstrou ser mais eficaz, pois sua atividade inibitória foi similar nos três horários testados. Apesar de apresentar atividade significativa na segunda hora, o soro antibotrópico não inibiu a migração de leucócitos, significativamente, após a quarta hora da injeção do veneno (Figura 10).

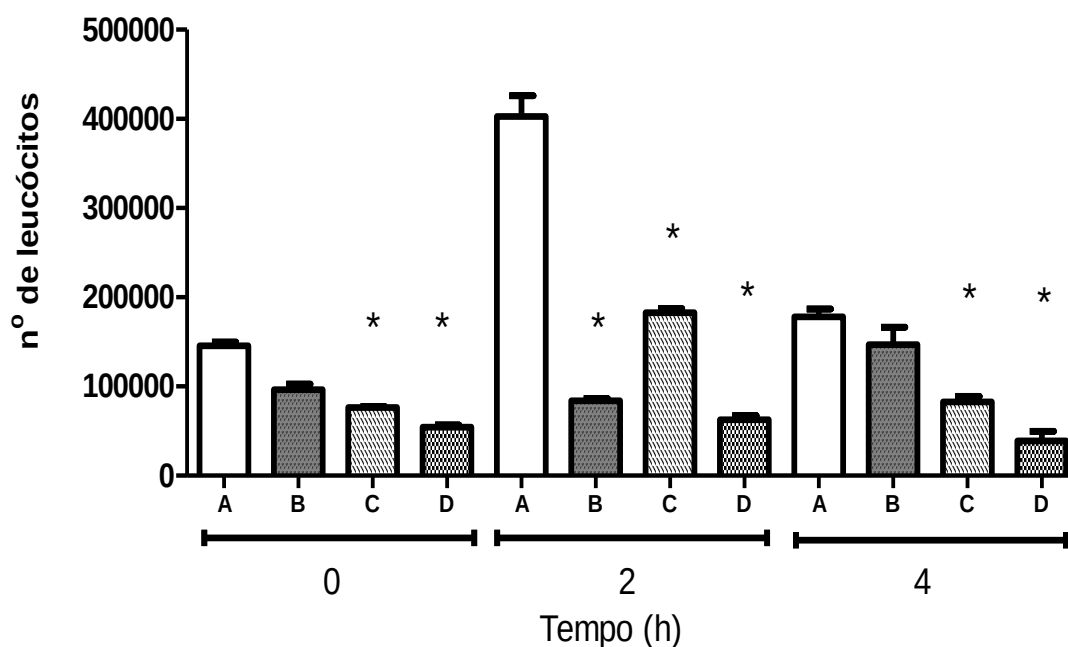


Figura 10 – Migração celular induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* (0.5 µg/animal) em diferentes horários de tratamento (0h ou imediatamente, 2h and 4h após indução da inflamação pelo veneno). As barras representam a média do número de leucócitos ± desvpad (100µL/cavidade pleural), n = 5, p < 0,0001 comparado ao controle tratado com água. No primeiro horário analisado, o resultado do grupo controle BAV tem p < 0,05 em relação ao controle H₂O. A = Controle negativo-água; B= Controle-positivo-SAB (100 µL/animal); C = CFL 0,6 mg/mL; D = CFO 0,6 mg/mL.

5.4.2 Dosagens de citocinas in vivo

Somente o contuso de inflorescências foi capaz de inibir eficazmente a liberação de IL-6 nos três horários (Figura 11 A). Os animais tratados com soro antibotrópico, duas horas após a de indução da inflamação, apresentaram menor concentração de IL-6. Ambos os contusos e o SAB foram capazes de inibir, significativamente, a produção de TNF- α , apenas na segunda hora, apesar da concentração dessa citocina, nos grupos que receberam contuso, manter-se inferior a do grupo-controle-água e do grupo que recebeu SAB, após a quarta hora (Figura 11 B). Em todos os horários testados, os contusos e o SAB não alteraram, significativamente, a concentração de IL-10 (Figura 11 C).

A alteração não significativa da concentração de IL-10 liberada, nos horários testados, representa um aspecto positivo da ação dos extratos testados, pois demonstra não interferir na auto-regulação do sistema imunológico.

Comparando-se os resultados, pode-se supor que a inibição de IL-6 e TNF- α podem estar influenciando a diminuição da migração celular pelos mecanismos relacionados, respectivamente, à hematopoiese de leucócitos e recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação. A atividade inibitória de IL-6 pelo contuso de inflorescências (CFL) pode estar relacionada à atividade de inibição catalítica das PLA₂, já que trabalhos como o de Núñez e colaboradores (2004) demonstram a indução de liberação de IL-6 por uma miotoxina I homóloga a Lys49 fosfolipase A₂ isolada do veneno de *Bothrops atrox*. No entanto, levanta-se a hipótese de um mecanismo multifatorial, pois ambos os extratos apresentaram inibição da ação hemolítica indireta pelas fosfolipases A₂ de *B. atrox*.

Estes resultados apontam para a necessidade de estudo da influência direta dos compostos de *Marsypianthes chamaedrys* na expressão de outros mediadores, produzidos por células, responsáveis pelo mecanismo de resposta inflamatória aguda. A inibição específica das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , além da não-interferência na concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 por esta espécie vegetal podem também representar propriedades importantes para o desenvolvimento de medicamentos que atuem em doenças inflamatórias autoimunes.

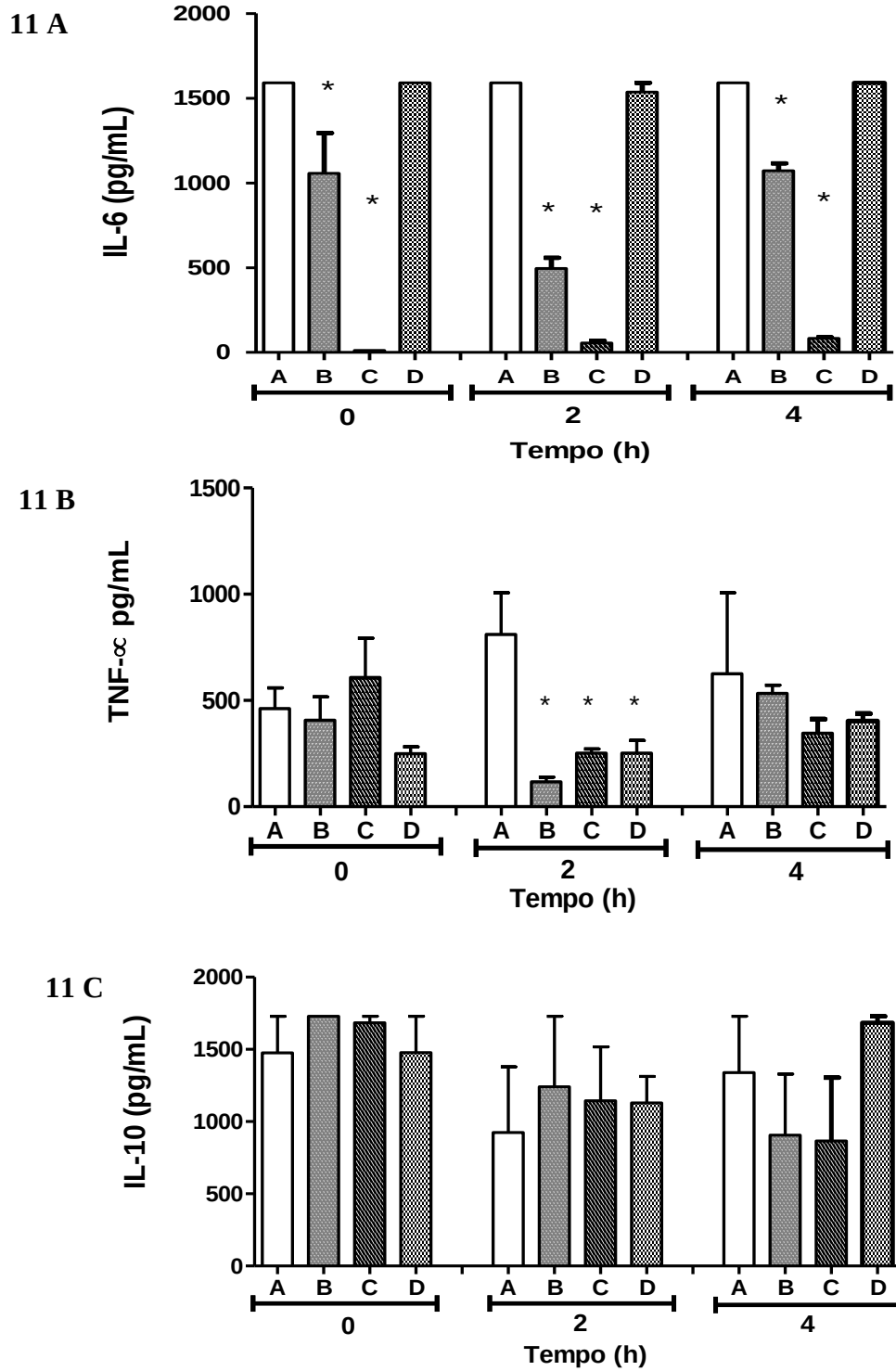


Figura 11 - Concentração (pg/mL) de IL-6 (11A), TNF- α (11B) and IL-10 (11C) no líquido peritoneal de camundondos em diferentes horários de tratamento (0h ou imediatamente, 2h and 4h após a indução da inflamação pelo veneno de *Bothrops atrox*). As barras representam a média da concentração $\pm$ desvpad, n = 5, p < 0,05 comparado ao controle tratado com água (A) correspondente a cada horário. A = Controle negativo água; B = Controle positivo SAB (100 μ L/animal); C = Contuso de inflorescências 0,6 mg/mL; D = Contuso de folhas 0,6 mg/mL.

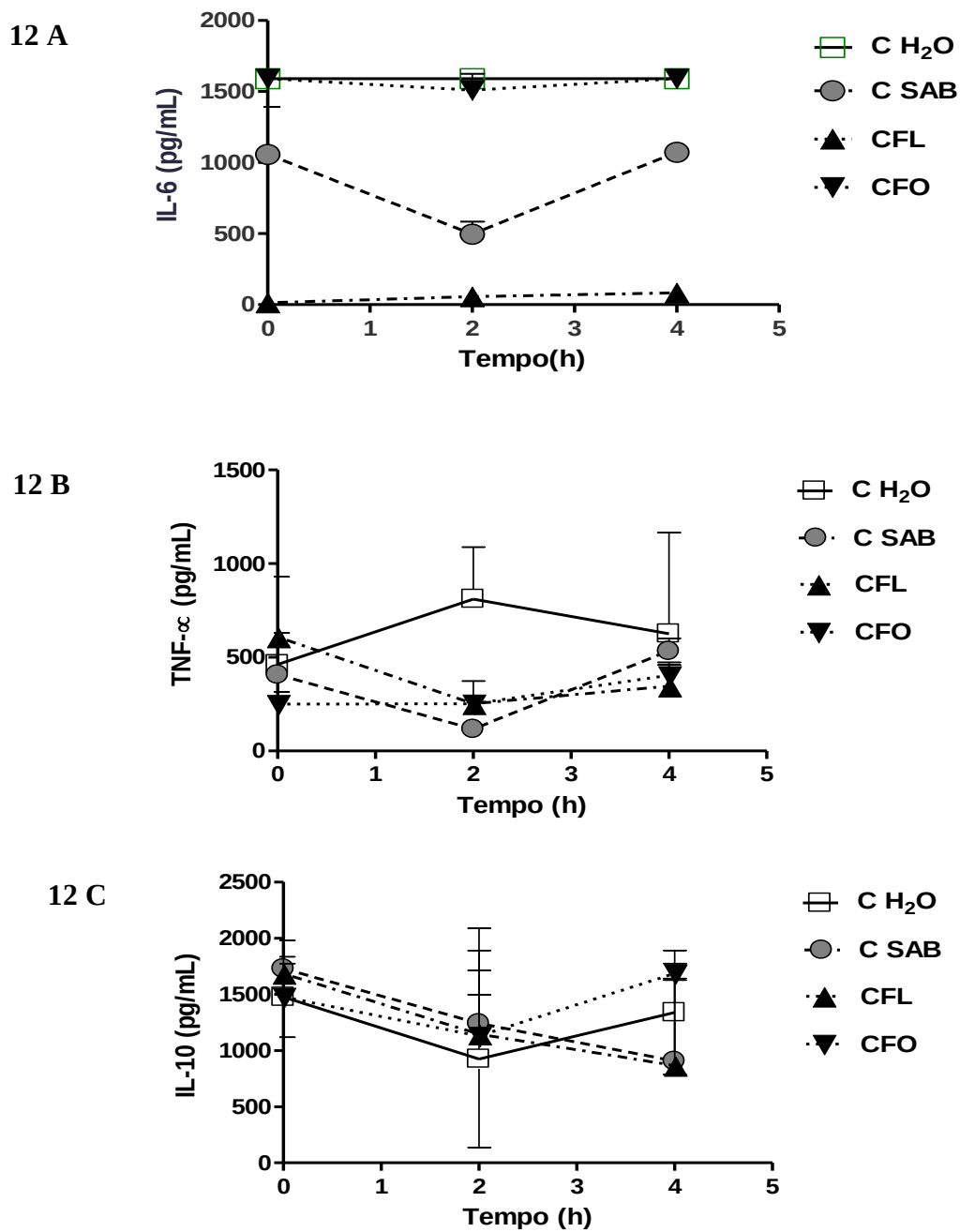


Figura 12 – Cinética da concentração (pg/mL) de IL-6 (A); TNF- α (B) e IL-10 (C) nos diferentes horários analisados (0 h ou imediatamente, 2 h e 4 h após a indução da inflamação pelo veneno de *Bothrops atrox*). C H₂O = controle negativo água; C SAB = Controle positivo SAB; CFL = contuso de inflorescências; CFO = contuso de folhas.

5.4.3 Aumento da permeabilidade vascular

Baseado nos resultados da curva cinética de permeabilidade vascular do Azul de Evans, o tempo de indução da inflamação foi de 4 h (Figura 13). No entanto, nenhum extrato apresentou inibição das atividades do veneno no modelo testado, mesmo em doses maiores (Figura 14). Porém, resultados como estes merecem também ser avaliados por outros diversos aspectos farmacocinéticos, por exemplo, a escolha do horário e da via de administração dos tratamentos. Os extratos foram aplicados uma hora antes da injeção de veneno para garantir um bloqueio efetivo dos componentes fitoquímicos, considerando-se a farmacocinética da posologia oral. Otero e colaboradores (2000), que estudaram o bloqueio da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* por diversos extratos administrados i.d., no local da inoculação do veneno, demonstraram uma diminuição da atividade em 25% dos extratos estudados quando estes foram, independentemente, administrados por via oral, i.p ou i.v., chegando até a perda da atividade bloqueadora.

Costa e colaboradores, em modelo de edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops atrox*, demonstraram bloqueio da ação edematogênica local apenas nos contusos de inflorescências de *Marsypianthes chamaedrys*, administrados via i.p. (comunicação pessoal). Camurati e colaboradores (2008) estudaram a ação das partes aéreas de *Marsypianthes chamaedrys* na inibição da inflamação induzida por carragenina que, apesar de apresentar diminuição em até 58,3% no edema de pata de camundongos, demonstraram que o extrato não foi capaz de promover a diminuição do infiltrado de células inflamatórias, no local da indução. Trata-se de resultados aparentemente contraditórios aos nossos, porém podem apenas refletir a importância do tipo de extrato, material botânico e via de administração escolhidos na resposta

farmacológica; além da necessidade de estudos múltiplos para caracterizar a atividade de bloqueio de inflamação em diferentes vias e por grupos químicos específicos.

O SAB também não neutralizou as atividades indutoras de permeabilidade vascular do veneno (Figura 14). Pico e colaboradores (2002) sugerem que o edema e hiperalgesia induzidos por venenos botrópicos, em modelo de injeção intraplantar em ratos, não são eficazmente neutralizados por antivenenos comerciais, o mesmo utilizado como controle-positivo neste ensaio, ainda que administrados previamente à injeção do veneno, tal qual foi realizado nesta metodologia.

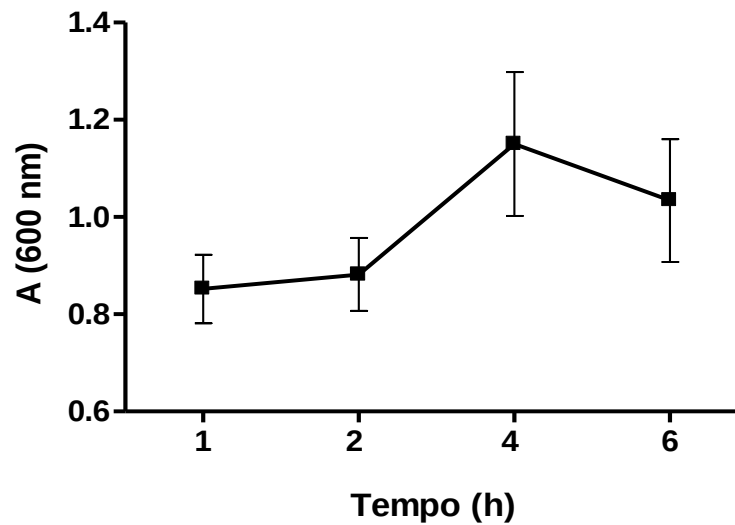


Figura 13 - Cinética do aumento de permeabilidade capilar induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* (n= 4). Cada ponto representa a absorbância (A) a 600 nm do azul de Evans extravasado nas diferentes horas de indução da inflamação (1 h, 2 h, 4 h e 6 h).

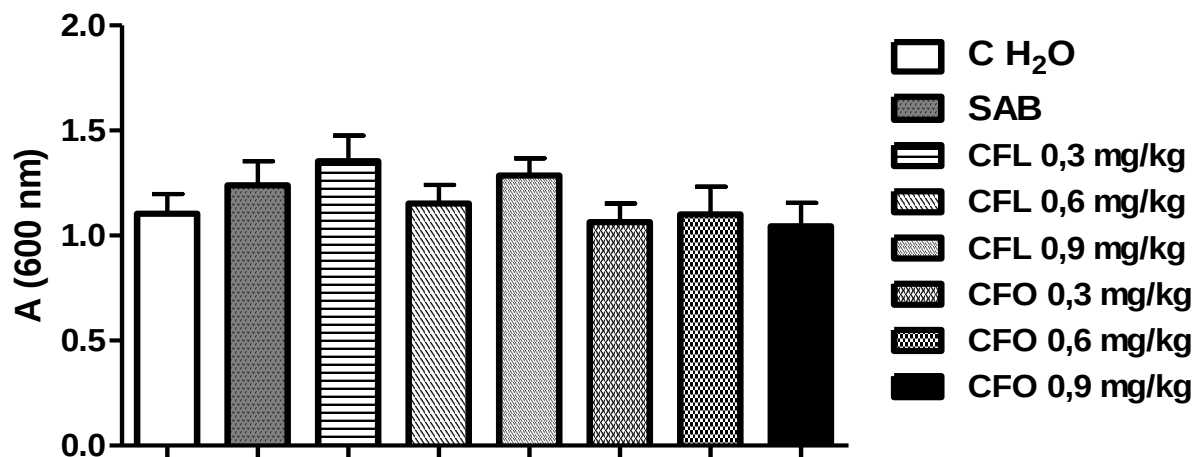


Figura 14 - Atividade de *Marsypianthes chamaedrys* frente à permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. As barras representam a absorbância (A) a 600 nm do azul de Evans extravasado após 4h de indução da inflamação. CH₂O = Controle negativo água; SAB = Controle positivo SAB (100 µL/animal); CFL = Contuso de inflorescências; CFO = Contuso de folhas.

As PLA₂ miotóxicas possuem mecanismos de ação inflamatória nos quais está envolvida a liberação de substâncias vasoativas por mastócitos, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular (TEIXEIRA et al, 2003). No entanto, alguns autores têm sugerido que a indução do edema, produzido por venenos botrópicos, é mediada por um domínio na molécula de PLA₂ que é independente dos domínios que mediam a mionecrose e a atividade inflamatória caracterizadas pela hidrólise de fosfolipídios (CONDREA et al, 1981; LANDUCCI et al, 1988; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). Kanashiro e colaboradores (2002) elegeram os mediadores pré-formados em mastócitos, como histamina, serotonina e moléculas provenientes do metabolismo do ácido araquidônico como possíveis candidatos envolvidos no mecanismo de aumento da permeabilidade vascular, induzida por duas fosfolipases de *Bothrops atrox*. Porém, nesse mesmo

trabalho, os autores observaram que os anticorpos monoclonais e policlonais foram incapazes de neutralizar, in vivo, a atividade edematogênica, apesar de neutralizar a atividade mionecrótica. Estas observações suportam o conceito de que as PLA₂ apresentam sítios farmacológicos independentes da região catalítica, e que ambas as regiões moleculares parecem desempenhar papéis importantes nos efeitos inflamatórios e edematogênicos induzidos por essas moléculas. Compostos químicos presentes em *Marsypianthes chamaedrys* podem estar se ligando especificamente apenas a um desses sítios, o que justificaria os efeitos contrários entre a sua potente atividade bloqueadora da ação da PLA₂, in vitro, e sua ineficácia na redução da permeabilidade vascular, encontrados neste estudo.

Apesar de não apresentar bloqueio da ação edematogênica no modelo de estudo escolhido, *Marsypianthes chamaedrys* foi capaz de inibir consideravelmente a maioria das atividades inflamatórias e coagulante analisadas neste trabalho. A busca por substâncias ou espécies vegetais que bloqueiam os efeitos locais induzidos pela ação das toxinas ofídicas torna-se necessária pela deficiência da terapêutica atual em neutralizar estes efeitos, que atinge principalmente a parcela da população com maior dificuldade de acesso médico-hospitalar. Importante ressaltar que os fitoterápicos não deverão substituir os imunobiológicos; e sim utilizados como coadjuvantes no tratamento dos efeitos locais, causados pela ação dos venenos botrópicos.

6. CONCLUSÃO

- Os extratos de *Marsypianthes chamaedrys* não apresentaram alteração na viabilidade celular frente ao modelo de citotoxicidade em células Vero, demonstrando ser seguros para realização de testes in vitro;

- De maneira geral, os extratos de *Marsypianthes chamaedrys* demonstraram ausência de efeitos toxicológicos agudos, apresentando segurança nas doses utilizadas nos ensaios in vivo;

- Os extratos de *Marsypianthes chamaedrys* apresentaram potente atividade anticoagulante, in vitro, frente ao veneno de *Bothrops atrox*. A atividade anticoagulante intrínseca destes extratos foi confirmada pelos ensaios de TAP e TPPa, demonstrando que os componentes desta espécie vegetal não só são capazes de inibir as atividades do veneno, como também agem diretamente sobre os componentes da cascata de coagulação.

- Os extratos de *Marsypianthes chamaedrys* apresentaram potente atividade antifosfolipásica, em modelo de hemólise indireta, frente ao veneno de *Bothrops atrox*, destacando-se a atividade dos contusos, que demonstraram inibição superior ao soro antibotrópico.

- Os resultados dos testes, in vitro, variaram de acordo com a forma de obtenção dos extratos, o que pode estar relacionado com a maior concentração de compostos voláteis nos contusos de *Marsypianthes chamaedrys*; apontando a importância da forma de obtenção dos extratos utilizados para a avaliação da atividade biológica. Estes resultados reforçam a importância do conhecimento tradicional para obtenção de fármacos ou de fitoterápicos eficazes, que podem auxiliar no tratamento de pacientes acidentados por serpentes do gênero *Bothrops* sp.

- Os contusos de *Marsypianthes chamaedrys* foram capazes de inibir, significativamente, a migração de células inflamatórias em diferentes horários de tratamento.
- Os contusos de *Marsypianthes chamaedrys* apresentaram atividade anti-inflamatória superior ao soro antibotrópico, no modelo de peritonite induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*.
- Somente o contuso de inflorescências (CFL) foi capaz de diminuir a liberação de IL-6 na inflamação por veneno de *Bothrops atrox*, durante os horários analisados (1 h, 2 h e 4h). O soro antibotrópico e ambos os contusos foram capazes de inibir a liberação de TNF- α , porém apenas na segunda hora analisada. Nos três horários, a concentração de IL-10 não foi significativamente alterada pelos contusos e pelo SAB.
- Os contusos de *Marsypianthes chamaedrys* foram ineficazes em reduzir a permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, no período de 4 h, demonstrando que outros mediadores, que participam da atividade inflamatória, não foram bloqueados pelos contusos, como também pelo SAB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, n.3, p. 472-508, 2008.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Check-list of the Family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45, n.3, p. 343-353, 2002.

AMARAL, C.F.; DA SILVA, O.A.; GOOD, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon*, v.23, n.6, p. 877-885, 1985.

ARAGÃO, G. F. Atividade farmacológica de mistura isomérica de alfa e beta amirina extraído de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March. 2004. 187 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ASSAFIM, M.; FERREIRA, M. S.; FRATTANI, F. S.; GUIMARÃES, J. A. MONTEIRO, R. Q.; ZINGALI, R. B. Counteracting effect of glycyrrhizin on the hemostatic abnormalities induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *British Journal of Pharmacology*, v. 148, p. 807–813, 2006.

ÁVILA-AGÜERO, M.L.; PARÍS, M.M.; HU, S.; PETERSON, P.K.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; FAINGEZICHT, I. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatric Emergency Care*, v. 17, p. 425-429, 2001.

BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.1, p. 11-22, 1995.

BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators of Inflammation*, v.7, p. 339-346, 1998.

BÉRNILS, R. S. (org.). 2010. Brazilian reptiles – List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em: 03 de setembro de 2010.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmaceutic Therapy*, v. 62, p. 325-272, 1994.

BOUIC, P. J. D.; LAMPRECHT, J. H. Plant Sterols and Sterolins: A Review of Their Immune-Modulating Properties. *Alternative Medicine Review*, v.4, n.3, p.170-177, 1999.

BORGES, C. C.; CAVALCANTI-NETO, A. J.; BOECHAT, A. L.; FRANCISCON, C. H.; ARRUDA, L. F. M.; DOS-SANTOS, M. C. Eficácia da espécie vegetal *Peltodon radiacans* Pohl (Labiatae = Lamiaceae) na neutralização do extrato vegetal Específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops atrox*. *Revista da U.A. Série: Ciências Biológicas*, v.1, n. 1, p. 97-113, 1996.

BORGES, C.C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M.C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n.6, p. 637-646, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em saúde : Zoonoses, p. 116, 2009.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* v.82, p. 851–859, 2000.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venom, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, v. 583, p. 1736-1743, 2009.

CAMURATI, D.; FERNANDES, J.; CAMURÇA, D. M.; BASTOS, M. F. Avaliação do efeito do extrato de *Marsypianthes chamaedrys* sobre a atividade edematogênica e alterações leucocitárias induzidas por carragenina em camundongos. In: X Congresso Internacional de Etnofarmacologia, São Paulo, 2008.

CARDOSO, J.L.C.; FAN, H.W.; FRANCA, F.O.S.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S.A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L.; CHUDZINSKI, A.M.; CASTRO, S.B.; KAMIGUTI, A.S.; KELEN, E. M. A.; HIRATA, M. H.; MIRANDOLA, R.M.S.; THEAKSTON, R. D.G.; WARRELL, D. A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brasil. *The Quarterly Journal of Medicine*, v.86, p. 315-325, 1993.

CARLOS, M. M.; FREITAS, P.D.F. Estudo da cascata de coagulação e seus valores de referência. *Acta Veterinaria Brasília*, v.1, n.2, p.49-55, 2007.

CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. *O Mundo da Saúde*, v. 30 (4), p. 644-653, 2006.

CASTRO, I.; BURDMANN, E.A.; SEGURO, A.C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon*, v. 43, p. 833-839, 2004.

CASTRO, K. N. C.; CARVALHO, A. L. O.; ALMEIDA, A. P.; OLIVEIRA, D. B.; BORBAD, H. R.; COSTAB, S. S.; ZINGALI, S. S. Preliminary *in vitro* studies on the *Marsypianthes chamaedrys* (boia-caa') extracts at fibrinoclotting induced by snake venoms. *Toxicon*, v. 41, p.929-932, 2003.

CHAVES, F.; LEÓN, G.; ALVARADO, V.H.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, v. 36, p. 1861-1869, 1998.

CORREA-NETO, C. Estudo imunoquímico do veneno de *Bothrops jararacussu*, Lacerda, e identificação de moléculas biomarcadoras como ferramenta para o desenvolvimento de diagnóstico. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia de Imunobiológicos, Rio de Janeiro.

CORRÊA, P. M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 5, 747 p, 1984.

COSTA, H.N.R.; DOS-SANTOS, M.C.; ALCÂNTARA, A.F.C.; SILVA, M.C.; FRANÇA, R.C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae). *Química Nova*, v.31, p.744-750, 2008.

DOS-SANTOS, M. C. Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas In: Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1 ed. São Paulo: Savier Editora e FAPESP, 2003, p. 115-125.

DUKE, J.A. The Synergy Principle at Work. In: Kaufman, P. B.; Cseke, L. J.; Warber, S.; Duke, J. A.; Briemann, H.L. Natural Products from Plants. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2000, p. 184 - 205.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. Natural Products Reports, v. 22 p. 396-411, 2005.

EAGLE, H. The coagulation of blood by snake venoms and its physiologic significance. Journal of Experimental Medicine, v. 65, p. 613-639, 1937.

ESCOCARD, R.C.M.; KANASHIRO, M.M.; PETRETSKI, J.H.; AZEVEDO-SILVA, J.; CARVALHO, C. Q.; DA SILVA, W.D. Neutrophils regulate the expression of cytokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. Immunobiology, v.211, p. 37-43, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Determinação da perda por Dessecação. V.2.9. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1988, Parte I.

FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 53, n. 11, p. 1533-1539, 2001.

FERREIRA, V. B. N. Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante da *Equisetum arvense* e da *Marsypianthes chamaedrys*. 2001. 70f. Dissertação (Pós-Graduação em Química – Área de Química Orgânica) - Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology*, v.147, p.3815-3822, 1991.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; MONTEIRO, R.Q.; GUIMARÃES, J.A. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 235, p. 259–263, 1997.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 1 ed. São Paulo: Savier Editora e FAPESP, 2003, p. 72-86.

FLORES, C.A.; PRADO FRANCESCHINI, J. Lipoxigenase-derived mediators may be involved *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternates* venoms. *Toxicon*, v.31, p.1551-1559, 1993.

FURTADO, M. DE F.; COLLETO, G. M. D. D; SILVA, W. D. DA. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos: I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. *Memórias do Instituto Butantan*, v.53 p.149-159, 1991.

GAMBERO, A.; LANDUCCI, E.C.T.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J.R.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Human neutrophil migration *in vitro* induced by secretory phospholipases A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochemical Pharmacology*, v.63, p. 65-72, 2002.

GAMBERO, A.; THOMAZZI, S.M.; CINTRA, A.C.; LANDUCCI, E.C.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon*, v. 44, p. 473-481, 2004.

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

GLUSA, E.; BRAUNS, H.; STOKER K. Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* snake venom, on isolated pig coronary arteries. *Toxicon*, v.29, p. 725-732, 1991.

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

GUTIERREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, G.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v.26, p.411-413, 1988.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venom. *Toxicon*, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Efectos locales em el envenenamiento ofídico em La America Latina. In: Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1 ed. São Paulo: Savier e FAPESP, 2003, p. 310-323.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in Snakebite Envenomation Therapy: Scientific, Technological and Public Health Considerations. Current Pharmaceutical Design, v. 13, p. 2935-2950, 2007.

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

HARLEY, R.M. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Labiatae. Rodriguésia, v. 58, p.545-548, 2007.

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

HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. Biochemistry, v. 26, p. 772-780, 1987b.

HOUGHTON, P.J.; OSINBOGUN, I.M. Flowering plants used against snakebite. Journal of Ethnopharmacology v.39, p. 1-29, 1993.

HUBER-LANG, M.; SARMA, J.V.; ZETOUNE, F.S.; RITTIRSCH, D.; NEFF, T.A.; MCGUIRE, S.R.; LAMBRIS, J.D.; WARNER, R.L.; FLIERL, M.A.; HOESEL, L.M.;

GEBHARD, F.; YOUNGER, J.G.; DROUIN, S.M.; WETSEL, R.A.; WARD, P.A. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature Medicine*, v. 12, p. 682-687, 2006.

KANASHIRO, M.M; ESCOCARD, R.C.M.; PETRETSKI, J.H.; PRATES, M.V.; ALVES, E.W.; MACHADO, O.L.T; DA SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipases from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochemical Pharmacology*, v.64, p.1179-1186, 2002.

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

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*, v.27, p.613-35, 1989.

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

LAWRENCE, B. M. Chemical components of labitae oils and their exploration. In: HARLEY, R.M.; REYNOLDS, T. *Advances in labitae science*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p.399-436.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, p.57-68, 1995.

- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. Å. Host response to *Bothrops asper* snake venom. *Inflammation*, v. 17, p. 93-105, 1993.
- 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.
- MALLO, A. C.; XIFREDA, C. C. Sobre dos especies de *Marsypianthes* (Lamiaceae, Ocimeae) del noreste argentino. *Darwiniana*, v.42, p.201-206, 2004.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*, v.25, p. 320-32, 1962.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, v.36, p. 1749-1800, 1998.
- MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, v. 30, p.1131–1142, 1992.
- MEBS, D., OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacology and Therapeutics*, v.48, p. 223-236, 1990.
- MENEZES, M.C.; PAES LEME, A.F.; MELO, R.L.; SILVA, C.A.; DELLA CASA, M.; BRUNIA, F.M.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CAMARGO, A.C.M.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Activation of leukocyte rolling by the cysteine-rich domain and the hyper-variable region of HF3, a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *FEBS Letters*, v.582, p. 3915–3921, 2008.

MENEZES, F. S.; BORSATTO, A. S.; PEREIRA, N. A.; MATOS, F. J. A.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *Marsypianthes chamaedrys*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 70, n. 4, p. 7616, 1998a.

MENEZES, F. S.; BORSATTO, A. S.; PEREIRA, N. A.; MATOS, F. J. A.; KAPLAN, M. A. C. Chamaedryol, an ursane triterpene from *Marsypianthes chamaedrys*. Phytochemistry, v. 48, n. 2, p. 323-325, 1998b.

MORAIS, J.F.; DE-FREITAIS, M.C.W.; YAMAGUCHI, I.K.; DOS-SANTOS, M.C. Comparision of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments. Toxicon, v.32, p. 725-734, 1994.

MORENO, S.E. Estudo Comparativo da resposta inflamatória, em ratos, induzida por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em estágios distintos de desenvolvimento. 1994. 68 f. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas.

MORS,W.B.; NASCIMENTO, M. C.; RUPPELT, B. M.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. Phytochemistry, v. 55, p. 627-642, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v.65, p. 55-63, 1983.

NEIVA M.; ARRAES, F.B.M.; SOUZA, J.V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A.R.B.; WALTER, M. E. M.T.; BRIGIDO, M. M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). Toxicon, v. 53, p. 427-436, 2009.

NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P.; BRUDZYNSKI, T. M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a Serine Protease from *Bothrops atrox* Venom. 2. Interaction with Platelets and Plasma-Clotting Factors. *Biochemistry*, v.18, p 3571-3577, 1979.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*, v. 44, p. 91-101, 2004.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. *Toxicon*, v. 42, p. 841–854, 2003.

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

PAINE, M.J.I.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.G.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning and molecular characterisation of a high molecular weight haemorrhagic metalloproteinase, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 22869-22879, 1992.

PEDERSEN, J.A. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 28, p. 229-253, 2000.

PEREIRA, B.M.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III – Atividade antiedematogênica. Revista Brasileira de Farmácia, v. 73, n.4, p.85-86, 1992.

PEREIRA, E.F.R.; PEREIRA, N.A. Atividade analgésica e anti-inflamatória de um extrato alcoólico de Boia-caá ou paracari (*Marsypianthes hyptoides* Mart, Lamiaceae). Revista Brasileira de Farmácia, v. 70, n.3, p.59-60, 1989.

PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M.M.; RODRIGUES, F.R.; ALVES, E.W.; MACHADO, O.L.T.; KIPNIS, T.L. Edema induction by the disintegrin-like/cystein-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. Biochemical and Biophysical Research Communication, v. 276, p. 29-34, 2000a.

PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C.P.; ALVES, E.W.; KIPNIS, T.L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 33, p. 1293-1300, 2000b.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 35, p. 1221-1228, 2002.

PINHO, F. M.O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. Revista de Assistência Médica Brasileira, v.47, p. 24-29, 2001.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G; OLIVEIRA, F.; ARAUJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos

de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 23, p.176-82, 2004.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.3139 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 6, p. 470-480, 1997.

RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Ursolic Acid from *Plantago major*, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Catalyzed Prostaglandin Biosynthesis. *Journal of Natural Products*, v.61, p.1212-1215, 1998.

RUPPELT, B.M.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas II – Bloqueio da atividade na permeabilidade capilar e na letalidade do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*). *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 71, p.57-58, 1990.

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

RYDING, O. Amount of calyx fibres in Lamiaceae, relation to calyx structure, phylogeny and ecology. *Plant Systematic Evolution*, v. 268, p. 45–58, 2007.

SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 496, p. 9-20, 2010.

SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L. Distúrbios hemostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil. In: Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1 ed. São Paulo: Savier Editora e FAPESP, 2003, p. 290.

SCHVARTSMAN, S. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. São Paulo : Sarvier, 1992, p. 254-266.

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

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC_{50} – values and cell survival. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, v. 33, p. 813-823, 1995.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T.J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Revista de Medicina de Ribeirão Preto*, v.35, p.127-133, 2002.

SIQUEIRA JR, J.F.; DANTAS, C.J.S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, 2000, p. 238.

SOARES, A. M.; TICLIA, F. K.; MARCUSSIA, 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.

SOUZA, S.M.C. Efeito do extrato hidroalcolico de *Elipta prostata* em modelo de inflamação in vivo, induzido pelo veneno de serpente *Bothrops moojeni*. 2006. 78 f. Dissertação, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 20, n.1, p.135-142, 2006.

STOCKER, K.; BARLOW, G.H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: LORAND, L. (Ed.) *Methods of Enzymology*, v. 45B. New York: Academy Press, 1976, p.214.

TAN, N.H.; SAIFUDDIN, M.N. Isolation and characterization of hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *Toxicon*, v. 28, p. 385-392, 1990.

TEIXEIRA, C.F.P.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 181-184, 2005.

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

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

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines for the production control and regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. Geneva, p.8, 2010.

YAMAKAWA M.; NOZAKI, M.; HOKAMA, Z. Fractionation of *Sakishima habu* (*Trimeresus elegans*) venom and lethal hemorrhagic and edema forming activities of the fractions. In: Ohsaka A., Hayashi K., Sawai, Y., editors. Animal, plants and microbial toxins. 1 ed. New York: Plenum Press, 1976, p. 97-109.

YUK, D.Y.; RYU, C.K.; HONG, J.T.; CHUNG, K.H.; KANG, W.S.; KIM, Y.; YOO, H.S.; LEE, M.K.; LEE, C.K.; YUN, Y.P. Antithrombotic and antiplatelet activities of 2-chloro-3-[4-(ethylcarboxy)-phenyl]-amino-1,4-naphthoquinone (NQ12), a newly synthesized 1,4-naphthoquinone derivative. *Biochemical Pharmacology*, v. 60, n.7, p.1001–1008, 2000.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* venom: role of a catalytic activity. *Toxicon*, v. 45, p.335-346, 2005a.

ZULIANI, J.P.; GUTIÉRREZ, J.M.; CASAIS E SILVA, L.L.; SAMPAIO, S.C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C.F.P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. *Toxicon*, v. 45, p. 523-553, 2005b.

ANEXO A – Formulário doação de amostras de sangue encaminhado ao Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr(a). para participar do Projeto de Pesquisa “Avaliação do potencial anti-inflamatório de *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntz (LAMIACEAE) frente ao veneno de *Bothrops atrox*.”, que será realizado na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

A pesquisadora Alcineide Magalhães, responsável pelo projeto, pede autorização para coletar (tirar) um pouquinho do seu sangue (dez mililitros), para poder fazer um teste que pretende comprovar a atividade anti-inflamatória do extrato de uma planta. O Sr.(a) foi escolhido porque não tem doença nenhuma, neste caso a informação do seu sangue vai servir para sabermos se a planta altera o valor do que estamos medindo.

O sangue que não for usado não será guardado, sendo descartado com todo o cuidado. A coleta do sangue será feita em uma veia de seu braço, podendo causar uma leve dor na hora e uma pequena mancha roxa que desaparecerá em 3 a 4 dias após a coleta, mas esperamos que nada disso aconteça.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do sangue, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não ganhará nada. A sua participação é importante para o melhor conhecimento desta planta, que poderá contribuir na descoberta de um novo medicamento.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo para sempre. Para qualquer outra informação, o(a) Sr.(a) poderá entrar em contato com o(a) pesquisador(a) pelo telefone (92) 3223-6422 ou pelo e-mail: alcineidemagalhaes85@gmail.com

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

Assinatura do participante

_____-_____
Data

Pesquisadora Responsável

_____-_____
Data



Impressão do dedo polegar
caso não saiba assinar

ANEXO B - Teste Hipocrático (Toxicidade de drogas por análise comportamental)

Droga..... Via de administração.....
 Dosemg/kg Concentração da droga.....
 Hora da administração.....h.....min. Data...../...../.....
 Administrador:.....
 Investigador.....
 Animal..... Sexo () Peso.....g

Atividade Farmacológica	Até 30 min	1h	2h	3h	4h	24h	48/72h
Aparência geral							
Frênito vocal							
Irritabilidade							
Reposta ao toque							
Aperto da cauda							
Contorção							
Trem posterior							
Endireitamento							
Tônus muscular							
Força de agarrar							
Ataxia							
Reflexo auricular							
Reflexo corneal							
Tremores							
Convulsões							
Anestesia							
Lacrimação							
Ptose							
Micção							
Piloereção							
Defecação							
Hipotermia							
Respiração							
Cianose							
Morte							

Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4. Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

Observações gerais/comentários

.....
