

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da ação antiofídica do extrato das folhas e do suco de graviola
(*Annona muricata*) no envenenamento por *Lachesis muta rhombeata*

Caroline Marroni Cremonez

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da ação antiofídica do extrato das folhas e do suco de graviola
(*Annona muricata*) no envenenamento por *Lachesis muta rhombeata*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado(a): Caroline Marroni Cremonez

Orientador(a): Prof^a Dr^a Eliane Candiani Arantes

Ribeirão Preto
2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos ∞ Elizabeth,

igualmente fruto do esforço deles.

*"As pessoas esquecerão o que você disse e esquecerão o que você fez, mas
nunca esquecerão como você as fez sentir..."*

(Autor Desconhecido)

Agradecimentos

Foram alguns anos de trabalho, e nesse tempo tive o privilégio de estar e conhecer pessoas sem as quais eu não teria chegado onde cheguei, nem conquistado o que conquistei. Não me refiro apenas à pesquisa, mas ao crescimento pessoal e profissional. Pessoas que contribuíram como colaboradores, bem como aqueles que contribuíram com seu apoio e carinho em minha vida. Por diferentes motivos e razões, gostaria de agradecer:

À minha família, pai e mãe, pela vida, pelo amor e carinho, pelos puxões de orelha, pela paciência e pelo apoio incondicional ao longo de toda minha vida.

Ao meu querido amigo e companheiro de viagem, Fábio Akioma, agradeço pelos muitos anos de paciência, carinho, incentivo, contribuição profissional e pessoal, por me ajudar a crescer na vida, chegar onde estou e me tornar a mulher que sou.

À Profª Eliane Candiani Arantes, minha orientadora. Agradeço pela confiança, por compartilhar seus conhecimentos, pelas exigências e, acima de tudo, pela paciência, por ser mais que uma orientadora, pelo carinho e amizade, compreensão e incentivo.

Ao querido amigo, ex-professor e orientador, Prof. Dr. Wilson Roberto Malfará, que me mostrou a grandiosidade da Toxicologia.

À Profª Drª Ana Maria de Souza, por sua contribuição intelectual nesse trabalho e por abrir as portas de seu laboratório.

Ao Dr. Rodrigo C. G de Souza, por todo seu conhecimento como criador de Lachesis muta rhombeata, pelo conhecimento médico em envenenamento e pelo fornecimento da peçonha.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi.

Ao Prof. Dr. Milton Groppo.

A profª Drª Maria Cristina Nonato.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura e à Profª Drª Andréia Machado Leopoldino.

Aos queridos amigos do Biotério da Farmácia, Reinaldo, Ramon, Ronaldo.

Aos rapazes da informática, que me socorreram nos momentos mais problemáticos.

À Cidinha, Regina e Amália, e as secretárias da Pós, Ana e Rose.

Às técnicas Zita Maria Gregório e Luisa Helena Dias Costa.

Em especial agradeço:

Às técnicas do nosso Laboratório, Karla e Flavinha, obrigada por toda ajuda e por todas as risadas durante as horas intermináveis no laboratório e no biotério.

Ao Felipe, pelo dom com os camundonginhos.

À Joane, por me ajudar incontáveis vezes com meus problemas com as máquinas.

Ao João Paulo, pela ajuda quando os números me fugiam ou não entravam na cabeça, e pelas incontáveis horas de conversa, apoio e companhia.

Aos companheiros do Departamento de Física e Química por toda contribuição que recebi e por tornar o convívio destes anos muito mais engraçado e agradável. Aos alunos que estão comigo há todos esses anos, e aos que já passaram pelo laboratório. Pessoal das Toxinas : Renata, Flávia, Baldo, Felipe, Fernando, Camis, Karla, Flávia, Ernesto, Priscila, Tibério, Gisele, Bregge, Amanda, Marcio, Empada, Gabriel, Cuco, Veri, Luana, Risada. Pessoal do LCP: Joane, Ana Lúcia, Paty, Ricardo, Aline, Mateus, Adam, Geni, Juliana. E ao pessoal da Física: João Paulo, Ricardo, Renata, Flávio, Rodrigo, Lia, Leandro.

Ao Fernand e à Greyce, por estar ao meu lado esse tempo todo, obrigada pela amizade, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, obrigada pelas comemorações nos momentos de vitória,

pelos dias engraçados e pelos dias de estresse, enfim obrigado por todos os momentos que passamos juntos e por acrescentar tanto significado em minha vida... algumas pessoas passam em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem.

As minhas eternas amigas, Milinha, Lara, Nina, Nenis e Pops, minhas irmãs de alma, que sempre torceram por mim.

Enfim, de forma direta ou indireta, todos que passaram por mim nesta jornada, e acrescentaram um pouco em minha vida. A todos,

MUITO OBRIGADA

RESUMO

CREMONEZ, C.M. **Estudo da ação antiofídica do extrato das folhas e do suco de graviola (*Annona muricata*) no envenenamento por *Lachesis muta rhombeata***. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O envenenamento humano por *Lachesis*, embora pouco freqüente, é bastante severo, caracterizado por pronunciado dano tecidual local e efeitos sistêmicos, como hipotensão e bradicardia, tonturas, náuseas, cólicas abdominais e diarreia. A soroterapia é única terapia específica disponível. Entretanto, para muitas plantas é atribuída ação antiofídica. No Norte e Nordeste brasileiro, o suco da fruta (SAm) e o extrato aquoso de folhas (EFAm) de graviola (*Annona muricata*) são freqüentemente usados pela população local para tratar o envenenamento por *Lachesis muta rhombeata*. O objetivo deste estudo foi avaliar a letalidade, as alterações de parâmetros hematológicos, bioquímicos, de pressão arterial e processo inflamatório induzidos pela peçonha de *L. m. rhombeata* (PLmr), bem como a relevância do tratamento com EFAm e SAm no envenenamento. O perfil hematológico mostra uma hemoconcentração inicial seguida de extensa hemólise, evidenciada pela redução do hematócrito, hemoglobina total e contagem global de eritrócitos, não alterado pelos tratamentos. A contagem diferencial de leucócitos revela neutrofilia nas primeiras horas de envenenamento e aumento de linfócitos 24h após a injeção da peçonha, características de processo inflamatório agudo, não influenciado pelos tratamentos. Houve diminuição de albumina e proteínas totais e aumento de uréia, decorrentes do envenenamento. Os valores de AST foram ainda maiores nos animais tratados, mas os aumentos de CK foram reduzidos pelos tratamentos com EFAm e SAm. Houve aumento de TP e TTPA na primeira hora, e diminuição da pressão arterial tempo dependente no envenenamento. O suco intensificou a queda da pressão. Foi observado aumento de IL-6 nas primeiras horas de envenenamento e alterações das proteínas plasmáticas características de processo inflamatório agudo, como esperado em casos de envenenamento. O ensaio de letalidade revela DL₅₀ de 51,0 ± 6,3 mg/kg, para o grupo injetados com a peçonha e sem tratamento; de 56,3 ± 8,5 mg/kg, para o grupo injetado com a peçonha e tratado com SAm e de 62,2 ± 6,8 mg/kg, para o grupo injetado com a peçonha e tratado com EFAm. Concluindo, o quadro clínico do envenenamento laquético foi bem analisado, que era o objetivo principal do trabalho. Avaliou-se também a eficiência do uso popular da graviola (*A. muricata*) nos acidentes ofídicos com a serpente *L. m. rhombeata*. De forma geral, os tratamentos com EFAm e com SAm não alteram de forma relevante o quadro clínico do envenenamento, como observado pelos valores semelhantes de DL₅₀. Entretanto, o tratamento com suco parece agravar a hipotensão causada pelo envenenamento e provocar um aumento significativo das transaminases hepáticas. Por outro lado, é possível notar nos animais tratados menores alterações da hemostasia, bem como uma possível proteção contra a miotoxicidade da peçonha.

Palavras- chave: *Lachesis muta rhombeata*, envenenamento, ação antiofídica, graviola, *Annona muricata*.

ABSTRACT

CREMONEZ, C.M. **Study of the antiophidic action of the leaves extract and the juice of soursop (*Annona muricata*) on *Lachesis muta rhombeata* envenomation.** 2011. 76p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The human envenomation by *Lachesis*, although rare, is quite severe, characterized by pronounced local tissue damage and systemic effects, such as hypotension and bradycardia, dizziness, nausea, abdominal cramps and diarrhea. The only specific therapy available is the serum therapy. However, for many plants is attributed antiophidic action. In North and Northeast Brazil, the fruit juice and the aqueous extract of leaves of soursop (*Annona muricata*) are often used by local population to treat *Lachesis muta rhombeata* envenomation. The aim of this study was evaluate the lethality, hematological, biochemical, blood pressure, and inflammation parameters induced by *L. m. rhombeata* snake venom, as well as the relevance of treatment with fruit juice and the aqueous extract of leaves of soursop. The hematological parameters shows an initial hemoconcentration followed by extensive hemolysis, as evidenced by decreased hematocrit, total hemoglobin and total red blood cells count, which were not altered by the treatments. The leukocytes differential count revealed neutrophilia in the early hours after the envenomation and increased lymphocytes 24h after the injection of *L. m. rhombeata* venom, characteristics of acute inflammatory process, which were not influenced by treatments. There was a decrease of albumin and total proteins and urea increased as a result of the envenomation. The AST concentration were still higher in treated animals, although the increases in CK values were reduced by treatments with leaves extract and soursop juice. There was an increase of prothrombin time and activated partial thromboplastin time during the first hour, and there were time dependent decrease of the blood pressure after the envenomation. The juice intensified the pressure decrease. An increase of IL-6 was observed in the early hours after the envenomation, as well as changes in the profile of plasmatic proteins, characteristic of acute inflammatory process, as expected in cases of snake bite. The lethality assay reveals LD₅₀ of 51,0 ± 6,3 mg / kg for the group injected with venom without treatment; 48,3 ± 8,6 mg /kg for the group injected with venom and treated with juice of *A. muricata*; and 62,2 ± 6,8 mg/kg for the group injected with venom and treated with leaves extract of *A. muricata*. In conclusion, the clinical profile of *L. m. rhombeata* envenomation was well analyzed, the main goal of this work. The efficiency of the popular use of soursop on envenomation by *L. m. rhombeata* snakes was also evaluated. In general, treatments with extracts of leaves and soursop juice do not significantly modify the clinical profile of the envenomation, as observed by similar LD₅₀ values. However, treatment with juice seems to worsen the hypotension caused by envenomation and induce a significant increase in AST levels. On the other hand, there are lower changes in hemostasis on treated animals, as well as a possible protection against the myotoxicity of the venom.

Key-words: *Lachesis muta rhombeata*, envenomation, antiophidic action, soursop, *Annona muricata*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENVENENAMENTO	1
1.2. TRATAMENTO	5
1.3. PLANTAS COM PROPRIEDADES ANTIOFÍDICAS	7
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. CONCLUSÕES	13
4. REFERÊNCIAS	15

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENVENENAMENTO

Os animais peçonhentos tais como serpentes, abelhas, aranhas, escopiões e outros, são aqueles capazes de produzir e inocular substâncias tóxicas. As peçonhas de serpentes possuem inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais. São constituídas por uma variedade grande de toxinas, que incluem: neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, proteases, desintegrinas e peptídeos, que atuam por diferentes mecanismos na paralisia, morte e digestão da presa (MATSUI et al., 2000; MEBS, 2001).

As serpentes estão distribuídas por quase todos os ambientes terrestres. Há aproximadamente 2900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, sendo que apenas 410 são consideradas peçonhentas e classificadas de acordo com suas características morfológicas em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (FUNASA, 2001). No Brasil, encontramos representantes das famílias Viperidae e Elapidae, sendo que 32 serpentes pertencem ao gênero *Bothrops*, seis ao gênero *Crotalus* e dois ao gênero *Lachesis* (família Viperidae) e 29 ao gênero *Micrurus* (família Elapidae). O envenenamento por estas serpentes causa distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea, induzem hemorragia, edema e necrose local (FUNASA, 2001).

O gênero *Lachesis* inclui uma única espécie, *Lachesis muta* (Linnaeus), distribuída na América Central e América do Sul, da Nicarágua ao Brasil (CAMPBELL e LAMAR, 1989). Quatro subespécies são atualmente reconhecidas: *L. m. stenophrys*, distribuídas na vertente atlântica da Nicarágua, Costa Rica e Panamá e em algumas regiões do Pacífico da Colômbia; *L. m. melanocephala*, restrita a região do Pacífico sul da Costa Rica; *L. m. muta*, distribuídas em florestas tropicais da Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Peru, Equador e Brasil; e *L. m. rhombeata*, confinadas a algumas áreas da floresta tropical da região atlântica do Brasil (CAMPBELL e LAMAR, 1989). Um estudo recente baseado em sequências moleculares de DNA mitocondrial, Zamudio e Greene (1997) propõe que as populações de *Lachesis muta* sejam classificadas em três diferentes espécies: *L. stenophrys* e *L. melanocephala* na América Central, e *L. muta* na América do Sul.

Envenenamentos por serpentes são eventos comuns em países tropicais e subtropicais. Cerca de 20.000 acidentes ofídicos acontecem por ano no Brasil. Destes casos 0,4% chegam a óbito, sendo em sua maioria atribuídos ao gênero *Bothrops* (90,5%; 0,31% de letalidade), seguido dos gêneros *Crotalus* (7,7%; 1,87% de letalidade), *Lachesis* (1,4%; 0,95% de letalidade) e *Micrurus* (0,4%; 0,36% de letalidade) (FUNASA, 2001). Ocorrem principalmente em zonas rurais e estão relacionados com o aumento da atividade humana no campo e com fatores climáticos. Embora represente apenas 1,4 % dos envenenamentos, o número de mortes por envenenamento laquético é bastante relevante (FUNASA, 2001; PINHO & PEREIRA, 2001).

As *Lachesis muta* são as maiores serpentes peçonhentas da América Latina, atingindo 3,0 a 3,5 m de comprimento. São denominadas popularmente de Surucucu (do indígena brasileiro nativo Tupi-Guarani Suu'-u-u, cobra que dá muitas mordidas, muitos ataques), surucucu pico-de-jaca, e surucutinga (STEPHANO et al., 2005).

A subespécie *Lachesis muta rhombeata* foi considerada “em extinção”, em 1989 pela lista oficial do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA, e hoje é considerada “vulnerável” pela International Union for the Conservation of Nature (SOUZA, 2006).



Figura 1. *Lachesis muta rhombeata*. Fonte: Laboratório de Toxinas Animais

Manifestações clínicas de envenenamento por animais peçonhentos são distintas, com exceção das serpentes do gênero *Bothrops* e *Lachesis*, que apresentam inúmeras similaridades. O envenenamento laquético é caracterizado por lesões locais, dor, edema e hemorragia, coagulopatias, miotoxicidade e intensa

inflamação local. A peçonha possui também ação neurotóxica evidenciada pelos sintomas vagomiméticos tais como sudorese, náusea, vômito, cólicas abdominais, diarreia, hipotensão e bradicardia (CARDOSO et al., 2003; JORGE et al., 1997; PARDAL et al., 2004; MELLOR & ARVIN, 1996).

Alguns autores acreditam que a sintomatologia vagomimética precoce do envenenamento por *Lachesis muta*, pode ser usada como um diagnóstico diferencial entre o envenenamento botrópico e laquélico, pois são raros os casos onde o paciente consegue trazer o animal causador (CARDOSO et al., 2003).

Em roedores de laboratório e em ensaios *in vitro*, a peçonha de *L. m. Muta* apresenta atividade hemorrágica, necrotizante, defibrinogenante, coagulante, proteolítica e formadora de edema. A peçonha é rica em enzimas proteolíticas que são responsáveis por efeitos locais severos (JORGE et al., 1997). Os efeitos hemostáticos são atribuídos às alfa-fibrinogenases, ativas sobre o fator XIII da cascata de coagulação (MAGALHÃES et al., 1981; YARLEQUE et al., 1989), e às metaloproteases hemorrágicas, LHF-I e LHF-II (SANCHEZ et al., 1987, 1991, 1995a, 1995b, 2003). Lectinas-C e proteínas tipo lectina-C causam hemaglutinação e agregação plaquetária (LIMA, et al., 2009; JORGE et al., 1997). A peçonha também contém enzimas tipo-trombina, que induzem o consumo de fibrinogênio (HERMOGENES et al., 2006, WEINBERG et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2003; FELICORI et al., 2003; AGUIAR et al., 1996), cininogenases acídicas, uma serinoprotease, que causa hipotensão em animais, através da liberação de cininas do cininogênio plasmático e que poderiam ser responsáveis pelos mesmos efeitos em pacientes humanos, e talvez responsável por algumas das manifestações da estimulação do sistema nervoso autonômico como vômito, diarreia, sudorese, hipersalivação e bradicardia observada em vítimas humanas (JORGE et al., 1997; DINIZ e OLIVEIRA, 1992; WEINBERG et al., 2004). Também é demonstrada atividade tipo-Giroxina (toxina isolada da peçonha de *Crotalus terrificus durissus* com atividade hipotensiva e neurotóxica) na peçonha de *Lachesis muta* (JORGE et al., 1997). Outros componentes da peçonha inclui a L-Aminoácido Oxidase (JORGE et al., 1997), peptídeos potenciadores de bradicinina (SOARES et al., 2005; SANZ et al., 2008), fosfolipases A₂ (FULLY et al., 2000 e 2002; DAMICO et al., 2005a e 2005b, além das outros componentes, enzimas e proteases descritas acima.

Uma revisão de 20 casos de mordidas em humanos atribuídas a *Lachesis muta* da Costa Rica, Guiana Francesa, Brasil, Colômbia e Venezuela confirmam a

síndrome de náusea, vômito, cólica abdominal, diarreia, sudorese, hipotensão, bradicardia e choque (síndrome vagal), não observadas em vítimas de outras serpentes americanas. (JORGE et al., 1997).

A síndrome hemorrágica observada no envenenamento laquético é resultado de danos microvasculares causados por metaloproteases, coagulopatias causadas por serinoproteases e pela inibição da agregação plaquetária pelas fosfolipases A₂. O quadro hemolítico é principalmente atribuído às fosfolipases A₂. O efeito hemaglutinante, agregação plaquetária, inibição de trombina e hipotensor são atribuídos também às lectinas-C e proteínas tipo lectina-C (LIMA et al., 2009).

A ação miotóxica é atribuída à ação das fosfolipases e, indiretamente, às metaloproteases, que contribuem para a miotoxicidade da peçonha devido à isquemia local causada pelos danos microvasculares, levando a morte celular da fibra muscular (LIMA, et al., 2009).

O edema local é devido à intensa inflamação local, promovida por metaloproteases e fosfolipases A₂. (LIMA, et al., 2009). A peçonha de *L. m. muta* também possui atividade tipo cinina, o que pode explicar alguns dos sinais neurotóxicos da peçonha (DINIZ e OLIVEIRA,1992; WEINBERG et al., 2004).

Um estudo comparativo realizado por OTERO et al. (1998) avaliou várias atividades da peçonha de 3 subespécies de *Lachesis muta* (*L. m. stenophrys*, *L. m. muta* e *L. m. rhombeata*) do Brasil, Colômbia e Costa Rica. Todas as peçonhas induziram efeitos letais (DL₅₀ de aproximadamente 100 µg/camundongo, por via i.p.), hemorrágico, edematogênico, miotóxico, coagulante e defibrinante. Mostraram também atividade proteolítica e hemolítica indireta.

Complicações decorrentes do envenenamento podem aparecer na forma de insuficiência renal, infecções secundárias e necrose, que podem levar a necessidade de amputação do membro afetado ou ao déficit funcional do mesmo.

A literatura é escassa em dados referentes a análises bioquímicas e hematológicas em envenenamentos por *L. muta*. Em relato de dois casos, acompanhados pelo Dr. Rodrigo C. G de Souza (2008), a análise de tempo de coagulação foi realizada durante o episódio agudo, mostrando que o sangue torna-se incoagulável. Pardal et al. (2004), um relato de caso de envenenamento por *Lachesis muta*, determinam o hematócrito, hemoglobina total, creatinina e uréia antes da terapia antiveneno, porém 26 h após o acidente laquético. Jorge e cols

(1997) fizeram um estudo mais amplo sobre o envenenamento, realizando a análises bioquímicas (creatinina, CK, AST, glicose, TP e TTPA) e hematológicas (contagem global de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina total, VCM, HCM, CHCM, contagem global e diferencial de leucócitos) duas horas após o acidente ofídico (momento da admissão do paciente na unidade de saúde) e 24h após a infusão do soro antiveneno.

O envenenamento por serpentes requer atendimento médico de emergência, e sempre que possível, os seguintes exames laboratoriais deveriam ser pedidos, até mesmo para auxílio diagnóstico: hemograma completo, tempo de coagulação, TP e TTPA, produtos de degradação do fibrinogênio/fibrina (PDF), alfa-antiplasmina, uréia e creatinina. Monitorização cardíaca é também fundamental.

1.2. TRATAMENTO

Hoje, a única terapia específica disponível para os envenenamentos por serpentes é a soroterapia. Sua eficiência está relacionada principalmente com a quantidade de peçonha injetada e com o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento (FRANÇA, 1998). Entretanto, apesar do soro ser a única terapia aceita para estes envenenamentos, seu uso está vinculado a existência de sistemas de atenção médica estruturados. Portanto, as populações de localidades remotas se vêem compelidas a buscar terapias alternativas devido à dificuldade de acesso a este tratamento específico.

Apesar do sucesso da soroterapia, a mesma apresenta alguns inconvenientes: (1) limitação do acesso ao soro antiofídico em áreas rurais de países em desenvolvimento, onde ocorre a maioria dos acidentes; (2) variações significativas na composição da peçonha e a reatividade antigênica, devido a diversidade taxonômica e geográfica das serpentes, o que pode levar a sérias limitações clínicas durante a soroterapia; (3) reações adversas no paciente acidentado devido a infusão de proteínas de origem animal, que podem ser divididas em reações precoce (reações anafilactóides, como urticárias, vômitos, cólicas, obstrução das vias aéreas por edema de laringe, hipotensão e choque) e reações tardias (“doença do soro”, hipersensibilidade tipo III, caracterizada por febre baixa, urticárias generalizada, artralgias, edema periarticular, linfadenopatia e proteinúria);

(4) limitação da soroterapia quanto ao dano tecidual local causado pelo envenenamento (CARDOSO et al., 2003; SOARES et al., 2005).

A peçonha de *Lachesis muta* apresenta a menor capacidade de indução de anticorpo em cavalos, quando comparada com a de outras peçonhas. Por exemplo, o soro antibotrópico neutraliza o equivalente a 180 vezes a LD₅₀ para a peçonha de *Bothrops*; o soro anticrotálico neutraliza 250 LD₅₀ desta peçonha, enquanto o soro antilaquétrico neutraliza só cinco LD₅₀ da peçonha de *Lachesis muta*. Esta baixa antigenicidade é pelo menos em parte, consequência da presença de componentes imunossupressores na peçonha de *L. muta* (STEPHANO et al., 2005).

As semelhanças entre os envenenamentos botrópico e laquétrico e a mesma distribuição geográfica de ambos os gêneros, leva a produção e administração do soro polivalente (poliespecífico), que tem a propriedade de neutralizar efeitos induzidos pelos diferentes peçonhas. Embora a utilização desses soros seja uma decisão correta, ela implica em uma série de desvantagens. O soro polivalente é menos eficaz quando comparado ao soro monovalente. A imunização de animais com diferentes tipos de peçonha pode provocar: (1) produção de anticorpos predominantemente contra a peçonha de uma das espécies, ou (2) redução da quantidade de anticorpos produzida devido a componentes com atividade imunossupressora (*Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta muta*) (CARDOSO et al., 2003).

O envenenamento humano por *Lachesis muta*, embora pouco freqüente, é bastante severo, devido à grande quantidade de peçonha injetada, e é caracterizado por pronunciado dano tecidual local e deficiências orgânicas sistêmicas, tais como hipotensão arterial, tonturas, escurecimento da visão, bradicardia, espasmos abdominais e diarreia. A soroterapia apesar de ser a terapia de escolha, está restrita às regiões que dispõem de centros de saúde estruturados e carrega consigo uma série de desvantagens. Adicionalmente, o fato da peçonha de *L. muta* apresentar baixa antigenicidade, o que resulta na produção de soro antilaquétrico com baixa capacidade de neutralização de suas toxinas, torna ainda mais relevante a busca por tratamentos alternativos e complementares ao uso de soro antilaquétrico. Estes fatos justificam a busca de novos compostos que possam atuar como coadjuvantes no tratamento de envenenamentos e estejam disponíveis em quaisquer localidades.

1.3. PLANTAS COM PROPRIEDADES ANTIOFÍDICAS

A procura por novos compostos farmacologicamente ativos obtidos de fontes naturais, como extratos de plantas, levou à descoberta de muitas drogas clinicamente úteis, que desempenham papéis relevantes no tratamento de diversas doenças (SHU, 1998). A busca de plantas empregadas para a manutenção ou restauração da saúde humana nos conhecimentos populares é freqüente, visto que essas informações podem indicar as plantas com maior probabilidade de possuir princípios ativos com a ação esperada.

As plantas medicinais oferecem importante fonte de compostos capazes de auxiliar diretamente no tratamento em acidentes com animais peçonhentos, ou indiretamente, como complemento da soroterapia convencional. O uso de extratos de plantas como antídoto contra peçonha é uma antiga opção para muitas comunidades que carecem de rápido acesso à soroterapia, em regiões remotas.

O tempo transcorrido entre o acidente ofídico e o tratamento, é determinante para a eficácia soro antiofídico de neutralizar os efeitos do envenenamento, quanto maior o tempo decorrido, menor a eficácia do soro, conseqüentemente, os extratos vegetais se tornam uma opção alternativa promissora como complemento à soroterapia, e até mesmo único, quando o tratamento convencional não é prontamente disponível (SOARES et al., 2005 e 2009).

Muitos são os vegetais aos quais se atribuem ação antiveneno. De modo geral, a fitoterapia antiveneno está baseada em dados informais, havendo necessidade de uma avaliação crítica sobre sua real eficácia (CARDOSO et al., 2003).

Um número grande de plantas antiofídicas tem sido estudado na procura e caracterização de substâncias biologicamente ativas capazes de neutralizar diversos efeitos locais e sistêmicos provocados pelas peçonhas animais (MORS et al., 2000).

Há diversos estudos demonstrando que a flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico que podem ser utilizadas no futuro como drogas ou como modelo para o desenvolvimento de drogas de interesse médico-científico. Mors e cols. (2000) citam 104 plantas indicadas pela medicina popular com ação antiofídica. Martz (1992) lista em seu trabalho algumas plantas com atividades antiofídicas *in vivo* e *in vitro*, excluindo do mesmo as plantas envolvidas em rituais xamanísticos e tratamento Ayurvedico, por haver comprovação científica ou investigação sistemática a respeito destas plantas. Entre as plantas descrita por ele podemos citar *Diodia scanderas*, *Aradrographis paniculata*

(Acânthaceae), *Phylanthus klotzschianus* (Euphorbiaceae), *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), *Apoleia leiocarpa* (Leguminosae), *Periandra pujalu* e *Periandra mediterranea* (Papilionideae), *Picrasma quassioides* (Simaroubaceae), *Colocasia esculenta* (Araceae). Compostos naturais também são popularmente utilizados na China em acidentes ofídicos, como Yunnan, composto por *Dactylis scadens* (Graminese), *Clerodendron yunanens* (Verbenaceae), *Oldenladia diffusa* (Rubiaceae), *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae), *Brunella vulgaris* (Labiatae), *Lobelia chinensis* (Lobeliaceae), *Hottonia cordata* (Scrophulariaceae), *Polygonum porfoliatum* (Polygonaceae), *Gentiana rigescens* (Gentianaceae), *Rubia condifolia* (Rubiaceae) e *Imperata cylindrica* (Graminese); e Guangdong, composto por *Passiflora cochinchinensis* (Passifloraceae) e *Citrus grandis* (Rutaceae).

Otero e colaboradores (2000a, b, c) descreveram uma lista de diversas plantas coletadas na Colômbia. Popularmente, 60% dos acidentes ofídicos são tratados por plantas preparadas por “curandeiros” de comunidades rurais, preparadas por infusão, decocção ou maceração e administradas por via oral ou administrada diretamente sobre o local da picada.

Diversos autores relatam a ação antiofídica de plantas e substâncias isoladas como: ar-tumerone de *Curcuma longa* (FERREIRA et al., 1992), fração HI-RVIF de *Salsaparrilha indicus* (ALAM et al., 1994), wedelolactona, estigmasterol e sitosterol isolados da *Eclipta prostrata* (MELO et al., 1994, MARTZ, 1992), bredemeyrosídeo B isolado de *Bredemeyera floribunda* (DAROS et al., 1996), extrato aquoso de *Peschiera fuchsiaefolia* (BATINA, 1996; BATINA et al., 1997 e 2000) hoje reclassificada como *Tabernaemontana catharinensis* e *Annona crassiflora* (WEINBERG et al., 1993)

Na região da Mata Atlântica do Norte e Nordeste brasileiro, o suco da fruta e o extrato aquoso de folhas de gravioleira (*Annona muricata*) são frequentemente usados pela população local para tratar o envenenamento por mordida de surucucu (*Lachesis muta rhombeata*).



Figura 2. Gravioleira (*Annona muricata*, Família Annonaceae).

Fonte: Laboratório de Toxinas Animais.

Graviola (*Annona muricata* L., família Annonaceae) tem uma longa e rica história de uso em medicina herbárea, bem como de uso indígena. São atribuídos diferentes propriedades e usos às partes da árvore. Nos Andes Peruanos o chá das folhas é usado como expectorante e as sementes amassadas contra parasitas intestinais. Na Amazônia Peruana a casca, folhas e raízes são utilizadas como antiespasmótico, sedativo e no tratamento de diabetes. Tribos indígenas das Guianas usam como tônico cardíaco e como sedativo o chá das folhas ou da casca. Na Amazônia brasileira, o chá de folha de *Annona muricata* é usado para problemas do fígado, e o óleo das folhas e da fruta verde é misturado com azeite de oliva e usado para neuralgia, reumatismo e dor de artrite. Na Jamaica e Haiti o fruto ou suco do fruto de *Annona muricata* é usado para combater febre, diarreia, como antiparasitário e como lactagogo. A casca e as folhas são usadas como antiespasmótico, sedativo e para cardiopatias, para gripes, resfriados, dificuldades durante o parto, asma e hipertensão (TAYLOR, 2006).

Muitos compostos bioativos e fitoquímicos têm sido descobertos na graviola, conforme os cientistas vêm estudando desde 1940. Muitos de seus usos em medicina popular foram validados por pesquisa científica. Diversos estudos conduzidos por diferentes pesquisadores demonstraram que a casca bem como as folhas de *Annona muricata* possui atividade hipotensora, antiespasmótica,

anticonvulsivante, vasodilatadora, relaxante da musculatura esquelética lisa e atividade cardiopressora em animais (TAYLOR, 2006).

Sabe-se que embora o produto seja de origem natural, isso não significa que o mesmo é livre de efeitos adversos, pois não se conhecem a fundo a toxicidade da planta como um todo. Devido às atividades farmacológicas encontradas, o uso de graviola não é recomendado durante a gravidez, pois foi demonstrado em ratos aumento da estimulação uterina; também se deve evitar o uso de graviola por pessoas com hipotensão, pois a planta demonstrou cientificamente efeito hipotensor, vasodilatador e cardiopressor em estudos com animais, o que poderia agravar o quadro de hipotensão do indivíduo (TAYLOR, 2006). Em estudo conduzido em ratos onde foi administrado via intragástrica extrato da casca da planta houve aumento nas concentrações de dopamina, norepinefrina, aumento da atividade da monoamino-oxidase, bem como a inibição da liberação de serotonina. Por este motivo é contra indicado a combinação do uso de graviola com inibidores da enzima MAO e outros antidepressivos (TAYLOR, 2006).

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos em espécies da família Annonaceae intensificaram-se nos últimos 15 anos devido à descoberta de acetogeninas, uma classe de compostos naturais, caracterizado por cadeia alifática longa contendo na região terminal o grupo metil substituído por uma γ -lactona insaturada e um ou dois anéis de tetrahydrofurano, algumas vezes substituído por anéis epóxi e/ou duplas ligações (GLEYE et al., 1997), e que apresentam uma grande variedade de atividades biológicas.

As acetogeninas de anonáceos são potentes agentes citotóxicos, principalmente como inseticidas, fungicida, herbicida, pesticida bem como composto antitumoral. Na década de 1990 foi notada a habilidade destas acetogeninas de inibir a respiração mitocondrial, o que foi confirmado anos depois. A principal ação das acetogeninas é inibir a respiração mitocondrial no Complexo-1, etapa limitante da produção de energia pela mitocôndria (ZAFRA-POLO et al., 1998).

As acetogeninas também possuem atividades anti-helmíntica, antitumoral (ZENG et al., 1995; ALALI et al., 1999; KIM et al., 1998), antibacteriana contra as cepas *B. subtilis* e *S. aureus* (TAKAHASHI et al., 2006), moluscicida (SANTOS e SANT'ANA, 2001) e atividade antiprotozoária contra três espécies de *Leishmania*, *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum* (OSORIO et al., 2007). Além disso, estes compostos têm despertado interesse devido sua atividade imunossupressora e capacidade para

inibir replicação de HIV em células H9 linfocíticas (CHANG et al., 1998; QUEIROZ et al., 1999). Há evidências de efeito citotóxico em células infectadas com o vírus Herpes simplex (PADMA et al., 1998).

O Dr. Rodrigo C. G. de Souza, médico e diretor da Fundação Hospital de Itacaré - BA, constatou que praticamente todos os pacientes que chegam ao hospital para se tratarem do envenenamento por *Lachesis muta*, já consumiram o suco e/ou o extrato da folha de *Annona muricata* (informação pessoal). É grande a preocupação com envenenamento por animais peçonhentos, principalmente em países tropicais em pleno desenvolvimento sócio- econômico, onde os recursos de produção e distribuição de soros antivenenos são limitados, a busca por métodos alternativos para minimizar, modificar ou retardar a ação da peçonha é constante e promissora.

Este uso popular tão intenso da graviola em casos de envenenamento por *Lachesis muta* motivou o desenvolvimento deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a letalidade, as alterações hematológicas, bioquímicas e de pressão arterial, bem como o processo inflamatório induzidos pela peçonha da serpente *Lachesis muta rhombeata* (PLmr). Adicionalmente, analisar a relevância do extrato de folhas (EFAm) e do suco (SAm) da graviola (*Annona muricata*), planta popularmente utilizada como antiveneno natural na região Nordeste do Brasil, no tratamento do envenenamento por surucucu.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a letalidade da peçonha de *L. m. rhombeata* e o efeito do tratamento com o extrato das folhas e o suco de *Annona muricata* sobre a dose letal 50% (DL₅₀).
- Analisar as alterações em parâmetros hematológicos (contagem global de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina total, índices eritrocitométricos, contagem global e diferencial de leucócitos) e hemostáticos (Tempo de Protrombina- TP, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada- TTPA) induzidas pelo envenenamento.
- Analisar os efeitos dos tratamentos com extrato das folhas e suco de *Annona muricata* sobre as alterações observadas nos parâmetros hematológicos.
- Analisar as alterações em parâmetros bioquímicos (Glicose, Proteínas totais, Albumina, AST, Uréia, Creatinina e CK) induzidas pelo envenenamento
- Analisar os efeitos dos tratamentos com extrato das folhas e suco de *Annona muricata* sobre as alterações observadas nos parâmetros bioquímicos.
- Avaliar as alterações pressóricas em ratos injetados com a peçonha de *L. m. rhombeata* na presença e ausência dos tratamentos com o extrato das folhas e suco de *A. muricata*.
- Avaliar o processo inflamatório desencadeado pelo envenenamento, através da dosagem de IL-6 e análise do perfil eletroforético de proteínas séricas em gel de agarose.
- Analisar os efeitos dos tratamentos com extrato das folhas e suco de *Annona muricata* sobre as alterações observadas no processo inflamatório.

3. CONCLUSÕES

Parâmetros Bioquímicos

- Diminuição de Albumina e Proteínas Plasmáticas característica do perfil de envenenamento descrito em literatura, decorrente da reação de fase aguda, onde os tratamentos tanto com EFAm como com SAm não modificam este perfil.
- Aumento de Uréia decorrente da deposição de fibrina nos rins devido à ação das serino-proteases tipo trombina presentes na peçonha, alterando temporariamente a função renal, onde os tratamentos não modificam a ação da peçonha.
- Elevação das concentrações de AST é mostrada em todos os grupos envenenados e mostra-se estatisticamente superior nos grupos tratados com EFAm e com SAm, mostrando um agravamento do quadro clínico.
- Aumento de CK nas primeiras horas após o envenenamento característico da miotoxicidade da peçonha. Nos tratamentos tanto com EFAm (24h) como com SAm (1h) os valores de CK mostram-se significativamente inferiores aos do grupo sem tratamento, sugerindo efeito benéfico dos tratamentos sobre a miotoxicidade.

Parâmetros Hematológicos

- O quadro de envenenamento laquético mostra uma hemoconcentração nas primeiras horas após a injeção da peçonha e posterior quadro de hemólise intensa em após 24h. Os tratamentos parecem diminuir a hemoconcentração, provavelmente por reduzir a diarreia causada pelo envenenamento.
- Contagem diferencial de leucócitos, com neutrofilia nas primeiras horas de envenenamento e aumento de linfócitos 24 h após o envenenamento, característico de processo inflamatório agudo provocado pela peçonha. Parâmetros não alterados pelos tratamentos.

Parâmetros Hemostáticos

- Há aumento de TP e TTPA significante na primeira hora após o envenenamento consistente com o quadro clínico descrito em literatura. O fato dos grupos tratados não apresentarem este aumento, sugere efeito protetor tanto do EFAm como do SAm.

Pressão Arterial

- No envenenamento observa-se uma redução da pressão arterial tempo dependente, que se mostra agravada no grupo tratado com SAm.

Processo Inflamatório

- Elevação de Interleucina-6 nas primeiras horas após o envenenamento, com pico máximo em 6h e queda em 24h, onde os tratamentos parecem não modificar de forma relevante esse perfil.

- Alteração do perfil de proteínas plasmáticas característico de processo inflamatório agudo, não influenciado pelos tratamentos.

Ensaio de Letalidade

- Os ensaios de letalidade mostram que os tratamentos não alteraram significativamente os valores de DL₅₀ da peçonha, quando se considera os limites fiduciais de cada ensaio.

O quadro clínico do envenenamento laquétrico foi bem detalhado, que era o objetivo principal do trabalho. Avaliou-se também a eficiência do uso popular da graviola (*A. muricata*) nos acidentes ofídicos com a serpente *L. m. rhombeata*. De forma geral, os tratamentos com EFAm e com SAm não alteram de forma relevante o quadro clínico do envenenamento, como observado pelos valores semelhantes de DL₅₀. Entretanto, o tratamento com suco parece agravar o quadro hipotensor do envenenamento e causar um aumento significativo das transaminases hepáticas. Por outro lado, é possível notar nos animais tratados menores alterações da hemostasia, bem como uma possível proteção contra a miotoxicidade da peçonha.

.

4. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. S.; ALVES, C. R.; MELGAREJO, A.; GIOVANNI-DE-SIMONEZ, S. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 555-565, 1996.

ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504–540, 1999.

ALAM, M.I.; AUDDY, B.; GOMES, A. Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the indian medicinal plant sarsaparilla (*Hemidesmus indicus* R.Br.). **Toxicon**, v. 32, p. 1551-1557, 1994.

BELL, W.N.; ALTON, H.G. Brain extract as substitute for platelet suspensions in thromboplastin generation test. **Nature**, v.174, p.880-881, 1954.

BATINA, M.F.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Methodological care in the evaluation of the LD₅₀ and the neutralization of the lethal effect of the *Crotalus durissus terrificus* venom by the plant *Peschiera fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **The J. of Venoms Animal and Toxins**, v. 3, p. 23-29, 1997.

BATINA, M.F.C. **Inibição das atividades letal e miotóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por *Peschiera fuchsiaefolia***. 1996, 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994.

BOLAÑOS, R.; MUÑOZ, G.; CERDAS, L. Toxicity, neutralization and immunoelectrophoresis of the venom of *Lachesis muta* from Costa Rica and Colombia. **Toxicon** 16 (3), 295–300, 1978.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University Press. Ithaca. NY, 1989.

CAMPOS, V.R.; ABREU, P.A.; CASTRO, H.C.; RODRIGUES, C.R.; JORDÃO, A.K.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V.; SANTOS, F.C.; MOURA, L.A.; DOMINGOS, T.S.; CARVALHO, C.; SANCHEZ, E.F.; FULY, A.L.; CUNHA, A.C. Synthesis, biological and theoretical evaluations of new 1,2,3- triazoles against the hemolytic profile of the *Lachesis muta* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 7429-7434, 2009.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2003

CHANG, F.; YANG, P.; LIN, K.; WU, Y. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 437–439, 1998.

DAMICO, D.C.S.; LILLA, S.; NUCCI, G.; PONCE-SOTO, L.A.; WINCK, F.V.; NOVELLO, J.C.; MARANGIONI, S. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 75 – 86, 2005a.

DAMICO, D.C.S.; BUENO, L.G.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGIONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; NOVELLO, J.C. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve–muscle preparations. **Toxicon**. v.46, p. 222–229, 2005b.

DAMICO, D.C.S.; BUENO, L.G.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGIONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; NOVELLO, J.C. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A₂ (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). **Toxicon**, v. 47, p. 759–765, 2006.

DAMICO, D.C.S.; NASCIMENTO, J.M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L.A.; JOAZEIRO, P.P.; NOVELLO, J.C.; MARANGIONI, S.; COLLARES-BUZATO, C.B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v. 49, p. 678-692, 2007.

DAROS, M.R.; MATOS, F.J.A.; PARENTE, J.P. A new triterpenoid saponin, bredemeyeroside B, from the roots of *Bredemeyera floribunda*. **Planta Médica**, v. 62, p. 523-527, 1966.

DINIZ, M.R.; OLIVEIRA, E.B. Purification and properties of a Kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (bushmaster). **Toxicon**, v. 30, p. 247–258, 1992.

ESTEVIÃO-COSTA, M.I.; DINIZ, C.R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F.S.; SANCHEZ, E.F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. **Thrombosis Research**, v. 99, n. 4, p. 363-76, 2000.

ESTEVIÃO-COSTA, M.I.; MARTINS, M.S.; SANCHEZ, E.F.; DINIZ, C.R.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Neutralization of the hemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venom by a monoclonal antibody against mutalysin-II. **Toxicon**, v.38, p.139-144, 2000b.

FELICORI, L.F.; SOUZA, C.T.; VELARDE, D.T.; MAGALHAES, A.; ALMEIDA, A.P.; FIGUEIREDO, S.; RICHARDSON, M.; DINIZ, C.R.; SANCHEZ, E.F. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. **Protein Expression and Purification**, v. 30(1), p. 32-42, 2003.

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

FIMLS, A.S. **Hematology. A combined theoretical & technical approach**. Philadelphia, W.B. Saunders, p.214-25, 1989.

FINNEY, D.J. Statistical method in biological assay. London: Charles Gríffins & Co., 1952.

FRANÇA, F. O., Associação da envenenomia e de gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantã de São Paulo, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, p. 187-190, 1998.

FULLY, A. L; MIRANDA, A.L.P.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochemical Pharmacolog**, v. 63, n. 9, p. 1589-1597, 2002.

GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; CAVÉ, A. Cohibins A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 44, n.8, p. 1541-1545, 1997.

GU, Z.; ZHOU, D.; LEWIS, N. J.; WU, J.; JOHNSON, H. A.; MCLAUGHLIN, J. L.; GORDON, J. Quantitative evaluation of annonaceous acetogenins in monthly sample of paw (*Asimina triloba*) twigs by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 10, p. 32–38, 1999.

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

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical chemistry: principles and technics**. 2.ed. New York, Harper & Row, 1974.

HERMOGENES, A.L.; RICHARDSON, M.; MAGALHAES, A.; YARLEQUE, A.; RODRIGUEZ, E.; SANCHEZ, E.F. Interaction of a plasminogen activator proteinase, LV-PA with human alpha2-macroglobulin. **Toxicon**; v. 47, n. 4, p. 490-4, 2006.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. **Immunobiology**. 5th ed. New York: Garland Science, 2001.

JORGE, M. T.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CASTRO, S. C. B.; FERRARI, R. A.; RIBEIRO, L. A.; WARRELL, D. A. Snakebite by the Bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. **Toxicon**, v. 35. (4), p. 545 - 554. 1997.

KIM, G.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. Two new monotetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 432–436, 1998.

LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M.C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; ZINGALI, R.B.; ROCHAT, H. **Animal Toxins: State of the Art- Perspectives in health and biotechnology**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009.

LIMA, M. A. C. **O cultivo da gravioleira**. **Rev. Bras. Frutic.** v. 26, n. 3, p. 385 – 566, 2004.

LIU, X.; ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Glacins A. and B.: Two novel bioactive monotetrahydrofuran acetogenins from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 620–624, 1998.

MAGALHAES, A.; FERREIRA, R.N.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; YARLEQUE, A.; MAGALHAES, H.P.; BLOCH, C.; SANCHEZ, E.F. Coagulant thrombin-like

enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n.2, p. 255-66, 2003.

MAGALHÃES. A.; OLIVEIRA. G. L.; DINIZ, C. R. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the bushmaster snake. *Lachesis muta noctivaga*. **Toxicon**, v. 19, p. 279-294, 1981.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v.30, n.10, p. 1131-1142, 1992.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1-2, p. 146-156, 2000.

MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution? **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 87-96, 2001.

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

MELLOR, N.H.; ARVIN, J.C. A Bushmaster bite during a birding expedition in lowland southeastern Peru. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 3, p. 236-240, 1996.

Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**, 2^a ed., Brasília, 2001

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

MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.R.; PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snakebite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

NAOUM, P.C. **Eletroforese**: técnicas e diagnósticos. São Paulo, Santos, 1990, p. 18-24

NBRP (The National Bioresource Project For The Rat In Japan). Disponível em : http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/strainsx/blood_d.aspx?BMP_BLOOD_ID=16&PTBiomedicalParamBloodD

[ir=Asc&PTBiomedicalParamBloodPageSize=20&s keyword=wtc](#) . Acesso em: 04 de dezembro de 2009.

NOGUEIRA, D.M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M.H.; ABDALLA, D.S.P.; HIRATA, R.D.C. In: Enzimologia. **Métodos de bioquímica clínica**: técnica e interpretação. São Paulo: Editora Pancast, cap. 9, p. 291-292, 1990.

OHTA, Y.; KAIDA, S.; CHIBA, S.; TADA, M.; TERUYA, A.; IMAI, Y.; KAWANISHI, M. Involvement of oxidative stress in increases in the serum levels of various enzymes and components in rats with water-immersion restraint stress. **J. Clin. Biochem. Nutr**, v.45, p. 347-354, 2009.

OREJUELA, P.; ZAVALETA, A.; SALAS, M.; MARSH, N. Thrombin-like activity in snake venoms from Peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. **Toxicon**, v. 29, n.9, p.1151-1154, 1991.

OSORIO, E.; ARANGO, G.J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUITÉRREZ, D.; PACO, M.A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 630-635, 2007.

OTERO, R.; FURTADO, M.F.D.; GONÇALVES, L.R.C.; NÚÑEZ, V.; GARCIA, M.E.; OSORIO, R.G.; ROMERO, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (Bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon**, v. 36, p. 2021-2027, 1998.

OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; NUÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S.P.; GARCÍA, M.E.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLER, G.; OSORIO, R.G.; DÍAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE, A.; VELEZ, H.N. Snakebite and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n.3, p. 493-504, 2000a.

OTERO, R.; NUÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A. Snakebite and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of the *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n.3, p. 505- 511, 2000b.

OTERO, R.; NUÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A. Snakebite and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of the *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n.1-2, p. 233-241, 2000c.

PADMA, P.; PRAMOD, N.P.; THYAGARAJAN, S.P.; KHOSA, R.L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 81-83, 1998.

PARDAL, P.P.O.; SOUZA, S.M.; MONTEIRO, M.R.C.C.; FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; TOMY, S.C.; SANO-MARTINS, I.S.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; COLOMBINI, M.; KODERA, N.F.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; VELARDE, D.T.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; WARREL, D.A. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the North eastern Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p. 28-42, 2004

PETERSON, G.L. Determination of Total Protein. In: **Methods in Enzimology: Enzyme Structure**, v. 91, Part I, (HIRS, C.H.W.; TIMASHEFF, S.N., Eds) Academic Press, New York, 1983.

PETRICEVICH, V.L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators Inflamm.**, 2010

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

QUEIROZ, E. F.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; LEPREVÔTE, O.; PAULO, M. Q. A new bistetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona salzmanii*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 710–713, 1999.

QUICK, A.J. The nature of the bleeding in jaundice. **Journal Of the American Medical Association**, v.110, p.1658, 1938.

RUCAVADO, A.; FLORES-SANCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHÃES, A.; GUTIERREZ, M.A. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v.37, p. 1297-1312, 1999.

SANCHEZ, E.F.; CORDEIRO, M.N.; OLIVEIRA, E.B.; JULIANO, L.; PRADO, E.S.; DINIZ, C.R. Proteolytic specificity of two hemorrhagic factors, LHF-I and LHF-II, isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Toxicon**, v. 33, p. 1061–1070, 1995a.

SANCHEZ, E.F.; COSTA, M.I.E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; ASSAKURA, M.; MANDELBAUM, F.R.; DINIZ, C.R.. Characterization of a hemorrhagic factor, LHF-I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. **Toxicon**, v. 33, p.1653–1667, 1995b.

SANCHEZ, E.F.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Toxicon**, v. 25, p. 611–619, 1987.

SANCHEZ, E.F.; SOUZA, C.T.; BELLO, C.A.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, E.B.; MAGALHÃES, A. Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. **Toxicon**, v. 41 (8), p. 1021–1031, 2003.

SANCHEZ, E.O.; MAGALHÃES, A. Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (Surucucu Pico de Jaca) *Lachesis muta muta* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 249–260, 1991.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8(2), p. 115–120, 2001

SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERRETI, M.; BISCOGLIO, M.J.; RIVERA, E.; CRESCENTI, E.J.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUITÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**, v. 71, n. 1, p. 46-60, 2008.

SHU, Y. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053–1071, 1998.

SOARES, M. R.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; WERMELINGER, L.S.; ZINGALI, R.B.; HO, P.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.; DINIZ, M.R.V. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 31-38, 2005.

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

SOUZA, R. C. G. Concerning *Lachesis* and Capoeira: An Anti-Article by a Brazilian Outsider. **Bull. Chicago Herpetological Society**, v. 41 (4), p. 65-68, 2006.

SOUZA, R. C. G. Aspectos clínicos do acidente laquético. 2008. Disponível em: www.lachesisbrasil.com.br. Acesso em: 25 de Janeiro de 2011.

STEPHANO, M.A.; GUIDOLIN, R.; HIGASHI, H.G.; TAMBOURGI, D.V.; SANT'ANNA, O.A. The improvement of the therapeutic anti-*Lachesis muta* serum production in horses. **Toxicon**; v. 45(4), p. 467-73, 2005.

TAKAHASHI, J.A.; PEREIRA, C.R.; PIMENTA, L.P.; BOAVENTURA, M.A.; SILVA, L.G. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Nat. Prod. Res.**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2006.

TAYLOR, L. Cancer Plants: Graviola, 2006. Disponível em: http://www.cancerplants.com/medicinal_plants/annona_muricata.html .Acesso em: 25 de Janeiro de 2011.

TORRES, J.R; TORRES, M.A; ARROYO-PAREJO, M.A. Coagulation disorders in bushmaster envenomation. **The Lancet**, v.346, 1995.

WEIL, C.S. Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. **Biometrics**, v. 9, p. 249-263, 1952.

WEINBERG, M.L.; PIRES, V.; WEINBER, J.; OLIVEIRA, A.B.O. Inhibition of drug-induced contractions of guinea-pig ileum by *Annona crassiflora* seed extract. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, p.70-72, 1993.

WEINBERG, M.L.; FELICORI, L.F.; BELLO, C.A.; MAGALHÃES, H.P.; ALMEIDA, A.P.; MAGALHÃES, A.; SANCHEZ, E.F. Biochemical properties of a bushmaster snake venom serine proteinase (LV-Ka), and its kinin releasing activity evaluated in rat mesenteric arterial rings. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.96, n.3, p. 333-42, 2004.

YARLEQUE, A.; CAMPOS, S.; SCOBAR, E.; LAZO, F.; SANCHEZ, N.; HYSLOP, S.; MARSH, N.A.; BUTTERWORTH, P.J.; PRICE, R.G. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). **Toxicon**, v. 27, p.1189-1197, 1989.

ZAFRA-POLO, M.C.; FIGADÈRE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J.R.; CORTÈS, D. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. **Phytochemistry**, v. 48, n.7, p. 1087-1117, 1998.

ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 62, p.421- 442, 1997.

ZENG, L.; WU, F.; GU, Z.; MCLAUGHLIN, L. Murihexocins A and B, two novel mono-THF acetogenins with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 30, p. 5291-5294, 1995.