



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Tabebuia aurea* SOBRE AS  
ATIVIDADES INFLAMATÓRIA, MIOTÓXICA E HEMORRÁGICA INDUZIDAS  
PELO VENENO DE *Bothrops neuwiedi***

Mestranda: Fernanda Paes Reis Freitas

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Cristina Toffoli Kadri

Agosto/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

---

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

---

Fernanda Paes Reis Freitas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica Cristina  
Toffoli Kadri

Agosto/2014

Fernanda Paes Reis Freitas

Avaliação do extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* sobre as atividades inflamatória, miotóxica e hemorrágica induzidas pelo veneno de *Bothrops neuwiedi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

### COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mônica Cristina Toffoli Kadri

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Luciane Candeloro Portugal

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Inês Lenz Souza

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Agosto/2014

## Dedicatória

*Aos meus pais, Maria Lourdes e Honório, pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsionaram em direção às vitórias dos meus desafios. Espero poder ter sido merecedora das coisas que tiveram que abrirem mão e de todo esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação. Meu amor, minha gratidão e respeito a vocês. Amo vocês!*

**A Deus**, pelo dom da vida e por ter ajudado a manter a fé nos momentos mais difíceis. Obrigada Senhor por me mostrar os caminhos certos nas horas incertas e por sempre me dar força interior para nunca desistir.

**A Nossa Senhora Aparecida**, que sempre me cobre com seu manto sagrado me protegendo. E por passar na frente abrindo caminhos, portas e mostrando as soluções de tudo aquilo que fui incapaz de resolver.

## Agradecimentos

**A minha orientadora, Mônica,** agora que estamos chegando ao fim desta trajetória, não poderia seguir, sem antes olhar saudosamente para trás e reviver muitos dos bons e difíceis momentos que dividimos. Embarcamos juntas neste projeto, e é bom que saibas que seu impulso sempre me permitiu seguir em frente. Eu preciso dizer: **MUITO OBRIGADA!** Pela confiança que depositou em mim. Suas palavras de ânimo nos momentos de dificuldades foram fontes renovadoras. Vou guardar com carinho seus ensinamentos acadêmicos e de vida. Para mim você não foi apenas minha orientadora tornou-se minha amiga, minha conselheira e acima de tudo um exemplo para todos que buscam uma vida vitoriosa!

**A minha irmã, Daniela,** por todo amor, carinho e amizade. Obrigada pelas palavras de conforto me tranquilizando nos momentos mais difíceis e por sempre me dar forças para continuar a lutar pelos meus ideais. Você para mim é um exemplo de mulher. Desculpe-me por todas as minhas chatices. Te amo mais que tudo manão!

**Ao meu noivo, Julio,** pelo companheirismo, paciência nos momentos de inquietação e pelo apoio. Obrigada por sempre me colocar para cima e por acreditar em mim mais do que eu acredito. ETA pra sempre.

**A minha sogra, Marlene,** primeiramente agradecer pelo filho maravilhoso que colocaste no mundo. Obrigada pelas constantes orações dedicadas a mim, para que eu não desistisse dos meus objetivos. E pela amizade e confiança.

**Ao meu cunhado, Christiano,** pelo carinho, pela amizade, pelo apoio constante e incentivo. Obrigada cunhadão!

**Aos queridos amigos, Luciana e Fernando,** muito obrigada pelo apoio e colaboração para a realização de alguns experimentos. Jamais esquecerei a amizade de vocês.

**Aos técnicos, Valter e Marcio,** pelo auxílio constante e por me ensinarem diversas técnicas para a realização deste trabalho.

**Aos alunos de iniciação científica, Iluska, Rafael e Denis,** pela ajuda na realização de parte dos experimentos. Obrigada pelo companheirismo e pela amizade. Em especial, gostaria de agradecer a Iluska, pra mim você é mais que amiga, uma irmã. Você possui um lugar especial no meu coração.

**A minha amiga de mestrado, Letícia,** com quem dividi momentos de descontração com suas músicas sertanejas, motivação e amizade. Obrigada pelos ensinamentos e por torcer sempre por mim.

**Ao secretário, Luiz,** por sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas. Obrigada pelos vários momentos de diálogo.

**Aos meus amigos, Marquinhos, Pati, Loris, Andreia, Kaka, Lilian e Dani,** por compreenderem minha ausência, mas que sempre estiveram por perto dispostos a me ajudar. Amo vocês!

A minha amiga muito especial, Érica, obrigada pela sua amizade sincera. Por sempre estar ao meu lado e por ajudar a realizar este sonho, sem sua ajuda não teria dado início a este trabalho.

Aos meus amigos de serviço, Elaine, Zeila, Greizielle, Paula, Vanessa, Maristela e Edison, por acreditarem que eu fosse capaz de realizar este mestrado. Sinto um carinho especial por vocês.

A todos da minha família, que me apoiaram na busca pelo conhecimento. Em especial, minha prima Inês, que sempre me incentivando com suas palavras de esperança para que esta etapa tão importante para mim finalizasse.

Ao CNPq e á FUNDECT, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.



“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

## RESUMO

REIS, Fernanda Paes. Avaliação do extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* sobre as atividades inflamatória, miotóxica e hemorrágica induzidas pelo veneno de *Bothrops neuwiedi*. 2014. 63p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Os acidentes ofídicos constituem um problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo, devido à frequência e gravidade dos seus efeitos. No Brasil, a maioria dos acidentes é causada pelo gênero *Bothrops*. Os venenos dessas serpentes induzem efeitos sistêmicos e reação inflamatória local acentuada. A terapia efetiva disponível é a soroterapia, porém, não neutraliza de modo eficaz os efeitos locais, mesmo se administrada logo após o acidente. A prática da utilização de plantas como antídoto para acidentes ofídicos é antiga e estudos etnobotânicos mostraram que o gênero *Tabebuia* possui atividade antiinflamatória e cicatrizante e é indicada para picadas de cobras. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* (EHETA) sobre as atividades inflamatória, miotóxica e hemorrágica induzidas pelo veneno de *Bothrops neuwiedi*, em camundongos. Os resultados indicaram uma redução do edema de pata em todo o período analisado, sendo significativa a partir dos 60 minutos. A concentração de 200 mg/Kg foi a mais efetiva. O veneno de *Bothrops neuwiedi* (VBn) neutralizado também reduziu o edema formado. Observou-se que o EHETA inibiu a migração de polimorfonucleares (PMN) em todos os ensaios quando comparados aos animais que receberam somente VBn. O VBn neutralizado não reduziu significativamente a área hemorrágica. No entanto, diminuiu a concentração de hemoglobina comparado ao VBn. Os valores de creatina quinase (CK) nos animais que receberam VBn neutralizado foi menor se comparado ao VBn, porém não foi estatisticamente significativo. A análise histopatológica mostrou que o EHETA preservou as fibras musculares, com a presença de edema focal e leve de infiltração de leucócitos. Já os animais que receberam VBn apresentaram infiltrado leucocitário intenso entre as fibras musculares e hemorragia. Nos animais tratados com VBn neutralizado, a área hemorrágica foi menor e multifocal e o infiltrado de leucócitos menos intenso. Em conclusão, o EHETA inibiu a resposta inflamatória e hemorrágica induzida por VBn em camundongos. A redução do efeito miotóxico foi observada na análise histopatológica. O VBn neutralizado inibiu a produção de peróxido de hidrogênio quando comparado ao VBn. Assim, nossos resultados revelaram que o EHETA pode ser um inibidor das ações locais do veneno de *Bothrops neuwiedi*.

**Palavras- chave:** Inflamação, Venenos ofídicos, Plantas medicinais, Ipê amarelo

## ABSTRACT

Reis, Fernanda Paes. Evaluation of hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* on inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by *Bothrops neuwiedi*. 2014. 63p. Master's thesis (Master of Science in Pharmacy) - Federal University of Mato Grosso do Sul, MS.

Snakebites are a public health problem in tropical regions of the world, due to the frequency and severity of its effects. In Brazil, the majority of accidents are caused by *Bothrops*. The venoms of these snakes induce systemic effects and severe local inflammatory reaction. Effective therapy is available antivenom, however, does not neutralize effectively the local effects, even if administered soon after the accident. The practice of using plants as an antidote for snakebites is old and ethnobotanical studies have shown that the genus *Tabebuia* has anti-inflammatory and healing activity and is indicated for snake bites. The aim of this study was to evaluate the effect of hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HETa) on inflammatory, hemorrhagic and myotoxic activities induced by *Bothrops neuwiedi* in mice. The results indicated a reduction of paw edema throughout the study period, being significant after 60 minutes. The concentration of 200 mg / kg was the most effective. The *Bothrops neuwiedi* (BnV) neutralized also reduced the edema formed. It was observed that the HETa inhibit the migration of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in all tests compared to animals that received only BnV. The neutralized BnV not significantly reduced the hemorrhagic area. However, decreased hemoglobin concentration compared to the BnV. The values of creatine kinase (CK) in animals that received neutralized BnV was lower compared to BnV, but not statistically significant. Histopathological analysis showed that Heta preserved muscle fibers, with the presence of focal edema and mild infiltration of leukocytes. The animals that received BnV showed intense leukocyte infiltrate between muscle fibers and hemorrhage. In animals treated with neutralized BnV, hemorrhagic area was smaller and multifocal infiltrates of leukocytes less intense. In conclusion, The HETa inhibited the inflammatory response induced by hemorrhage and BnV in mice. Reducing the myotoxic effect was observed histologically. The neutralized BnV inhibited the production of hydrogen peroxide when compared to the BnV. Thus, our results revealed that the HETa may be an inhibitor of the local action of *Bothrops neuwiedi*.

**Key-words:** Inflammation; Snake venoms; Herbs, Yellow ipe.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta no Brasil (BRASIL, 2011).
- Figura 2** *Bothrops neuwiedi* e distribuição da espécie no Brasil. Fonte: FUNASA 2001.
- Figura 3** *Tabebuia aurea*. A) Tronco com casca grossa (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Paratudo>), B) Espécie completa ([www.waynefort.com](http://www.waynefort.com)).
- Figura 4** Estrutura química da substância 6-O-E-*p*- cumaroilcatalpol.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| Asp              | Aspartato                                       |
| CK               | Creatina quinase                                |
| dL               | Decilitro                                       |
| EHETa            | Extrato Hidroetanólico da <i>Tabebuia aurea</i> |
| FUNASA           | Fundação Nacional da Saúde                      |
| NHF              | Fator hemorrágico Neuwiedi                      |
| IL-6             | Interleucina 6                                  |
| LPS              | Lipopolissacarídeo bacteriano                   |
| Lys              | Lisina  |
| MACs             | Moléculas de adesão                             |
| mAbs             | anticorpos monoclonais                          |
| MPVSs            | Metaloproteinases de venenos de serpentes       |
| NO               | Óxido nítrico                                   |
| OMS              | Organização Mundial da Saúde                    |
| PAF              | Fator ativador de plaquetas                     |
| PBS              | Solução salina tamponada                        |
| PLA <sub>2</sub> | Fosfolipase A <sub>2</sub>                      |
| Ser              | Serina  |
| SINAN            | Sistema Nacional de Notificações de Agravos     |
| VBn              | Veneno de <i>Bothrops neuwiedi</i>              |

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>i</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>ii</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                      | <b>iii</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>                                 | <b>iv</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>16</b>  |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                               | <b>17</b>  |
| <b>2.1 Acidentes Ofídicos .....</b>                                | <b>17</b>  |
| <b>2.2 Serpentes Botrópicas .....</b>                              | <b>18</b>  |
| 2.2.1 <i>Bothrops neuwiedi</i> .....                               | 18         |
| <b>2.3 Componentes dos Venenos Botrópicos .....</b>                | <b>19</b>  |
| 2.3.1 Metaloproteinases .....                                      | 20         |
| 2.3.2 Fosfolipases .....   | 21         |
| .  | .          |
| <b>2.4 Resposta Inflamatória ao Envenenamento Botrópico .....</b>  | <b>23</b>  |
| <b>2.5 Terapias Disponíveis para o Envenenamento Ofídico .....</b> | <b>24</b>  |
| 2.5.1 Soroterapia .....  | 24         |
| 2.5.2 Inibidores Ofídicos .....                                    | 27         |
| 2.5.3 Plantas Medicinais .....                                     | 27         |
| 2.5.3.1 <i>Tabebuia aurea</i> .....                                | 29         |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>   | <b>32</b>  |
| 3.1 Objetivo Geral .....   | 32         |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| 3.2 Objetivo Específicos .....      | 32        |
| <b>4 REFERÊNCIAS .....</b>          | <b>33</b> |
| <b>5 MANUSCRITO .....</b>           | <b>46</b> |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b> | <b>76</b> |
| <b>7 ANEXOS .....</b>               | <b>77</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos ainda são um problema de saúde pública em regiões tropicais, sendo importante causa de morbi-mortalidade e incluídos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista de doenças negligenciadas (HARRISON et al., 2009). O Sistema Nacional de Notificações de Agravos (SINAN) do Ministério da Saúde mostrou que em 2010 ocorreram 29.635 casos de acidentes ofídicos, sendo que 90,5% foram ocasionados por espécies do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2011). Estas serpentes fazem parte da família *Viperidae* e estão descritas mais de trinta espécies no Brasil (FUNASA, 2001).

No estado de Mato Grosso do Sul há relatos de acidentes com as espécies *Bothrops moojeni* (caiçaca), *Bothrops alternatus* (urutu), *Bothrops jararacussu* (surucucu) e *Bothrops neuwiedi* (boca de sapo) (CARDOSO et al., 2003). O veneno das serpentes é uma mistura complexa de proteínas que possuem várias atividades biológicas como miotóxica, coagulante, edemaciante (CAPRONI, 2009). Os efeitos sistêmicos desencadeados pelo envenenamento resultam em coagulopatia, hipotensão arterial, alterações hemodinâmicas, lesão aguda do miocárdio, insuficiência renal aguda e hemorragias distantes dos locais da picada (WARRELL, 2005). Os efeitos locais incluem dor, hemorragia, inflamação com predomínio de edema e influxo leucocitário para o local da picada e na maioria das vezes evolui resultando em necrose tecidual (GUTIERREZ; LOMONTE, 1989).

A soroterapia é o tratamento convencional utilizado em acidentes ofídicos que reverte os efeitos sistêmicos, porém, para os efeitos locais, essa eficácia não é observada (GUTIERREZ et al., 1981; 1986). No Brasil, a prática da utilização de plantas como antídoto para acidentes ofídicos é antiga e utilizada por populações nativas. Estes povos maceravam as plantas e o líquido obtido era utilizado por via oral ou na forma de cataplasma para ser aplicado sobre o local da picada (RIZZINI et al., 1988; RUPPELT et al., 1991; MARTZ, 1992).

Estudos etnobotânicos mostram que o gênero *Tabebuia* foi citado como anti-inflamatório e cicatrizante (NUNES et al., 2003), e a espécie *Tabebuia aurea* indicada para combater os efeitos da picada de cobra (AGRA et al, 2007;. HAJDU; HOHMANN, 2012), propriedades importantes para minimizar os efeitos locais causados envenenamento botrópico.



Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito do extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* em atividades inflamatória, hemorrágica e miotóxica induzida pelo veneno de *Bothrops neuwiedi*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Acidentes Ofídicos

Os acidentes ocasionados por serpentes peçonhentas constituem um sério problema de saúde pública principalmente em regiões tropicais, devido à frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam (FUNASA, 1998; PINHO, PEREIRA, 2001).

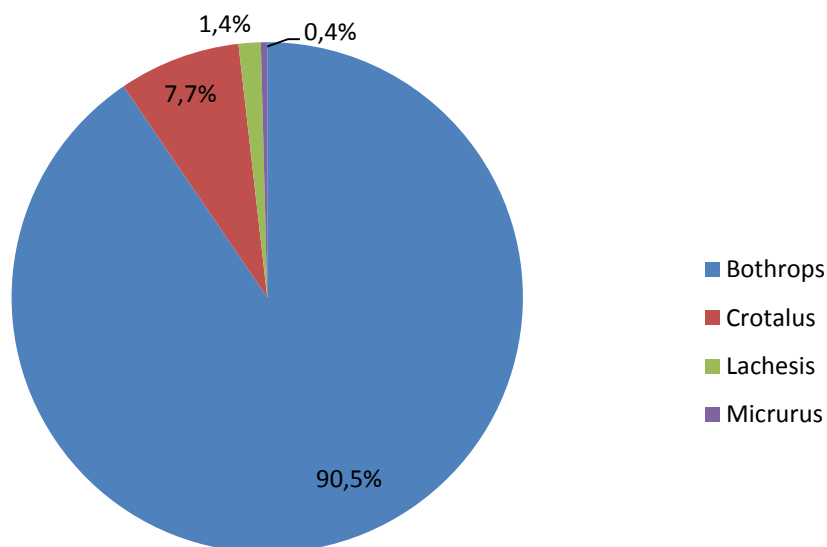
O envenenamento por picada de serpentes foi inserido na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS). O termo Doença Tropical Negligenciada refere-se às doenças infecciosas com maior prevalência nas regiões em que as latitudes variam entre 35°N e 35°S, nas quais a temperatura oscila entre 15°C e 40°C e que sem essas condições não possuem a capacidade de se proliferar e afetam quase que exclusivamente pessoas de baixa renda e que habitam a zona rural (OMS, 2007).

No Brasil são estimadas 371 espécies de serpentes, sendo 55 peçonhentas. Dessas, 27 espécies pertencem à família Elapidae e 28 à família Viperidae, e podem causar envenenamentos em seres humanos (BERNARDE; GOMES, 2012).

De acordo com dados fornecidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), em 2010 ocorreram no Brasil 29.635 casos de envenenamento por serpentes, sendo que 85% foram ocasionados por serpentes peçonhentas, 4% por não peçonhentas e 11% por serpentes não identificadas. Em relação aos acidentes com serpentes peçonhentas, a taxa de letalidade é baixa (0,49%), no entanto, há um grande índice de sequelas deixadas pelos mesmos, como paralisia e a amputação do membro afetado (PINHO, PEREIRA, 2001; KOH et al., 2006; KATURIRATNE et al., 2008; GUTIERREZ; LEÓN, 2009).

Os venenos das serpentes podem ser classificados conforme a atividade fisiopatológica como sendo proteolítico, coagulante e hemorrágico (*Bothrops*); neurotóxico (*Micrurus*) ou neurotóxico, miotóxico e coagulante (*Crotalus*) (BERNARDE, 2009).

Conforme dados providos do Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), podem ser observados na Figura 1 que 90,5% dos acidentes ofídicos são ocasionados pela serpente do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2011).



**Figura 1:** Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta no Brasil (BRASIL, 2011).

## 2.2 Serpentes Botrópicas

O gênero *Bothrops* (família Viperidae, subfamília Crotalinae) compreende cerca de 30 espécies distribuídas por todo território nacional e possui grande relevância epidemiológica, pois 90% dos acidentes ofídicos são causados por essas espécies (FUNASA, 2001).

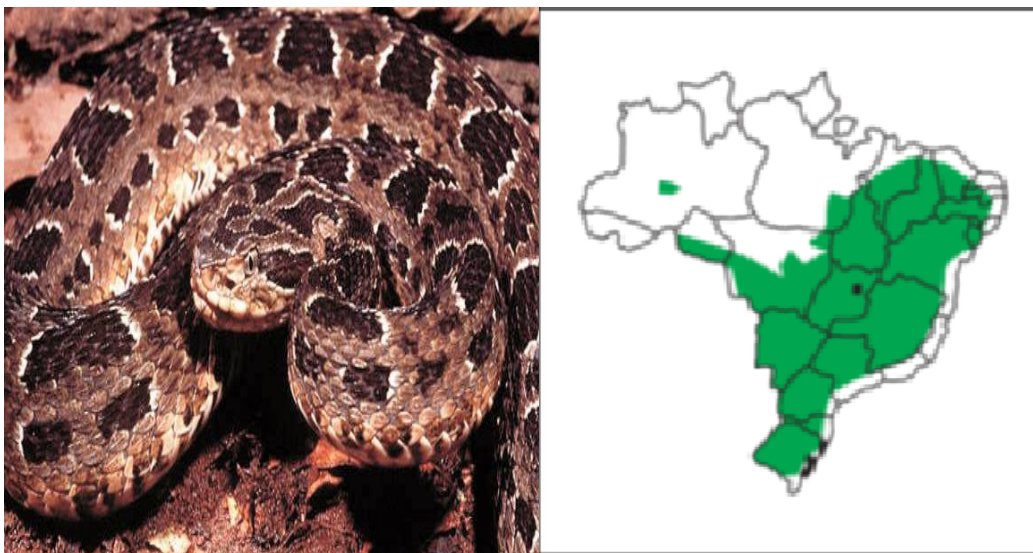
Na região Centro Oeste, os acidentes por serpentes ocorrem com as espécies *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops jararacuçu*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* (CARDOSO et al., 2003).

### 2.2.1 *Bothrops neuwiedi*

A *Bothrops neuwiedi* (Figura 2) é popularmente conhecida como jararaca do rabo branco, jararaca pintada, boca de sapo, rabo de osso e é encontrada em locais semiáridos e secos, rochosos, cerrado e em florestas dos países da América do Sul (CAMPBELL;

LAMAR, 1989; LEMAS, 2002; VALE; BRITES, 2008). Essa serpente pode medir 1,60 metros, a coloração pode variar entre cinza, marrom ou pardo de acordo com a subespécie, possuem manchas triangulares escuras e ventre amarelado (BELLUOMINI, 1984).

Sua alimentação é de pequenos lagartos, anfíbios e roedores, a reprodução é vivípara e os filhotes (16 a 20) nascem no início da estação chuvosa (BELLUOMINI, 1984).



**Figura 2:** *Bothrops neuwiedi* e distribuição da espécie no Brasil. Fonte: FUNASA 2001.

### 2.3 Componentes dos Venenos Botrópicos

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* são misturas complexas compostas por proteínas com atividades proteolítica, procoagulante e hemorrágica e não proteínas com a função de digestão e paralisia da presa. A parte proteica compreende cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno e é constituída por proteínas com ou sem atividade enzimática e peptídeos, responsáveis por quase todos os efeitos biológicos do veneno. A parte não proteica corresponde a 0,5 a 1% do peso seco do veneno é composta por carboidratos, lipídios, nucleotídeos, íons inorgânicos, como cálcio, zinco, sódio entre outros e interferem no sistema nervoso central, cardiovascular, muscular, hemostático, renal e vascular. Os metais não são encontrados em todos os tipos de veneno e a quantidade varia de acordo com a espécie da serpente (BJARNASON; FOX, 1994; KOH et al., 2006; CALVETE ET al., 2007).

Os componentes presentes nos venenos das serpentes da família Viperidae responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos são as metaloproteinases, as serinoproteinases, as fosfolipases A<sub>2</sub> e a lectina C (GUTIERREZ, 2002). Os efeitos produzidos pelo veneno dependem desses elementos, da interação entre os mesmos e da quantidade de cada um presente no momento da picada, pois, podem variar de acordo com a origem geográfica, o hábitat, a variação sazonal, a dieta, a idade e o sexo (FURTADO; TRAVAGLIA-CARDOSO; ROCHA, 2006).

Considerando o veneno de *Bothrops neuwiedi*, Mandebaum et al. (1984) isolaram o fator hemorrágico NHF (neuwiedi hemorrhagic factor) que é capaz de induzir hemorragia, mionecrose. A presença de duas fosfolipases, BNpTX-I e BNpTX-II (RODRIGUES et al., 2004), uma metaloproteinase da classe P-I denominada neuwidase (RODRIGUES et al., 2000), duas miotoxinas, BnSP-6 e BnSP-7 (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003) também foram encontrada nesse veneno botrópico. Ainda, Ferreira et al. (1998) identificaram os peptídeos potencializadores da bradicinina BPP-II, BPP-III e BPP-IV.

### 2.3.1 Metaloproteinases

As metaloproteinases de venenos de serpentes (MPVS) são hidrolases do tipo endopeptitases, que para serem ativas necessitam da ligação com um metal, geralmente, o zinco em seu sítio catalítico. São responsáveis pela fisiopatologia do veneno causando ativação do sistema complemento, edema, hemorragia local e sistêmica e dermonecrose nas vítimas. (SERRANO; FOX, 2005).

As MPVS são classificadas de acordo com sua massa molecular e a organização de seus domínios estruturais em classe P-I, P-II, P-III e P-IV. As MPVSs da classe P-I apresentam somente o domínio metaloproteinase e possui baixa ou nenhuma atividade hemorrágica, mas induzem danos nas células musculares (mionecrose) e também reduzem a capacidade de regeneração do tecido muscular (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000). A classe P-II apresenta além do domínio metaloproteinase, o domínio tipo desintegrina, responsável por ligar-se ao receptor GBaIIb/IIIβ da plaqueta impedindo a ligação com a molécula de fibrinogênio, inibindo a agregação e possui atividade hemorrágica (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000; FOX; SERRANO, 2008). As MPVS da classe P-III possuem três domínios: metaloproteásico, desintegrina e carboxi-terminal rico em cisteína.

Este domínio pode ter a função de estabilizar o domínio desintegrina. São consideradas altamente hemorrágicas (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000; FOX; SERRANO, 2008).

As metaloproteinases pertencentes à classe P-IV, possuem a maior massa molecular, superior a 90 kDa, porém com pequena atividade hemorrágica. Além dos três domínios citados acima, existem dois domínios lectina (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000).

As metaloproteinases desencadeiam a hemorragia por ação direta sobre as células endoteliais dos capilares e por degradação da membrana basal. É conhecido que a degradação da membrana basal ocorre principalmente pela quebra do colágeno tipo IV e laminina (KAMIGUTI, 2005). Essa destruição da membrana basal gera um deslocamento e lise das células endoteliais dos capilares sanguíneos, resultando na morte celular e o extravasamento de plasma e de células sanguíneas para o tecido conjuntivo, evidenciando a hemorragia por ruptura (SERRANO et al. 1993).

### **2.3.2 Fosfolipases A<sub>2</sub>**

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são enzimas termolábeis importantes constituintes do veneno botrópicos. As PLA<sub>2</sub> são dependentes de cálcio, hidrolisam fosfolipídeos na posição sn-2 da ligação acil éster de membranas celulares, gerando precursores para a formação de prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e outros importantes mediadores de fenômenos fisiológicos, principalmente, nos processos inflamatórios (CASTRO, 2011).

As PLA<sub>2</sub> iniciam a cascata inflamatória pelo aumento da permeabilidade microvascular com recrutamento de leucócitos para os tecidos e liberação de mediadores inflamatórios, causando alterações locais e sistêmicas na vítima. As PLA<sub>2</sub> são encontradas no interior da célula (PLA<sub>2</sub> intracelular ou citosólica – cPLA<sub>2</sub>) e no exterior da célula (PLA<sub>2</sub> extracelular ou secretória). As PLA<sub>2</sub> intracelular apresentam massa molecular de 85 kDa, estão presentes em várias células, são cálcio dependentes e geralmente estão associadas às membranas celulares. Estão envolvidas no metabolismo de fosfolipídios e na sinalização celular (SIX; DENNIS, 2000). Já as PLA<sub>2</sub> extracelulares são enzimas presentes nos fluidos de secreções pancreáticas, exsudatos inflamatórios e em venenos de serpentes e lagartos (CASTRO et al., 2000). Possuem massa molecular de 12 a 15 kDa e atuam principalmente sobre os fosfolipídios hidrolisando a ligação éster sn-2 (OWNBY et al., 1999).

As PLA<sub>2</sub> extracelulares pertencem aos grupos I e II possuem baixo peso molecular (14 kDa) e apresentam efeitos biológicos, como neurotóxico, cardiotoxíco, miotóxico, indutor ou inibidor da agregação plaquetária, hemolítico, anticoagulante, convulsivante e hipotensor (OWNBY et al., 1999; KINI, 2003; MARCUSSI et al., 2007; BURKE; DENNIS, 2009).

As PLA<sub>2</sub> que pertencem ao grupo II promovem intensa mionecrose local. Estas proteínas foram subdivididas em dois subgrupos conforme a presença ou não de atividade neurotóxica (SOARES et al., 2000; GUTIERREZ et al., 2008). As fosfolipases miotóxicas com atividades neurotóxicas são proteínas multiméricas, contendo 120 aminoácidos, estão presentes nos venenos das serpentes da família Elapidae, sendo responsáveis pelo seu efeito letal e atuam junção muscular, causando lesão muscular esquelética. Além de ser encontrada nos venenos crotálicos, estão presentes em algumas serpentes botrópicas, como por exemplo, *Bothrops insularis* (COGO et al., 1998; SALVINI et al., 2001).

As fosfolipases miotóxicas sem atividades neurotóxicas são proteínas diméricas, contendo 120 aminoácidos, presentes nos venenos crotálicos e botrópicos, necessitam de altas doses para agir, têm menor participação na mortalidade direta destes venenos e possuem um menor potencial mionecrótico quando comparados com a de ação neurotóxica (OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2000; LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

Por fim, as PLA<sub>2</sub> miotóxicas foram classificadas de acordo com a sequência de resíduos de aminoácidos, I) as denominadas PLA<sub>2</sub> ASP49 por apresentarem um resíduo de ácido aspártico conservado na posição 49 e são cataliticamente ativas; II) as denominadas PLA<sub>2</sub> Lys49 ou também como PLA<sub>2</sub> homólogas, apresentam substituição deste resíduo por lisina e III) as conhecidas como PLA<sub>2</sub> Ser49 recebem a serina na posição 49, essas duas últimas são cataliticamente inativas (LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

A ação mionecrótica das PLAs Lys49 e PLA<sub>2</sub> Ser49 decorre por uma via catalítica independente da atividade enzimática, acompanhado, *in vivo*, por edema, hiperalgesia, liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, podendo ser letal quando injetados via endovenosa ou por via intraperitoneal em camundongos (LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

O isolamento e a caracterização das fosfolipases homólogas básicas dos venenos da *Bothrops jararacussu* (bothroptoxin-I - BthTX-I), *Bothrops asper* (miotoxina-II -

BaspTX-II), *Bothrops moojeni* (miotoxina-I e II - MjTX-I e II), *Bothrops pirajai* (piratoxina-I - PrTX-I) e *Bothrops neuwiedi* (miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7), evidenciaram a atividade miotóxica das PLA<sub>2</sub> Lys49 (MAGRO et al., 2003).

O principal alvo das PLA<sub>2</sub>s Lys49 está situado no exterior da célula e pode agir de três maneiras. A primeira pode ser pela sua atividade catalítica na liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídicos ativos com potente ação biológica. A segunda é a ligação interfacial com as camadas lipídicas das membranas celulares, com ou sem hidrólise de fosfolipídicos, afetando as funções celulares ou integridade das membranas celulares. E a última, a ligação às proteínas específicas nas superfícies celulares, que atuam como receptores ligados à membrana (VALENTIN; LAMBEAU, 2000). A zona de ligação da PLA<sub>2</sub> ao receptor, denominada região CRD, também se liga à região de ligação ao cálcio, e assim sua atividade catalítica é inibida, porém a atividade endocitária persiste. Esse processo permite um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio para o interior da célula, gerando alterações intracelulares irreversíveis e morte celular (LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

#### **2.4 Resposta Inflamatória ao Envenenamento Botrópico**

A reação inflamatória no local da picada é a principal característica do envenenamento por serpentes botrópicas, apresentando vasodilatação, edema e exsudado purulento, cuja gravidade está diretamente relacionada à quantidade de veneno injetada, bem como o local da picada. A dor local é também referida nos envenenamentos botrópicos (ROSENFELD, 1971; FRANÇA, MÁLAQUE, 2009). Um aspecto importante da reação inflamatória desencadeada pelos venenos botrópicos, é o fato da mesma não ser modulada, em sua fase aguda, por glicocorticóides (CURY et al., 1997), o que pode contribuir para a sua expressão exacerbada.

O processo inflamatório induzido pelos venenos botrópicos ocorre devido às ações de várias toxinas presentes no veneno, em adição aos diversos mediadores químicos produzidos ou liberados, localmente, pelos componentes dos venenos (GUTIERREZ; LOMONTE, 1989; DIAS da SILVA et al., 1995; TEIXEIRA et al., 2003, 2009). Dentre os mediadores liberados por esses venenos, que contribuem para o desenvolvimento da reação local inflamatória estão os mediadores lipídicos, eicosanoides, derivados da ciclooxigenase e lipoxigenase (prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente), o fator ativador de plaquetas (PAF), aminas vasoativas,

mediadores alfa e/ou  $\beta$ -adrenérgicos e citocinas (TREBIEN; CALIXTO 1989; LOMONTE et al., 1993; CHAVES et al., 1995; BARROS et al., 1998; PETRICEVICH et al., 2000; MOREIRA et al., 2007, 2009, 2013).

Vários estudos descreveram a presença de leucócitos no local da injeção do veneno botrópico de diferentes espécies (FLORES et al., 1993; ACOSTA DE PÉREZ et al., 1996; FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2002, MOREIRA et al., 2013), que em situações particulares de ativação, podem contribuir para a evolução das lesões teciduais e/ou vasculares causadas pelos diferentes componentes dos venenos (ZAMUNER et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2005, MOREIRA et al., 2013). Uma vez ativadas, as células inflamatórias aumentam o metabolismo oxidativo, produzindo ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e derivados do óxido nítrico (ZAMUNER et al., 2001, SETUBAL et al., 2013). Adicionalmente, liberam diversas enzimas líticas contidas em grânulos específicos (COTRAN *et al.*, 1994), além de serem importantes fontes de mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas potencializando a lesão e a resposta inflamatória local (ZAMUNER et al., 2001, MOREIRA et al., 2009, 2013, SETUBAL et al., 2013).

Ainda, a migração leucocitária é dependente da expressão de moléculas de adesão por leucócitos e células endoteliais. Algumas famílias de moléculas de adesão foram caracterizadas como família das selectinas, a das integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (SPRINGER, 1994). Nesse sentido, a literatura relata a participação de algumas dessas moléculas de adesão na migração de leucócitos, induzida por venenos botrópicos, como demonstrado por Zamuner et al. (2005). Esses autores mostraram que a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida pelo veneno da serpente *B. asper*, depende da expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1, CD18, ICAM-1 e PECAM-1. Ainda, observaram que migração leucocitária induzida pelo veneno da serpente *B. jararaca*, depende das mesmas moléculas de adesão, com exceção da molécula CD18 (ZAMUNER et al., 2002).

As moléculas de adesão (MACs) são receptores glicoproteicos, na membrana de leucócitos e de células endotelial e, devido à ação dos mediadores inflamatórios, estas moléculas interagem entre si e estimulam o fenômeno da migração leucocitária (MOSER et al., 2004). As selectinas são encontradas em leucócitos circulantes e, particularmente nas células endoteliais, são responsáveis pelo comportamento de rolamento (BUTCHER, 1991). As integrinas são expressas nas células endoteliais e alguns tipos de leucócitos, determinam a aderência e diapedese (HYNES, 1992). As imunoglobulinas compreendem moléculas de adesão expressas na



célula endotelial e alguns tipos de leucócitos. Essas moléculas são responsáveis pela adesão do leucócito ao endotélio e transmigração destas células através das células endoteliais (ALBELDA et al., 1994).

## **2.5 Terapias Disponíveis Para o Envenenamento Ofídico**

A busca pelo tratamento de envenenamentos ofídicos é bastante antiga. No período colonial, o ofidismo no Brasil foi responsável por um número significativo de óbitos, sendo considerado um dos grandes problemas da época. Os cuidados e tratamentos eram baseados, principalmente, em ervas e rituais, na tentativa de minimizar os efeitos dos envenenamentos ofídicos (SANTOS, 1991).

### **2.5.1 Soroterapia**

O primeiro estudo com soro antiveneno foi realizado por Sewall em 1887, que demonstrou os princípios da soroterapia em pombos inoculados com veneno de *Sistrurus catenatus*, uma cascavel norte-americana. Observou-se que tal procedimento induzia um estado de resistência contra os efeitos da peçonha, sem aparente influência sobre o estado de saúde dos animais (HAWGOOD, 1999).

Os médicos franceses Phisalix e Bertrand, em 1894, demonstraram a atividade antiofídica do sangue de animais imunizados contra o veneno *Vipera aspis*. Concomitantemente, Calmette verificou que doses repetidas do veneno de *Naja tripudians* injetadas em cavalo conferiam imunidade aos animais e destes obteve o soro capaz de neutralizar o veneno da espécie *Naja*. Esses resultados foram utilizados como base para produzir em 1896 o primeiro soro antiveneno ofídico para uso médico (HAWGOOD, 1999).

No Brasil, o protocolo de Calmette para a produção de soro antiveneno ofídico foi seguido pelo médico sanitariano Vital Brazil. Em 1901, foi iniciada a produção de soro antiofídico no Instituto Butantan, São Paulo (HAWGOOD, 1992).

Em 1903, Vital Brazil demonstrou a especificidade dos soros antivenenos, ao verificar que o soro do animal imunizado contra o veneno da jararaca não tinha ação sobre o veneno da cascavel, bem como o soro ativo contra o veneno crotálico se mostrou inócuo sobre o veneno botrópico. A partir dessa descoberta, foi iniciada a produção de antivenenos mono e polivalentes para uso médico (HAWGOOD, 1992).

O soro antibotrópico é obtido através da imunização de cavalos com um pool de antígenos composto pelos venenos provenientes das cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%) e *Bothrops alternatus* (12,5%), capazes de neutralizar a atividade letal dos outros venenos botrópicos (CAMEY; VELARDE; SANCHEZ, 2002).

A terapia efetiva disponível, ainda hoje, é a soroterapia com antiveneno poliespecífico. A soroterapia reduz os efeitos sistêmicos e a letalidade no envenenamento botrópico. No entanto, o soro antibotrópico, diferentemente de sua ação no quadro sistêmico, não neutraliza de modo eficaz as reações locais, mesmo quando administrado logo após o acidente (DA SILVA et al., 2007). A eficácia do tratamento está relacionada entre muitos fatores, com o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento e quantidade de veneno inoculado (FRANÇA, 1998).

Além disso, o alto custo e a termolabilidade dos soros, dificultam a distribuição e armazenamento gerando transtorno nos tratamentos das vítimas em regiões distantes da rede hospitalar (MORAIS; MASSALDI, 2009).

A soroterapia consiste em injetar no paciente um soro antiveneno composto por anticorpos, ou fragmentos de anticorpos policlonais produzidos principalmente em equínos (RUCAVADO; LOMONTE, 1996). No entanto, o soro apresenta substâncias heterólogas ao paciente, como os próprios anticorpos equinos, e devido à necessidade de se aplicar doses repetidas, esse tratamento pode gerar respostas imunológicas adversas (TAMAROZZI et al., 2006).

A frequência relatada dessas respostas é variável e pode ser desde urticária, tremores, tosse, náuseas, dor abdominal, prurido e rubor facial, até respostas graves, mais raramente, semelhantes à reação anafilática, com arritmias cardíacas, hipotensão arterial, insuficiência renal e choque e/ou quadro obstrutivo das vias respiratórias. Devido às consequências causadas pelos acidentes ofídicos e as reações derivadas do tratamento soroterápico

tradicional, a busca por tratamentos alternativos tem aumentado, como exemplo, o uso de inibidores naturais de origem animal e vegetal (LOMONTE et al., 2009).

### 2.5.2 Inibidores Ofídicos

Dentre os inibidores ofídicos estão alguns polissacarídeos aniônicos como a heparina, que já demonstrou ser um inibidor da atividade catalítica da PLA<sub>2</sub> de *B. jararacussu* (MELO et al., 1993) e de *B. asper* (LOMONTE et al., 1994); alguns polissacarídeos sulfatados como o fucoidan, que se mostrou capaz de neutralizar os efeitos citotóxico e miotóxico da PLA<sub>2</sub> de vários venenos crotálicos por se ligar à região C-terminal da proteína, citada anteriormente como responsável pela interação e desestabilização da membrana plasmática (ÂNGULO; LOMONTE, 2003); e alguns peptídeos inibitórios encontrados nas próprias serpentes, como o AnMIP isolado do plasma de *Atropoides nummifer* da América Central, que se mostrou capaz de inibir não só a PLA<sub>2</sub> isolada da própria *A. nummifer* como também de *B. asper* (QUIRÓS et al., 2007).

Ainda, tem sido proposto o uso de anticorpos específicos para as enzimas responsáveis pelas ações fisiopatológicas do veneno (como a PLA<sub>2</sub>) e menos imunogênicos ao paciente, como os anticorpos monoclonais (mAbs), anticorpos específicos produzidos por um único clone de células B. Essas imunoglobulinas tem se mostrado tão eficazes na neutralização dos efeitos do envenenamento quanto os soros policlonais presentes nos antivenenos (TAMAROZZI et al., 2006), inibindo a atividade miotóxica da PLA<sub>2</sub> em mais de 80%, em experimentos realizados em camundongos (KANASHIRO et al., 2002).

### 2.5.3 Plantas Mediciniais

As plantas medicinais são fontes de compostos ativos potenciais no auxílio ao tratamento do envenenamento ofídico como complementação da soroterapia convencional. Esse tratamento é utilizado para minimizar os efeitos locais como dor, edema, necrose e hemorragia induzido pelo veneno (MARTZ, 1992; MORS et al., 2000; OTERO et al., 2000; SOARES et al., 2005; 2009).

Os extratos provenientes das plantas são compostos por diversos componentes químicos, como taninos, flavonóides, triterpenos, alcalóides, lignanas, que podem inibir os

efeitos do veneno, agindo como inibidores enzimáticos, inativadores químicos ou imunomoduladores, que interagem diretamente com macromoléculas alvo (MORS et al., 2000).

Nesse sentido, Mors (1991) listou aproximadamente 600 espécies de plantas com ação antiofídica. Corroborando, Otero et al. (2000) listaram as plantas antiofídicas com informações sobre o nome popular, uso indicado, via de administração e localização citadas por curandeiros colombianos. O uso indicado, em sua maioria, foi por infusão, decocção, maceração e administração via oral. Ainda, houve relatos sobre o uso direto sobre o local da picada, com banhos e/ou vapor localizados e aplicação de compressas umedecidas com o com o extrato da planta.

Na literatura, há descrição de diversos estudos que mostram os efeitos inibitórios das plantas sobre as atividades miotóxica, hemorrágica, fosfolipásica e outras induzidas por diferentes venenos botrópicos (MORS et al., 1989; MELO et al., 1994; BIONDO et al., 2003; 2004; JANUARIO et al., 2004; NISHIJIMA et al., 2009; DA SILVA et al., 2008; TOYAMA et al., 2009). Como exemplos temos a *Casearia sylvestris* que inibiu o edema e a permeabilidade vascular induzida pelo veneno botrópico (RODRIGUEZ et al., 1997; BORGES et al., 2000), a *Casearia mariquitensis* que inibiu os efeitos tóxicos derivados de metaloproteases isoladas de *B. neuwiedi* (IZIDORO et al., 2003), a *Hibiscus esculentus* que apresentou eficácia na neutralização do veneno de *B. jararaca* (PEREIRA et al., 1994).

Pesquisadores colombianos demonstraram que os extratos de *Brownea rosademonte*, *Bixa orellana* e *Ficus nymphaeifolia* neutralizaram a hemorragia causada pelo veneno de *Bothrops atrox* e os extratos de *Brownea rosademonte* e *Pleopeltis percussa* inibiram a atividade proteolítica do veneno *B. atrox* (OTERO; FONNEGRA; JIMENEZ, 2000).

Veronese et al. (2005) observaram o efeito inibitório do extrato aquoso de *Tabernaemontana catharinensis* sobre a ação miotóxica *in vivo* induzida pelo veneno de *B. jararacussu*. O ativo isolado da *Cordia verbenacea*, o ácido rosmarínico foi capaz de inibir o edema induzido pelo veneno de *B. jararacussu* e suas principais fosfolipases A<sub>2</sub> (bothropstoxinas I e II) (TICLI et al., 2005).

Em 2009, Nishijima et al. mostraram que os extratos metanólicos de *Mouriri pusa*, *Byrsonima crassa*, *Davilla elliptica* e *Strychnos pseudoquina* neutralizaram as atividades hemorrágicas do veneno de *B. jararaca*. A *Calendula officinalis* diminuiu a atividade

miotóxica do veneno de *B. leucurus* (MISE; LIRA-DA-SILVA; CASAIS-E-SILVA, 2009).

Estudos realizados por Nazato et al. (2010) mostraram que os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos contidos no extrato metanólico da casca de *Dipteryx alata*, foram capazes de reduzir a ação miotóxica induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu*.

Mendes et al. (2013), demonstraram a atividade do composto triacontil *p*-cumarato isolado do extrato da casca da raiz de *Bombacopsis cumarato*, sobre a atividade hemorrágica e miotóxica induzido por *Bothropoides pauloensis*.

### **2.5.3.1 *Tabebuia aurea***

No Brasil, a família Bignoniaceae compreende 33 gêneros e aproximadamente 350 espécies, possui um grande potencial medicinal, tornando um objeto de estudo de muitos pesquisadores devido seu potencial fitoterápico (LOHMANN; SILVA-CASTRO, 2009; JORGE, 2000).

O gênero *Tabebuia* é um dos representantes do estado de Mato Grosso do Sul e inclui várias espécies. Sua intensa floração ocorre anualmente entre os meses de agosto e novembro, com a planta desprovida de folhagem (SOARES et al., 2006).

A espécie *Tabebuia aurea* é conhecida popularmente por caraíba, caribeira, carnaúba-do-campo, caroba-do-campo, cinco-em-rama, ipê, ipê-do-cerrado, paratudo, pau-d'arco e ipê amarelo (LORENZI, 1992; ALMEIDA et al., 1998).

A floração proporciona além da beleza a composição estrutural dos paratudais, a espécie é considerada medicinal e melífera. Popularmente é utilizada como antianêmica, antitérmica, diurética, vermífuga e purgativa, contra gripe, resfriado e inflamações em geral (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI; ABREU MATOS, 2002).

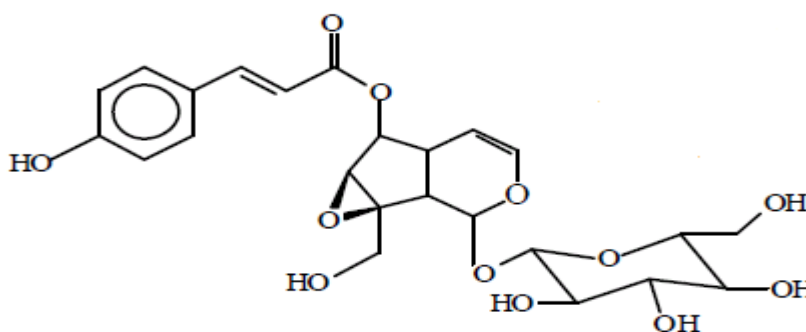


**Figura 3:** *Tabebuia aurea*. A) Tronco com casca grossa (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Paratudo>)  
B) Espécie completa ([www.waynefort.com](http://www.waynefort.com)).

Guerbas-Neto (2003) isolou da casca de *Tabebuia aurea*, coletado no Pantanal, alguns compostos de diferentes classes químicas como os triterpenos ( $\beta$ -amirina,  $\beta$ -amirona, ácidos aleanólico, ácido betulínica e ácido siaressinólico), sesquiterpeno (ácido cóstico), esteróide ( $\beta$ -sitosterol) e iridóides (6-O-E-p coumaroiljuglutin, rehmaglutin-D, juglutin-D e 6-O-E-p-cumaroilcatalpol).

O iridóide 6-O-E-p-cumaroiljuglutin caracterizado como uma substância inédita, enquanto os rehmaglutin-D e juglutin-D foram relatados pela primeira vez no gênero *Tabebuia* (GARCEZ et al., 2007)

No entanto, El-Naggar E Doskotch (1980) isolaram da casca do caule de *Tabebuia avellanadae*, uma substância denominada de especiosídeo. A substância, 6-O-E-p-cumaroilcatalpol (Figura 3), conhecida como especiosídeo foi isolado da casca do caule de *Tabebuia aurea* por Guerbas-Neto (2003).



**Figura 4:** 6-O-E-p- cumaroilcatalpol

Conforme levantamento realizado em Campo Grande, município de Mato Grosso do Sul, para a identificação do perfil regional de consumo de plantas solicitadas aos raizeiros e, neste estudo, o gênero *Tabebuia* foi citado como anti-inflamatório e cicatrizante (NUNES *et al.*, 2003) propriedades importantes para minimizar as reações locais provocadas pelo envenenamento botrópico.

Com base nestas informações, os extratos vegetais podem ser uma forma alternativa no tratamento de envenenamento ofídico ou como complemento a soroterapia convencional, por apresentarem diversos compostos químicos com uma variedade de propriedades farmacológicas de interesse medicinal (MELO *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 2004).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* (EHETa) sobre as atividades inflamatória, miotóxica e hemorrágica induzidas pelo veneno de *Bothrops neuwiedi* (VBn) em camundongos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Após o pré-tratamento dos camundongos com EHETa:

Determinar o influxo leucocitário induzido por VBn

Avaliar o edema de pata induzido por VBn

- Avaliar a atividade hemorrágica do VBn neutralizado
- Avaliar a atividade miotóxica do VBn neutralizado
- Avaliar a produção de peróxido de hidrogênio por leucócitos peritoneais de camundongos após exposição aos venenos botrópicos com e sem EHETa



#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLER, P.; KOSCINCZUK, P.; NEGRETTE, M. S.; TRULLS, H.; MARUÑAK, S. Edema and myonecrosis induced by *Bothrops jararaca* venom of Argentina in mice. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.**, v. 46, p. 233-238, 1996.

AGRA MF, BRACHO GS, NURIT, K, BASILIO, IJLD, COELHO, VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraibano, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.383-395., 2007.

ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammation injury. **FASEB J.**, v.8, p. 504-512, 1994. Review.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado. Espécies vegetais úteis**. Planaltina, Embrapa, 1998.

ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochemical Pharmacology**, v. 66 (15), p. 1993-200, 2003.

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.

BELLUOMINI, H. E. Conhecimento sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, v. 12, n.45, p. 82-96, 1984.

BERNARDE, P. S.; GOMES, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**. Vol.42(1): 65-72, 2012.

BERNARDE. Paulo Sérgio. **Apostila Acidentes Ofídicos**. Laboratório de Herpetologia-Centro Multidisciplinar – Campus Floresta, Universidade Federal do Acre – UFAC. 2009.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocinaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, p. 1017-1025, 2003.

BIONDO, R.; SOARES, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation by direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and

effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant. Cell. Rep.**, v. 22, p. 549-552, 2004.

BJARNASON, J. B.; FOX, W. J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 26, p. 325-372, 1994.

BORGES, M. H.; SOARES, V. M.; RODRIGUES, S. H.; ANDRIÃO-ESCARSO, H.; DINIZ, A. HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, S.; LIZANO, J. M.; GUTIERREZ, J. R.; GIGLIO & M. I. HOMSI-BRANDEBURGO. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** v.127, p. 21-30, 2000.

BRASIL / MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. 10(2). p. 24, Ed. Núcleo de Comunicação, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, 2011.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipases A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. **J. Lipid Res.**, v. 50, p. S237-S242, 2009.

BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1033-1036, 1991.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CALMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Characterization and neutralization of the venoms used in production of botropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 340, n. 5, p. 501-509, 2002.

CAMPBELL, P. B.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin American. Ithaca – New York, **Comstock**, p. 425, 1989.

CAPRONI, P. Ação da Bothropstoxina-1 do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o Sistema immune. Dissertação –Mestrado- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. fl. 60, 2009.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUES, S. A.; HADDAD, V. J. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica**. São Paulo: Sarvier, p. 468, 2003.

CASTRO, F.O.F. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico humano. 67f. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2011.

CASTRO, R.C.; LANDUCCI, E.C.T.; TOYAMA, M.H.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; NUCCI, G.; ANTUNES, E. – Leukocyte recruitment induced by type II phospholipases A<sub>2</sub> into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, p. 1773-1785, 2000.

- CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, 33: 31-39, 1995.
- COGO, J. C.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; GIGLIO, J. R.; CORRADO, A. P.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A<sub>2</sub> fraction. **Toxicon**, v. 36, n.10, p. 1323-1332, 1998.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.. Inflammation and repair. In: Pathologic Basis of Disease. F.J. Schoen, ed. Philadelphia, Saunders Company, p. 51-92, 1994.
- CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P.; FARSKY, S. H. P. Lack of effect of endogenous corticosteroids on the acute inflammatory reaction (edema) induced by *Bothrops jararaca* venom (BjV) in rats. **Toxicon**, v. 35, p. 773-776, 1997.
- DA SILVA, N. M. V.; ARRUDA, E. Z.; MURAKAMI, Y. L. B.; MORAES, R. A. M.; EL-KIK, C. Z.; TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F. A.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MELO, P. A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venom in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 196-205, 2007.
- DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA<sub>2</sub> activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008.
- DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V.; CAMPOS, A. C. M. R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. J. Complement activation by animal venoms. **Toxicol. Toxin. Rev.**, v. 14, p. 375-400, 1995.
- EL-NAGGAR, S.F., DOSKOTCH, R.W.N. Specioside: A new iridoid glycoside from *Catalpa speciosa*. **Journal of Natural products**, v. 43, n.4, 1980.
- FARSKY, S. H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. **Toxicon**, v. 35, p. 185-93, 1997.
- FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III and BPP-V) from *B. neuwiedi* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17 (3), p. 285-289, 1998.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 1551-9, 1993.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

FRANÇA, F. O. S. Associação da venenomia e de gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan, de São Paulo, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. **Soc. Bras. Med.Tropic.**, v. 3, p. 187-190, 1998.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. (Ed.). Animais Peçonhentos no Brasil – Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, 2009.

FUNASA. (1998) **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 1ª Ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.

FUNASA. (2001) **Manual de diagnóstico e tratamento e acidentes por animais peçonhentos**. P. 120, 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.

FURTADO M.F.D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M.T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v.48, p. 401-410, 2006.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W. S.; MAHMOUD, T. S.; FIGUEIREDO, P. O. Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1887-1891, 2007.

GUERBAS-NETO, P. Estudo químico da casca, folhas e cerne de um espécime de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae) coletado no Pantanal. Dissertação de mestrado. UFMS, Campo Grande, 2003.

GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, 19: 493-500, 1981

GUTIERREZ, J.M.; ROJAS, E.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; CERDAS, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rica snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. **Comp. Biochem. Physiol.**, 85C: 171-175, 1986.

- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.
- GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.
- GUTIERREZ, J. M. Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377-394, 2002.
- GUTIERREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A<sub>2</sub>: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. **Toxicon**, v. 51, p. 80-92, 2008.
- GUTIERREZ, J. M.; LEÓN, G. Snake antivenoms. Technological, clinical and public health issues In: **Animal Toxins: State of the Art Perspectives in Health and Biotechnology**. DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M.; MARTIN-EUCLAIRTE, M. F.; ZINGALI, R. B.; ROCHAT, H. editors. Belo Horizonte: Editora UFMG; p. 393-421, 2009.
- HADJU, J.,; HOLMANN, . An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p.838-857, 2012.
- HARRISON, R. A. e WÜSTER, W.; BARLOW, A.; POOK, C. E. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 276, 2443-2449, 2009.
- HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr. Vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v. 30 (5/6), p. 573-579, 1992.
- HAWGOOD, B. J. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and antituberculous BCG vaccination. **Toxicon**, v. 37, p. 1241-1258, 1999.
- HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, 69(1), p. 11-25, 1992.
- IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODDRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; J. R. GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**, v. 85, n. 669-675, 2003.

JANUARIO, A. H.; SANTOSA, S. L.; MARCUSSIA, S.; MAZZIB, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; JAVIER, E.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S.; SOARES, A. M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 243–251, 2004.

JORGE, L. I. F. Botânica aplicada ao controle de qualidade de alimentos e de medicamentos. São Paulo: **Atheneu**, 2000.

KAMIGUTTI, A.S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1041-1049, 2005.

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 A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1179-1186, 2002.

KATURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLO, D. G.; DE SILVA, H. J. The Global Burden Of Snakebite: A Literature Analysis And Modelling Based On Regional Estimates Of Envenoming And Deaths. **PLOS Medicine** 5(11): 1591-1604, 2008.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipases A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

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

LEMAS, T. Os reptéis do rio Grande do Sul: atuais e fósseis. **Porto Alegre: EDIPUCRS**, p. 264, 2002.

LOHMANN, L. G.; SILVA-CASTRO, M. M. Bignoniaceae. In: GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P.; CARDOSO DA SILVA, J. M. (Ed.). **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte, MG: Conservação Internacional, p. 96-100, 2009.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. Å. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. v. 17, p. 93-105, 1993.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin

region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 29867-29873, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of Lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; LEON, G. A.; ANGULO, Y. B.; RUCAVADO, A.; NUNEZ, V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, p. 1012-1028, 2009.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, p. 352, 1992.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 544, 2002.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A<sub>2</sub>: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 713-720, 2003.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factor isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, v. 22, p. 193-198, 1984.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; OLIVEIRA, C. Z.; RUEDA, A. Q.; MENALDO, D. L.; BELEBONI, R. O.; STABELLI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. Snake venom fosfolipases A<sub>2</sub> inhibitros: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 7, p. 743-756, 2007.

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

MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v. 31 (3), p. 285–291, 1993.

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* extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, p. 595-602, 1994.

MENDES, M. M.; VIEIRA, S. A. P. B.; GOMES, M. S. R.; PAULA, V. F.; ALCÂNTARA, T. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; DOS SANTOS, J. I.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; RODRIGUES, V. M. Triacetyl *p*-coumarate: An inhibitor of snake venom metalloproteinases. **Phytochemistry**, v. 86, p. 72-82, 2013.

MISE, Y. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Ação protetora da *Calendula officinalis* (Asteraceae; Compositae) sobre a atividade miotóxica do veneno de *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae). **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79 (Supl. 1), p. 50-55, 2009.

MORAIS, V. M.; MASSLDI, H. Snake antivenoms: adverse reactions and productions technology. **J. Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v. 15(1), p. 2-18, 2009.

MOREIRA, V. ; ZAMUNER, S. R. ; WALLACE, J. L. ; TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 and D2, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v. 49, p. 615-624, 2007.

MOREIRA, V. ; GUTIERREZ, J. M. ; ZAMUNER, S. R. ; Amaral, R.B. ; TEIXEIRA, C. F. P. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 8, p. 107-114, 2009.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; BORGES DA SILVA, H.; FERNANDES, C. M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60(1), p.12-20, 2013.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. A.; DA SILVA, M. H.; MELO, P. A.; SUAREZ-KURTZ, G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**, v. 27, p. 1003-1009, 1989.

MORS, W.B. Plants active against snake bite. **Economic and Medicinal Plant Research**, v. 5, p. 353-373, 1991.

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

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 75-84, 2004.

NAZATO, V. S.; RUBEM-MAURO, L.; VIEIRA, N. A. G.; ROCHA-JUNIOR, D. S.; SILVA, M. G.; LOPES, P. S.; DAL-BELO, C. A.; COGO, J. C.; DOS SANTOS, M. G.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; OSHIMA-FRANCO, Y. *In vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. **Molecules**, v. 15, p. 5956-5970, 2010.



NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILIGAS, W.; LIMA, C. A. H. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**, v. 14, p. 1072-1080, 2009.

NUNES, G.P., SILVA, M.F., RESENDE, U.M. DE SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.83-92, 2003.

Organização Mundial da Saúde. Doença Tropical Negligenciada (2007). Disponível em: [www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en) Acesso em: março de 2013.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S. L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R. G.; GARCÍA, M. E.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 505-511, 2000.

OTERO, R.; R. J. FONNEGRA; S. L., JIMÉNEZ. Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes en Antioquia y Chocó, Colombia. Uniservidad de Antioquia. Medellín, p. 402, 2000.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

PEREIRA, N. A.; PEREIRA, P. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B.. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes, protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Med.**, v. 60, p. 99-100, 1994.

PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C. F.; TAMBOURGI, D. V.; GUTIÉRREZ, J. M.; Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1253-1266, 2000.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

QUIRÓS, S.; ALAPE-GIRÓN, A.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new  $\alpha$ -type phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.146 (1), p. 60–6, 2007.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B.; PEREIRA, N. A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas de animais, especialmente veneno de cobra. **Rev. Bras. Farm.**, v.69, n.4, p.82-86, 1988.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *B. neuwiedi* snake venom: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & integrative Physiology**, v. 121 (3), p. 215-222, 1998.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwidase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *B. neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381 (2), p. 213-224, 2000.

RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAUJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *B. neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44 (3), p. 305-314, 2004.

RODRIGUEZ, M.; CARVALHO, J. C.; LUCIA, M.; MESQUITA, J. M.; SARTI, S. J. Avaliação da atividade antiofídica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* sobre modelos animais estimulados com veneno de *Bothrops alternatus*. III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, v. 3, p. 110-111, 1997.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment snake bites in South America. In: Venomous animal and their venoms. ed. Bucherl, W. & Buckley, E.E., eds. New York: Academic press. p. 345-403, 1971.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. **Toxicon**, v. 34 (5), p. 567-577, 1996.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom I: analgesic and antiinflammatory activities. **Mem. Inst. Butantan**, v.86, n.2, p.203-206, 1991.

SALVINI, T. F.; AMARAL, A. C.; MIYABARA, E. H.; TURRI, J. A. O.; DANELLA, P. M.; SELISTRE ARAÚJO, H. S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v. 39, p. 1141-1149, 2001.

SANTOS FILHO, L. História geral da medicina brasileira. São Paulo: Hucitec/Edusp, 1991.

SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinase from *Bothrops moojeni* (caiçaca) Venom II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP1 and MSP2. **Toxicon**, v. 31, n.4, p. 483-492, 1993.

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

SETUBAL, S. D.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; BASTOS, J. S.; CASTRO, O. B.; PIRES W. L.; ZAQUEO, K. D.; CALDERON, L. D.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J.P. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. **Toxicon**, v. 76C, p.143-149. 2013.

SEWALL, H. Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom. **J. Physiol.** v. 8, p. 203-210, 1887.

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

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops moojeni* (caiçaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 7-15, 2000.

SOARES, A. M.; GUERR-SA, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BNSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *B. neuwiedi pauloensis* venom. **Biochemistry and Biophysics**, v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, A. M.; JANUÁRIO, A. H.; PEREIRA, A. M. S.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects of snake venoms exhibited by brazilian plants. **Drugs of the future**, v. 29, n. 11, p. 1105-1117, 2004. Review.

SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2625-2641, 2005.

SOARES, A. O.; TIEPPO, C.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. Iridóides e triterpenos das cascas do caule de *Tabebuia caraiba* Bignoniaceae. 29<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ – 19 a 22 de maio de 2006.

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**, v. 4, p. 309-346, 2009.

SPRINGER, T. A. - Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 28, p. 301-14, 1994.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760 (9), p. 1450–1457, 2006.

TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TEIXEIRA, C. F.; CHAVES, F.; ZAMUNER, R. S.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 86, p. 107-15, 2005.

TEIXEIRA C, CURY Y, MOREIRA V, PICOLO G, CHAVES F. Inflammation Induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**. v. 1;54(7), p. 988-97, 2009.

TICLI, F. K.; SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; AMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Med. Chem.**, v. 12, p. 2625-2641, 2005.

TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S., DIZ-FILHO, E. B. S.; OLIVEIRA, S. C. B.; TOYAMA, M. H. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Toxicon**, v. 53, p. 417-26, 2009.

TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Venom. Agents And Actions**, v. 26, p. 292-300, 1989.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie**, v. 82, p. 815-831, 2000.

VALLE, A. L., BRITES, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Parnaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 10 (2), p. 155-161, 2008.

VERONESE, E. L. G.; L. E. ESMERALDINO, A. P. F.; TROMBONE, A. E.; SANTANA, G. H.; BECHARA, I.; KETTELHUT, A. C. O.; CINTRA, J. R.; GIGLIO, S. V.; SAMPAIO. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. D. C. (Apocynaceae). **Phytomedicine: Internat. J. Phytoth & Phytoth.**, v. 12, p. 112-123, 2005.

WARELL, D.A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes, **British Medical Journal** v. 26, n. 331, p. 1244-1247, 2005.

ZAMUNER, S. R.; GUTIERREZ, J. M.; MUSCARA, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. Bothrops asper and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-1513, 2001.

ZAMUNER, S. R.; TEIXEIRA, C. F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm.**, v. 11(6), p. 351-7, 2002.

ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIERREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, p. 806-813, 2005.

## **5 MANUSCRITO**

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Ethnopharmacology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*

Article Type: Full Length Article

Keywords: Paratudo; *Bothrops*; anti-inflammatory; antihemorrhagic; antimyotoxic; snake bite.

Corresponding Author: Dr. Mônica Cristina Toffoli-Kadri, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

First Author: Fernanda P Reis, MsC

Order of Authors: Fernanda P Reis, MsC; Iluska M Senna Bonfa; Rafael B Cavalcante; Denis Okoba; Simone B Souza Vasconcelos, MsC; Wander F Oliveira Filiu, PhD; Luciane Candeloro, PhD; Antonio Carlos D Monreal, PhD; Valter J Silva; Paula H Santa Rita, MsC; Carlos A Carollo, PhD.; Mônica Cristina Toffoli-Kadri, Ph.D.

Abstract: Ethnopharmacological relevance: Ethnobotanical studies showed the *Tabebuia aurea* has been used as anti-inflammatory and for snake bite.

Aim of the study: Evaluate the effect of treatment with the hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HETa) on inflammatory, hemorrhagic and myotoxic activities induced by *Bothrops neuwiedi* (BnV) in mice.

Materials and methods: The anti-inflammatory, antihemorrhagic and antimyotoxic properties of the HETa 100, 200 and 400 mg/Kg or BnV neutralized with HETa (1:50) were evaluated using the following animal models: BnV-induced paw edema, BnV-induced recruitment of polymorphonuclear cells into the peritoneal cavity, hemorrhagic activity, myotoxic activity and hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages *in vitro*.

Results: HETa inhibited the paw edema and polymorphonuclear cell recruitment into the peritoneal cavity. BnV neutralized with HETa reduced the hemorrhagic activity and histopathological analysis of skeletal muscle tissue showed that the hemorrhagic area was smaller and multifocal. The leukocyte infiltrate was less intense and discrete muscle necrosis. BnV induced hydrogen peroxide production and BnV neutralized reduced this production. Additionally, the HETa was nontoxic to macrophages.

Conclusions: The activities of the HETa presented herein justify the popular use of *Tabebuia aurea* in inflammatory situations from snake bite.

August 11, 2014

Dr. Robert Verpoorte

Editor-in-Chief of the *Journal of Ethnopharmacology*

Dear Dr. Verpoorte,

Please find enclosed the manuscript titled “*Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*” which is being submitted for consideration for publication in the *Journal of Ethnopharmacology*. This research supports traditional uses of *Tabebuia aurea* and contributes to the understanding of the biological properties of this plant species, as there is a paucity of pharmacological information regarding this species even though it is widely used in Brazilian folk medicine. Thus, we firmly believe that this manuscript relays novel and important information to *J. Ethnopharmacol.* readers. This manuscript has not been previously published, is not currently under consideration for review at any other journal, and will not be submitted elsewhere before a decision is made by this journal. This manuscript was edited for proper English language by Sir. Colin Edward Knaggs, and an English language editing certificate is enclosed with this letter.

Sincerely,

Mônica Cristina Toffoli-Kadri



## Journal of Ethnopharmacology AUTHOR CHECKLIST

Dear Author,

It frequently happens that on receipt of an article for publication, we find that certain elements of the manuscript, or related information, is missing. This is regrettable of course since it means there must be a delay in processing the article while we obtain the missing details.

In order to avoid such delays in the publication of your article, if accepted, could you please run through the list of items below and check each box. **Please enclose a copy of this list with the manuscript submission.**

### Overall Manuscript Details

• **Manuscript type – please check one of the following:**

- |                                    |                          |
|------------------------------------|--------------------------|
| Research article                   | <b>X</b>                 |
| Review article                     | <input type="checkbox"/> |
| Ethnopharmacological Communication | <input type="checkbox"/> |
| Book Review                        | <input type="checkbox"/> |
| Commentary                         | <input type="checkbox"/> |
| Other                              | <input type="checkbox"/> |

• Do you declare that the abstract is in the requested structured format? **YES**

• Did you use the right format for the references? **YES**

• Are the corresponding author's postal address, telephone and fax numbers complete on the manuscript? **YES**

• **Have you provided the corresponding author's e-mail address? YES**

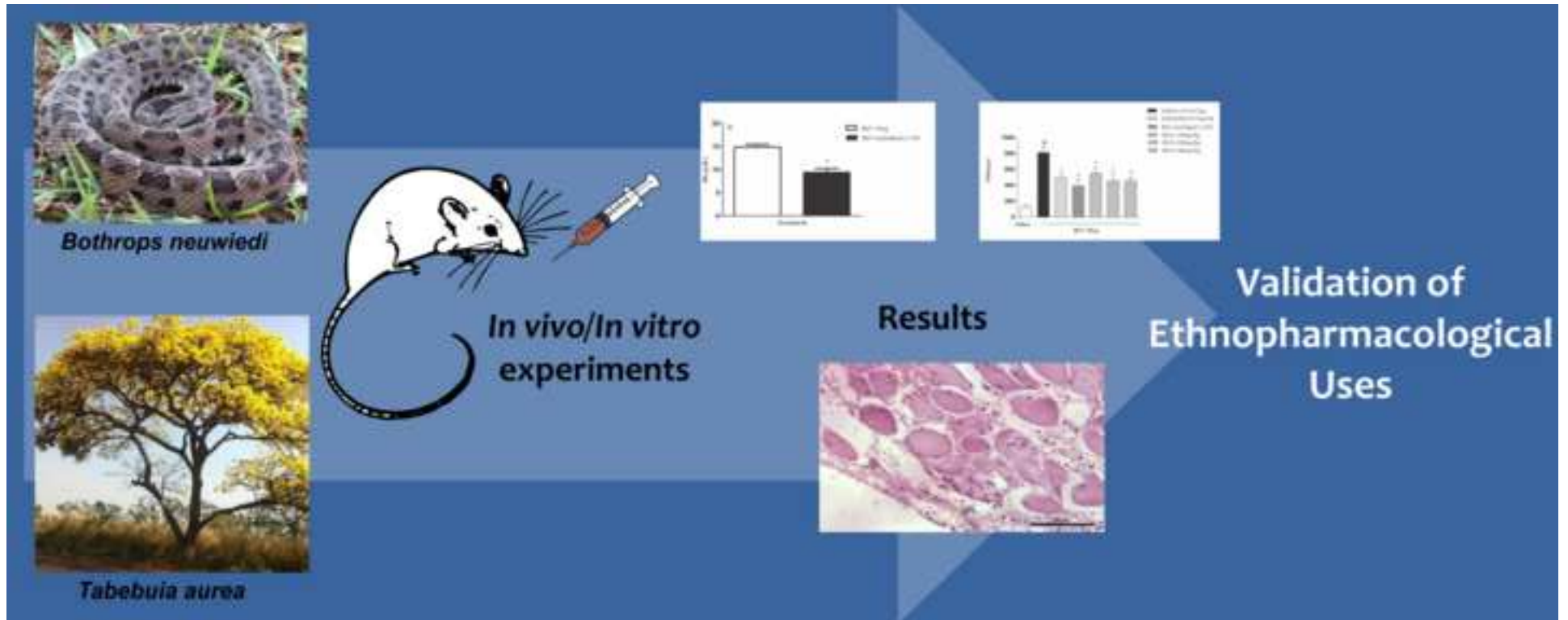
• Do you declare that this manuscript/data, or parts thereof, has not been submitted or published elsewhere for publication? **YES**

• Do you declare that all the listed authors have read and approved the submitted manuscript? **YES**

• Do you declare that the present study was performed according to international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights? **YES**

### Revised manuscripts

• **Have you addressed each remark from the referees?**



**Abstract**

**Ethnopharmacological relevance:** Ethnobotanical studies showed the *Tabebuia aurea* has been used as anti-inflammatory and for snake bite.

**Aim of the study:** Evaluate the effect of treatment with the hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HETa) on inflammatory, hemorrhagic and myotoxic activities induced by *Bothrops neuwiedi* (BnV) in mice.

**Materials and methods:** The anti-inflammatory, antihemorrhagic and antimyotoxic properties of the HETa 100, 200 and 400 mg/Kg or BnV neutralized with HETa (1:50) were evaluated using the following animal models: BnV-induced paw edema, BnV-induced recruitment of polymorphonuclear cells into the peritoneal cavity, hemorrhagic activity, myotoxic activity and hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages *in vitro*.

**Results:** HETa inhibited the paw edema and polymorphonuclear cell recruitment into the peritoneal cavity. BnV neutralized with HETa reduced the hemorrhagic activity and histopathological analysis of skeletal muscle tissue showed that the hemorrhagic area was smaller and multifocal. The leukocyte infiltrate was less intense and discrete muscle necrosis. BnV induced hydrogen peroxide production and BnV neutralized reduced this production. Additionally, the HETa was nontoxic to macrophages.

**Conclusions:** The activities of the HETa presented herein justify the popular use of *Tabebuia aurea* in inflammatory situations from snake bite.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

***Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities  
induced by the venom of *Bothrops neuwiedi***

Fernanda Paes Reis<sup>a</sup>, Iluska Moslaves Senna Bonfa<sup>a</sup>, Rafael Bezerra Cavalcante<sup>a</sup>, Denis Okoba<sup>a</sup>, Simone Bertozi de Souza Vasconcelos<sup>a</sup>, Luciane Candeloro<sup>a</sup>, Wander Fernando de Oliveira Filiu<sup>a</sup>, Antônio Carlos Duenhas Monreal<sup>a</sup>, Valter Jose da Silva<sup>a</sup>, Paula Helena Santa Rita<sup>b</sup>, Carlos Alexandre Carollo<sup>a</sup>, Mônica Cristina Toffoli-Kadri<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

<sup>b</sup>Biotério Central; Universidade Católica Dom Bosco, 79117-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

\*Corresponding author:

Tel: +55 67 3345 3534

E-mail address: [monica.kadri@ufms.br](mailto:monica.kadri@ufms.br)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 1 Introduction

1  
2       *Bothrops* family is responsible for most of the snake bites in Brazil. Snake bites  
3  
4 are a public health problem in tropical regions and a significant cause of morbidity and  
5  
6 mortality; they are included in the World Health Organization (WHO) list of neglected  
7  
8 diseases (Harrison et al., 2009).  
9

10  
11       Venoms from snakes, which include *Bothrops* genus, trigger systemic effects such  
12  
13 as coagulopathy, hypotension, acute renal failure and local effects including pain,  
14  
15 hemorrhage, and inflammation with predominance of edema and leukocyte influx to the  
16  
17 bite site. In most cases, the disease progresses to tissue necrosis and may lead to serious  
18  
19 consequences such as amputation of the affected limb (Gutierrez and Lomonte, 1989).  
20  
21 The conventional treatment for snake bites is antivenom; it reverses the systemic  
22  
23 effects, however, it has not been effective for local effects (Gutierrez et al, 1981).  
24  
25

26  
27       The use of plants as an antidote for snake bites is old and common in native  
28  
29 populations who use them orally or topically on the bite site (Rizzini et al., 1988,  
30  
31 Ruppelt et al., 1991, Martz, 1992).  
32  
33

34  
35       *Tabebuia* genus (Bignoniaceae) has a wide distribution in tropical and subtropical  
36  
37 regions of the American continent, including Pantanal, the Amazon and Caatinga  
38  
39 (Lorenzi, 1992). Ethnobotanical studies have shown that *Tabebuia aurea*, known as  
40  
41 “paratudo”, is widely used in traditional medicine to treat snake bites (Agra et al., 2007,  
42  
43 Hadju and Hohmann, 2012) and as an anti-inflammatory (Nunes et al., 2003).  
44  
45

46  
47       The aim of this study was to evaluate the effect of hydroethanolic extract of  
48  
49 *Tabebuia aurea* (HETa) on inflammatory, hemorrhagic, and myotoxic activities induced  
50  
51 by *Bothrops neuwiedi* venom (BnV) in mice.  
52  
53

## 2 Materials and Methods

54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 2.1 Plant material and preparation of the hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HETa)

The stem bark of *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore were collected from the “Paratudal”, 19<sup>0</sup>34<sup>°</sup>37<sup>’</sup>S;57<sup>0</sup>00<sup>’</sup>42<sup>’’</sup>W located in the region of Abobral, Passo do Lontra, Miranda, MS, Brazil in July 2009 and were identified by Dr. Arnildo Pott. Voucher specimens of the plants were deposited in the CGMS herbarium, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil (number 29578). This study was approved for the acquisition and shipment of samples of genetic heritage components - 010273/2013.

HETa was obtained by extracting the stem bark (200g) with percolation (EtOH:H<sub>2</sub>O - 7:3, v/v) followed by concentration under reduced pressure.

## 2.2 Animals and snake venom

Male Swiss mice weighing 18-25 g were obtained from the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Brazil and maintained in a room with controlled temperature (22±2°C) and a 12h light/dark cycle with free access to food and water. Six hours before each experiment, the animals received only water to avoid food interference with substance absorption. All experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the UFMS (protocol 303/2011) and were conducted in accordance with the National Institutes of Health regulations on the use and care of animals for scientific purposes.

Snake venom was extracted from adult specimens of *Bothrops neuwiedi* (BnV) from the State of Mato Grosso do Sul and supplied by Catholic University Dom Bosco

1 (UCDB). The venom was lyophilized and kept at -20° C until use and the concentration  
2 was expressed as dry weight.  
3  
4  
5  
6  
7

### 8 **2.3 Neutralization of snake venom** 9

10  
11 Experimental approach to assess neutralization has been previously described by  
12 Gutierrez et al. (1990). BnV (10µg) was incubated with HETa to obtain venom:extract  
13 ratios (1:50; w/w) and carried out at 37°C for 30 minutes. Control was performed with  
14 aliquots containing BnV without HETa.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

### 25 **2.4 Treatments** 26

27  
28 For the edema paw and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity assay, the  
29 animals received *per os* (p.o.; gavage, 10 mL/Kg), water (vehicle), HETa 100, 200 and  
30 400 mg/Kg, or indomethacin (15 mg/Kg, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 60 minutes  
31 before the BnV administration (10µg/0.5 mL, intraperitoneally, i.p.). Animals that  
32 received neutralized BnV were injected at the time of administration of BnV for the  
33 other groups.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

### 48 **2.5 Paw edema** 49

50  
51 BnV-induced paw edema assay was adapted from the method described by Winter  
52 et al. (1962). Paw edema was induced in the hind paw of the mice by intraplantar  
53 injection (i.pl.) of BnV (10µg/40µL). The contralateral paw was used as a control,  
54 which was injected with the same volume of the saline (vehicle). The course of the  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 edema was monitored by measuring the volume of footpad swelling at 0, 30, 60, 120  
2 and 240 minutes after BnV injection using a digital plethysmometer (Insight®).  
3  
4  
5  
6  
7

## 8 **2.6 Polymorphonuclear recruitment into the peritoneal cavity**

9

10  
11 After four hours of the administration of BnV (10µg/0.5 mL, i.p.), the mice were  
12 killed in a CO<sub>2</sub> chamber, and the cells from the peritoneal cavity were harvested by  
13 injecting 3 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 10 U/mL of heparin  
14 (Basel, Switzerland) into the peritoneal cavity. The peritoneal exudates was aspirated  
15 with a syringe and placed into plastic tubes. Total cell counts were performed  
16 immediately in a Neubauer chamber after dilution (1:20, v/v) in Turk's solution (0.2%  
17 crystal violet dye in 30% acetic acid). For differential cell counts, the preparations were  
18 stained with Instant-Prov (Newprov). These cells were classified as either  
19 polymorphonuclear based on conventional morphological criteria.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

## 37 **2.7 Hemorrhagic activity**

38

39  
40 Assay was performed according to the method described by Nikai et al. (1984).  
41  
42 The hemorrhagic activity of BnV was assessed by measuring the formation and  
43 hemorrhagic halo in millimeters into shaved dorsal skin. The Minimum Hemorrhagic  
44 Dose (MHD) was determined as the minimum dose of venom (µg) to induce a  
45 hemorrhagic halo of 10mm diameter in the dorsal region and the concentration was  
46 established at 10µg/50µL.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 Animals were distributed into groups and received intradermally (i.d), saline  
56 (50µL), HETa (500µg/50µL), BnV (10µg/50µL) or neutralized BnV (50µL). After three  
57 hours, animals were killed in a CO<sub>2</sub> chamber and the dorsal skin removed delimiting the  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 hemorrhagic area. The image of hemorrhagic lesions were photographed and transferred  
2 to ImageJ<sup>®</sup> software to determine the area. Quantifying hemoglobin (Hb) was  
3 performed as Rucavado and Lomonte (2000). The area limited by hemorrhagic skin was  
4 fragmented and transferred to tubes containing 1500µL solution Drabkin<sup>®</sup>. The material  
5 was kept in refrigerator (2-8°C) for 12 hours and then centrifuged at 700 rpm/15  
6 minutes. The supernatant was collected for hemoglobin assay with spectrophotometer at  
7 540 nm Microchem<sup>®</sup> Analyzer.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

## 20 **2.8 Myotoxic activity**

21  
22  
23  
24 Myotoxic activity was assessed by the quantification of the activity of the enzyme  
25 creatine kinase (CK) in plasma and histopathological analysis of the gastrocnemius  
26 muscle, according to Gutierrez et al. (1980). Animals were injected intramuscularly  
27 (i.m.), in the right gastrocnemius muscle, with saline (50µL), HETa (500µg/50µL), BnV  
28 (20µg/50µL) or neutralized BnV (50µL). After three hours, mice were bled from the  
29 orbital plexus with heparinized Pasteur pipettes. After centrifugation, plasma was  
30 separated and the CK activity was determined by using the kit CK-NAC (Gold  
31 Analisa<sup>®</sup>, Brazil). After, animals were killed in a CO<sub>2</sub> chamber and gastrocnemius  
32 muscle was removed and placed in 10% formalin for fixation for 48 hours. The sections  
33 were stained with hematoxylin and eosin (HE).  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

## 51 **2.9 Hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages *in vitro***

52  
53  
54  
55 A hydrogen peroxide assay was performed according to the method described by  
56 Pick and Mizel (1981) with the modifications proposed by Russo et al. (1989). Mice  
57 were pretreated (i.p.) with 3% thioglycollate (1 mL, Oxoid, Hampshire, U.K.) 96 hours  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 before cell harvesting. Subsequently, the mice were killed in a CO<sub>2</sub> chamber, and  
2 macrophages were harvested by washing the cavities with 3 mL of buffered saline  
3 (PBS) containing heparin (10 U/ml). The cells (2x10<sup>5</sup> macrophages) were resuspended  
4 in RPMI 1640 medium supplemented and incubated for 60 minutes in a 96-well plate to  
5 allow for adhesion. After, the non-adherent cells were removed, and 100 µL of a phenol  
6 red solution (140 mM NaCl, 10 mM potassium-phosphate buffer pH 7.0, 5.5 mM  
7 dextrose, 0.56 mM phenol red) containing 8.5 U/ml of horseradish peroxidase (Sigma  
8 Aldrich, St. Louis, USA) and HETa (500µg/mL, 10µL), BnV (10µg/mL, 10µL) or  
9 neutralized BnV (10µL) were added, and the cells were incubated for 60 minutes at  
10 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The reaction was stopped by the addition of 10 µL of  
11 1N NaOH. The absorbance was determined using an ELISA reader at a wavelength of  
12 620 nm. Hydrogen peroxide concentration values were extrapolated from a standard  
13 calibration curve and expressed as µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31 Cell viability was determined after one hour of incubation of macrophages with  
32 different stimuli under the same conditions described. The supernatants were collected  
33 and was added 100 µL of 0.1% Trypan blue. Viable cells was determined using an  
34 inverted microscope (OptiPhase, MecLab, São Paulo, Brazil) counting a total of 100  
35 cells.

## 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 **2.10 Statistical analysis**

48  
49  
50  
51 Data are shown as the mean ± S.E.M.. Statistical differences were analyzed by  
52 one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni test. *P* values less than 0.05 were  
53 considered statistically significant (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., USA)

## 54 55 56 57 58 59 60 **3 Results**

### 3.1 Effect of treatment with HETa on BnV-induced paw edema

Treatment with the HETa inhibited paw edema in mice (Table 1). The maximum inflammatory response induced by BnV occurred between 30 and 60 minutes after administration. Indomethacin inhibited paw edema throughout the evaluated period. HETa (200 mg/Kg) effectively reduced edema from 60 minutes after administration, and neutralized BnV significantly paw edema from 120 minutes after administration.

**Table 1**

### 3.2 Effect of treatment with HETa on BnV-induced polymorphonuclear recruitment into the peritoneal cavity

Figure 1 shows the effect of HETa on BnV-induced polymorphonuclear recruitment ( $811 \pm 66$  cells/mm<sup>3</sup>) into the peritoneal cavity when compared to saline ( $120 \pm 32$  cells/mm<sup>3</sup>). Positive control, indomethacin reduced this influx in 39.5% ( $491 \pm 42$  cells/mm<sup>3</sup>). Pre-treatment with HETa at 100 mg/Kg inhibited in 32.2% ( $551 \pm 60$  cells/mm<sup>3</sup>), 200 mg/Kg (43.9%;  $455 \pm 94$  cells/mm<sup>3</sup>) and 400 mg/Kg (43.8%;  $465 \pm 45$  cells/mm<sup>3</sup>). Neutralized BnV reduced this cells influx in 52.0% ( $389 \pm 85$  cells/mm<sup>3</sup>).

**Figure 1**

### 3.3 Effect of BnV neutralized with HETa on hemorrhagic activity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 2 shows the effect of neutralized BnV on hemorrhagic activity. There was no significant difference between the BnV and neutralized BnV. BnV induced a hemorrhagic area of  $1725 \pm 0.265 \text{ cm}^2$ , whereas the area induced by neutralized BnV was  $1625 \pm 0302 \text{ cm}^2$ . Saline or HETa alone (controls) did not induce hemorrhagic area in the animals evaluated (data not shown). However, hemoglobin assay showed that treatment with the neutralized BnV decreased hemoglobin concentration in 40.6% ( $8.84 \pm 0.89 \text{ g/dL}$ ) compared to the BnV group ( $14.88 \pm 0.64 \text{ g/dL}$ ).

### Figure 2

#### 3.4 Effect of BnV neutralized with HETa on myotoxic activity

Quantification of serum CK showed that neutralized BnV neutralized decreased the release of CK in 22.0% ( $1711 \pm 272 \text{ U/L}$ ) compared to the group receiving BnV only ( $2203 \pm 355 \text{ U/L}$ ), but was not statistically significant. Serum CK concentration in the group of animals that received HETa only was  $902 \pm 164 \text{ U/L}$  (Figure 3).

### Figure 3

Histopathological analysis of skeletal muscle tissue after three hours showed that HETa preserved the muscle fibers (data not shown). Animals injected with BnV showed marked leukocyte infiltrate between muscle fibers and hemorrhage (Figure 4). In neutralized BnV group the hemorrhagic area was smaller and multifocal, leukocyte infiltrate was less intense and muscle necrosis discrete (Figure 5).

## Figure 4

## Figure 5

### 3.5 Effect of BnV neutralized with HETa on hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages

Figure 6 shows that incubating macrophages with BnV induced hydrogen peroxide production ( $11.37 \pm 0.14 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) compared to unstimulated macrophages ( $1.63 \pm 0.28 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ). Neutralized BnV reduced this production in 63.2% ( $4.19 \pm 0.44 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ). HETa did not induce production ( $2.74 \pm 0.30 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ). Cell viability was greater than 95% for all experiments.

## 4 Discussion

Our results demonstrate that anti-inflammatory, antihemorrhagic and antimyotoxic activities of *Tabebuia aurea* supports the ethnomedicinal data available regarding this species (Nunes et al., 2003, Agra et al., 2007, Hadju and Hohmann, 2012).

HETa was able to inhibit polymorphonuclear cell influx to the peritoneal cavity of the mice. The leukocyte profile observed with BnV corroborates the results found by Zamuner and Teixeira (2002) showing that *Bothrops* venoms increased leukocytes, predominantly polymorphonuclear, in the lesion focus. These cells, in specific activation situations, can contribute to the evolution of tissue and/or vascular lesions caused by different venom components (Zamuner et al., 2001).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Intraplantar-injected BnV triggered edema formation which was inhibited by HETa. The inhibition of the edema formation by some plants like *Casearia sylvestris* has been shown in the literature (Pereira et al., 1994).

The mediators liberated by venoms which contribute to vascular and cellular inflammatory reaction development are the eicosanoids, vasoactive amines, adrenergic agonists, and cytokines (Chaves et al., 1995; Barros et al., 1998; Petricevich et al., 2000; Moreira et al., 2009). In this context, the phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) of *Bothrops* venoms hydrolyze cell membrane glycerophospholipids, generating lysophospholipids and fatty acids which are precursors for the formation of eicosanoids (Burke and Dennis, 2009). This enzyme is also responsible for mastocyte degranulation which potentializes edema (Lloret and Moreno, 1993). Our results show that HETa blocked the production pathway and/or activation of these mediators.

In hemorrhagic activity evaluation, HETa did not reduce lesion area, but reduced the quantity of hemoglobin in the area. One possible explanation is the fact that the metalloproteinases are dependent on zinc (Zn<sup>2+</sup>) for their catalytic action (Schenkel et al., 2007) and have suffered a complex forming reaction during the venom extract incubation period reducing their activity. From this, we can assume that HETa does not interfere in metalloproteinase distribution in tissue, or that it does not affect the non-catalytic sites responsible for the adhesive properties of this enzyme, but does affect its lytic activity.

In relation to myotoxicity, we observed that HETa did not significantly inhibit CK liberation, but histopathological results showed a reduction in the myotoxic event with smaller multifocal hemorrhagic area, less intense leukocyte infiltration, and discrete muscle necrosis. Myotoxins are proteins with a PLA<sub>2</sub> structure with specific action on skeletal muscle provoking irreversible damage in muscle fibers at the bite site (Lomonte

1 et al., 2003). These are classified as ASP49-PLA<sub>2</sub> with catalytic activity and LYS49-  
2 PLA<sub>2</sub>, which does not have enzymatic activity, however both can cause muscle lesion  
3  
4 and are present in *Bothrops* venoms (Zuliani et al., 2005). ASP49-PLA<sub>2</sub> was not  
5  
6 identified in *Bothrops neuwiedi* venom, indicating that catalytic activity does not seem  
7  
8 to be a condition for myotoxicity (Leite et al., 1999).  
9

10  
11  
12 One other observation was that BnV induced hydrogen peroxide production and  
13  
14 venom neutralization inhibited it. In phagocytosis, macrophages produce reactive  
15  
16 oxygen species (ROS), such as superoxide anion and hydrogen peroxide (Babior, 2004).  
17  
18 Accentuated ROS production and liberation can damage the tissue involved in *Bothrops*  
19  
20 venom triggered inflammatory response (Setubal et al., 2011).  
21  
22

23  
24 Then, a possible action mechanism of HETa, by direct action, is inhibiting signal  
25  
26 pathways, such as the protein C kinase pathway, not permitting NADPH oxidase  
27  
28 activation and impeding respiratory burst (Babior, 2004) or indirectly, chelating  
29  
30 bivalent ions, as ROS can also be generated independent mechanisms from NADPH  
31  
32 oxidase, through calcium-activated potassium conductance channels (Fay et al., 2006).  
33  
34  
35

36  
37 Members of the *Tabebuia* genus produce iridoids, saponins, cumarins, and  
38  
39 flavonoids, among its other secondary metabolites. Studies with *Tabebuia aurea* have  
40  
41 shown the presence of iridoids, flavonoids, terpenes and steroids (Guerbas-Neto, 2003).  
42  
43 Some of these secondary metabolites, alone or in combination, should be responsible  
44  
45 for the anti-inflammatory, antimyotoxic and antihemorrhagic activities, and future  
46  
47 studies are necessary for clarifying the activate compound(s) of HETa.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 5 Conclusion

HETa inhibited leukocyte infiltration and paw edema, displaying its anti-inflammatory action; it also reduced hemorrhage, myotoxicity, and hydrogen peroxide production induced by *Bothrops neuwiedi* venom. The results confirmed the potential of ethnobotanically-selected plant, *Tabebuia aurea*, as an alternative for neutralization of venom-induced local effect.

## Acknowledgments

The authors acknowledge CNPq and FUNDECT for providing research grants. The authors are also grateful to Helder Antônio de Souza - UNIDERP for support with snake venom extraction.

## References

- Agra, M.F., Bracho, G.S., Nurit, K., Basílio, I.J.L.D., Coelho, V.P.M., 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraibano, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 383-395.
- Babior, B. M., 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion Immunology* 16: 42-47.
- Barros, S.F., Friedlanskaia, I., Petricevich, V.L.; Kipnis, T.L., 1998. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators of Inflammation* 7: 339-346.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipases A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research* 50: 237-242.
- Chaves, F., Barboza, M., Gutierrez, J.M., 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33: 31-39.
- Fay, A. J., Qian, X., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2006. SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:17548-53.



1 Guerbas-Neto, P., 2003. Estudo químico da casca, folhas e cerne de um espécime de  
2 *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae) coletado no Pantanal. Dissertação de Mestrado. UFMS,  
3 Campo Grande, Brazil.

4 Gutierrez, J.M., Arroyo, O., Bolanos, R., 1980. Myonecrosis, hemorrhage and edema  
5 induced by *Bothrops asper* venom in white mice. *Toxicon* 18: 603-610.  
6

7  
8 Gutierrez, J.M., Chaves, F., Bolanos, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla,  
9 E., 1981. Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un  
10 antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500.  
11

12  
13 Gutierrez, J.M., Lomonte, B., 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake  
14 venoms. A review. *Memórias do Instituto Butantan* 51: 211-223.  
15

16  
17 Gutierrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gene, J.A., Chaves, F., Alvarado, J., Rojas, E.,  
18 1990. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms.  
19 *Toxicon* 28: 1127-1129.  
20

21  
22 Hadju, Z., Holmann, J., 2012. An ethnopharmacological survey of the traditional  
23 medicine utilized in the community of porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation,  
24 Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 838-857.  
25

26  
27 Harrison, R.A., Wüster, W., Barlow, A., Pook, C.E., 2009. Coevolution of diet and  
28 prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution.  
29 *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 2443-2449.  
30

31  
32 Leite, V.L., Andrade, M.F., Lúcia, M., Gouvêa, C.M. C. P., 2001. Myonecrosis induced  
33 in rat by a myotoxin isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* from Alfenas, MG.  
34 *Revista Brasileira de Farmacognosia* 11:13-19.  
35

36  
37 Lloret, S., Moreno, J.J., 1993. Oedema formation and degranulation of mast cells by  
38 phospholipases A2 purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* 31: 949-  
39 956.  
40

41  
42 Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L. 2003. An overview of lysine-49 phospholipase  
43 A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic  
44 action. *Toxicon* 42:885-901.  
45

46  
47 Lorenzi, H., 1992. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas  
48 arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum Ltda. Nova Odessa, 352p.  
49

50  
51 Martz, W., 1992. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon* 30: 1131-1142.

52  
53 Moreira, V., Gutierrez, J.M., Amaral, R.B., Zamuner, S.R., Teixeira, C.F.P., 2009.  
54 Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and  
55 production of prostaglandins by peritoneal leukocytes *in vivo*, and by isolated  
56 neutrophils and macrophages *in vitro*. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty*  
57 *Acids* 80: 107-114.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Nikai, T.; Mori, N.; Kishida, M.; Sugihara, H.; Tu, A.T., 1984. Isolation and  
2 biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*.  
3 Archives of Biochemistry and Biophysics: 231-309.

4 Nunes, G.P., Silva, M.F., Resende, U.M. De Siqueira, J.M., 2003. Plantas medicinais  
5 comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, MS. Revista Brasileira de  
6 Farmacognosia 13: 83-92.

7  
8  
9  
10 Pereira, N.A., Pereira, B.M.R., Nascimento, M.C., Parente, J.P., Mors, W.B., 1994.  
11 Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom  
12 antidotes. IV- Protection against *Bothrops jararaca* venom by isolated constituents.  
13 Planta Medica 60: 99-100.

14  
15  
16 Petricevich, V.L., Teixeira, C.F.P., Tambourgi, D.V., Gutierrez, J.M., 2000. Increments  
17 in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and  
18 *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon 38: 1253-1266.

19  
20  
21 Pick, E., Mizel, D., 1981. Rapid Microassays for the Measurement of Superoxide and  
22 Hydrogen-Peroxide Production by Macrophages in Culture Using an Automatic  
23 Enzyme-Immunoassay Reader. Journal of Immunological Methods 46, 211-226.

24  
25  
26 Rizzini, C.T., Mors, W.B., Pereira, N.A., 1988. Plantas brasileiras tidas como ativas  
27 contra peçonhas de animais, especialmente veneno de cobra. Revista Brasileira de  
28 Farmacognosia 69: 82-86.

29  
30  
31 Rucavado, A., Lomonte, B., 2000. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and  
32 edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-  
33 existing antibodies in mice. Toxicon 34: 567-577.

34  
35  
36 Ruppelt, B.M., Pereira, E.F.R., Gonçalves, L.C., Pereira, N.A., 1991. Pharmacological  
37 screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom I: analgesic and  
38 antiinflammatory activities. Memórias do Instituto Butantan 86: 203-206.

39  
40  
41 Russo, M., Teixeira, H.C., Marcondes, M.C.G., Barbuto, J.A.M., 1989. Superoxide-  
42 Independent Hydrogen-Peroxide Release by Activated Macrophages. Brazilian Journal  
43 of Medical and Biological Research 22, 1271-1273.

44  
45  
46 Setubal, S.S., Pontes, A.S., Furtado, J.L., Kayano, A.M., Stábeli, R.G., Zuliani, J.P.,  
47 2011. Effect of *Bothrops alternatus* snake venom on macrophage phagocytosis and  
48 superoxide production: participation of protein kinase C. Journal of Venom Animals  
49 Toxins included Tropical Diseases 17: 430-441.

50  
51  
52 Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Athayde, M.L., 2007. Saponinas. In: Simões, C.M.O. et  
53 al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da  
54 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 711-40.

55  
56  
57 Silva, M.L, Filho, V.C., 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e  
58 potencial farmacológico. Química Nova 25: 449-454.

59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced o edema in hind  
2 paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of the Society for  
3 Experimental Biology and Medicine: 111: 544-547.

4 Zamuner, S.R., Gutierrez, J.M., Muscara, M. N., Teixeira, A.S., Teixeira, C.F.P., 2001.  
5 *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of  
6 peritoneal leukocytes *in vivo*. Toxicon 39: 1505-1513.

7  
8  
9 Zamuner, S.R., Teixeira, C.F.P., 2002. Cell adhesion molecules involved in the  
10 leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. Mediators of  
11 Inflammation 11: 351-7.

12  
13  
14 Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Gutierrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2005.  
15 Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from  
16 *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. Toxicon 45: 335-346.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Figures and table captions

**Table 1.** Effects of the hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HETa) on BnV-induced mice paw edema.

**Figure 1** – Effect of the hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HETa) on polymorphonuclear (PMN) influx into the peritoneal cavity in mice injected with BnV (10 µg/0.5 mL, i.p.). The control group was injected i.p. with sterile saline solution. Indomethacin (15 mg/kg, p.o, positive control) or water (10 mL/kg, p.o., vehicle) was administered 60 minutes before injection of the BnV. Cells numbers are expressed as the mean ± S.E.M (n = 7). # $P < 0.05$  compared to the saline group. \* $P < 0.05$  compared to BnV. ANOVA and Bonferroni Test.

**Figure 2** – Effect of hydroethanolic *Tabebuia aurea* extract (HETa) on hemorrhage induced by *Bothrops neuwiedi* venom (BnV). (A) Hemorrhagic area, and (B) hemoglobin concentration. Three hours after intradermal injection of BnV in the dorsal region of mice (n=6). Results expressed as mean±S.E.M.. Student *t* test.  $P < 0.05$ .

**Figure 3** – Effect of hydroethanolic *Tabebuia aurea* extract (HETa) on myotoxicity induced by *Bothrops neuwiedi* venom (BnV). Determination of serum creatine kinase (CK, U/L) three hours after BnV injection into the gastrocnemius muscle (n=10). Results expressed as mean±S.E.M.. ANOVA and Bonferroni test.  $P > 0.05$ .

**Figure 4** – Histological section of mouse gastrocnemius muscle three hours after intramuscular BnV administration. Intense hemorrhagic (H) and accentuated leukocyte infiltrated (I) tumefied muscle. H/E staining.

**Figure 5** – Histological section of mouse gastrocnemius muscle three hours after intramuscular neutralized BnV administration. Hemorrhage (H) and moderate leukocyte infiltrated (I) tumefied muscle (T). H/E staining.

**Figure 6**– Effect of the hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HETa) on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production by peritoneal macrophages (MF). The cells were collected 96 h after ip injection of 3% thioglycolate. Macrophages (2 x 10<sup>5</sup> cells/well) were resuspended in phenol red solution containing horseradish peroxidase. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was determined one hour after incubation with *Bothrops neuwiedi* venom (BnV, 10µg/mL, 10µL), HETa (250µg/mL, 10µL) or neutralized BnV (1:50, 10µL). Values represent the mean±S.E.M. of three experiments performed in triplicate. # $P < 0.05$  compared to control. \* $P < 0.05$  compared to BnV. ANOVA and Bonferroni test.

Table 1.

| Group                      | Dose<br>(mg/Kg) | Paw edema (mL) and inhibition (%) |       |             |       |             |       |             |       |
|----------------------------|-----------------|-----------------------------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
|                            |                 | 30 min                            | %     | 60 min      | %     | 120 min     | %     | 240 min     | %     |
| <b>Control</b>             |                 | 0.152±0.006                       |       | 0.127±0.006 |       | 0.108±0.003 |       | 0.088±0.007 |       |
| <b>Indomethacin</b>        | <b>15</b>       | 0.104±0.006                       | 31.6* | 0.053±0.009 | 58.3* | 0.036±0.009 | 66.7* | 0.025±0.006 | 71.6* |
| <b>HETa</b>                | <b>100</b>      | 0.133±0.009                       | 12.5  | 0.097±0.008 | 23.7  | 0.090±0.008 | 16.7  | 0.077±0.008 | 12.5  |
| <b>HETa</b>                | <b>200</b>      | 0.140±0.014                       | 7.9   | 0.084±0.007 | 33.9* | 0.063±0.007 | 41.7* | 0.042±0.009 | 52.3* |
| <b>HETa</b>                | <b>400</b>      | 0.124±0.008                       | 18.4  | 0.095±0.009 | 25.2  | 0.095±0.009 | 12.0  | 0.048±0.006 | 45.5* |
| <b>BnV<br/>neutralized</b> | <b>1:50</b>     | 0.118±0.008                       | 22.4  | 0.102±0.004 | 19.7  | 0.072±0.005 | 33.3* | 0.053±0.006 | 39.8* |

Values are expressed as the mean±S.E.M. (n=7). Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's Test for comparisons between groups. \*Statistical significance:  $P<0.05$  when compared with the control.

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

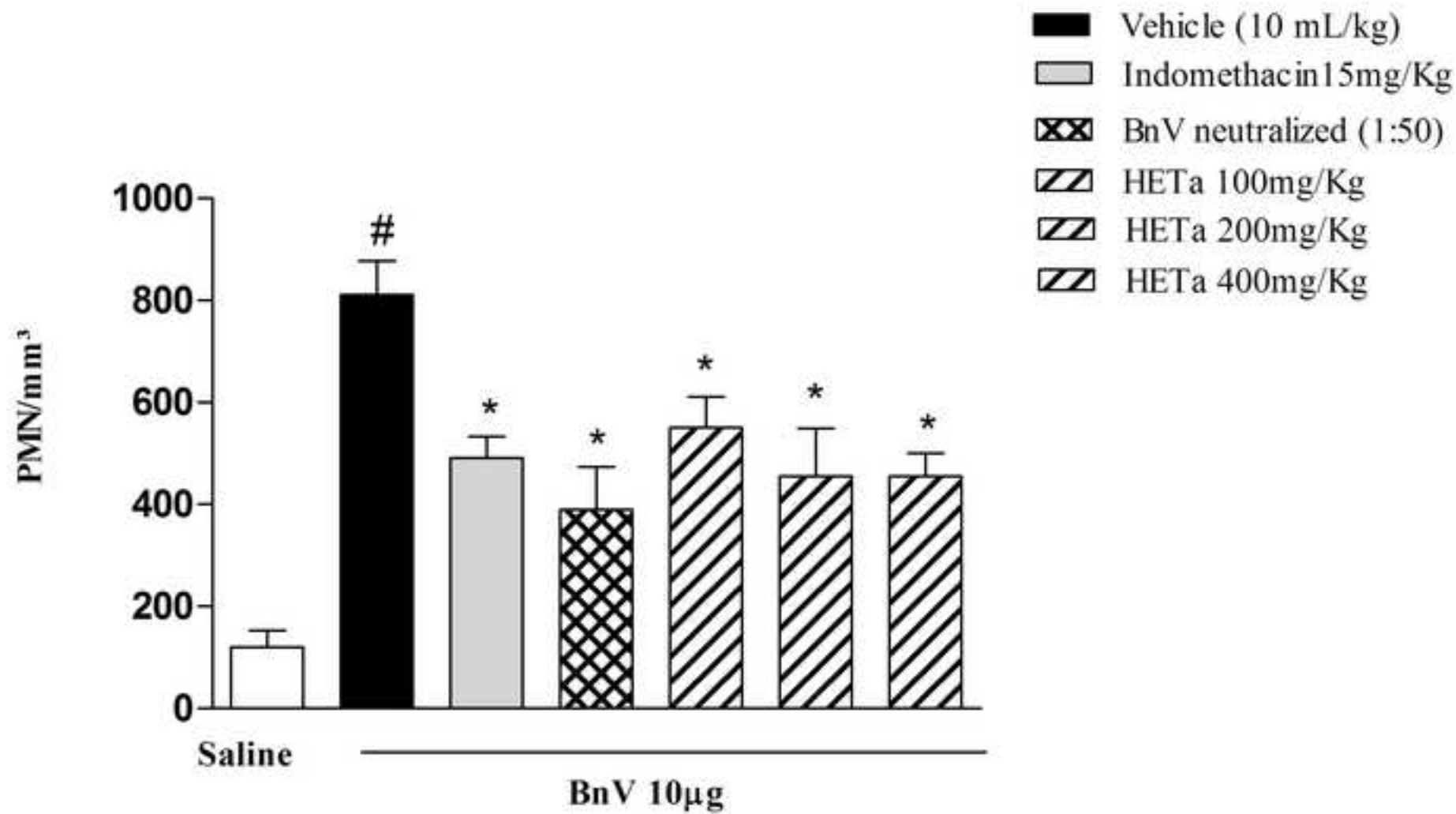


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

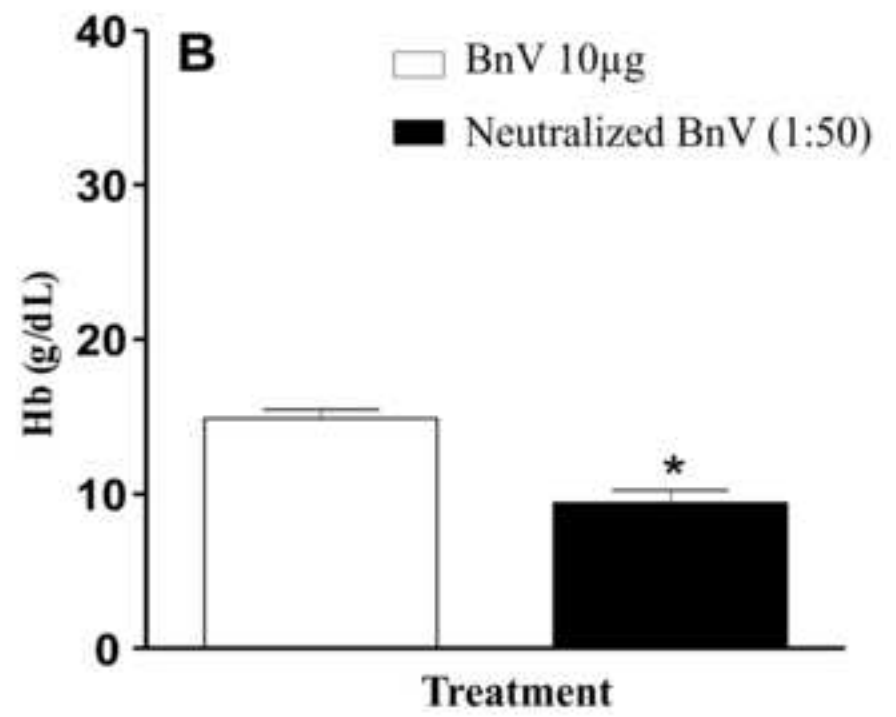
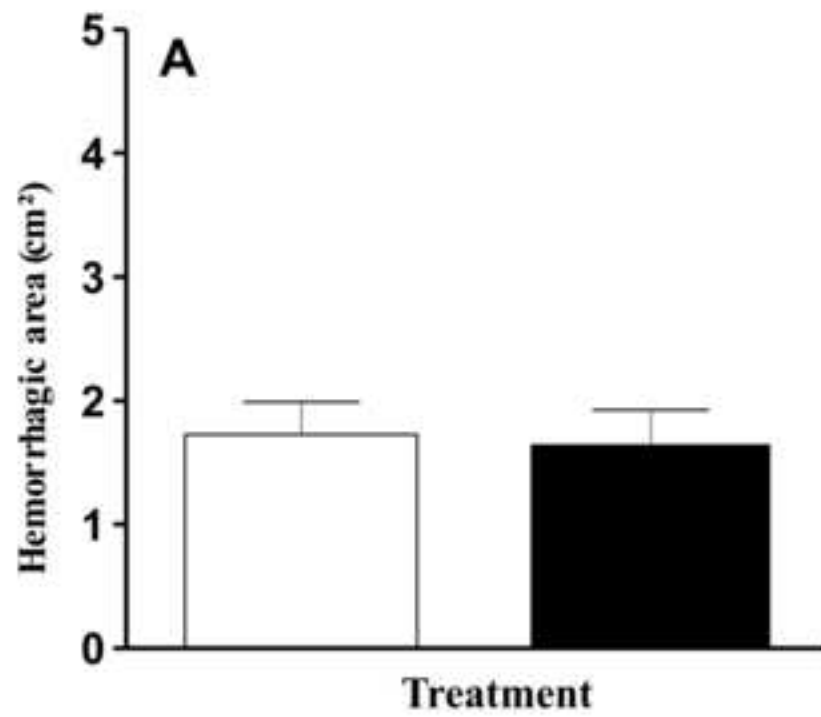
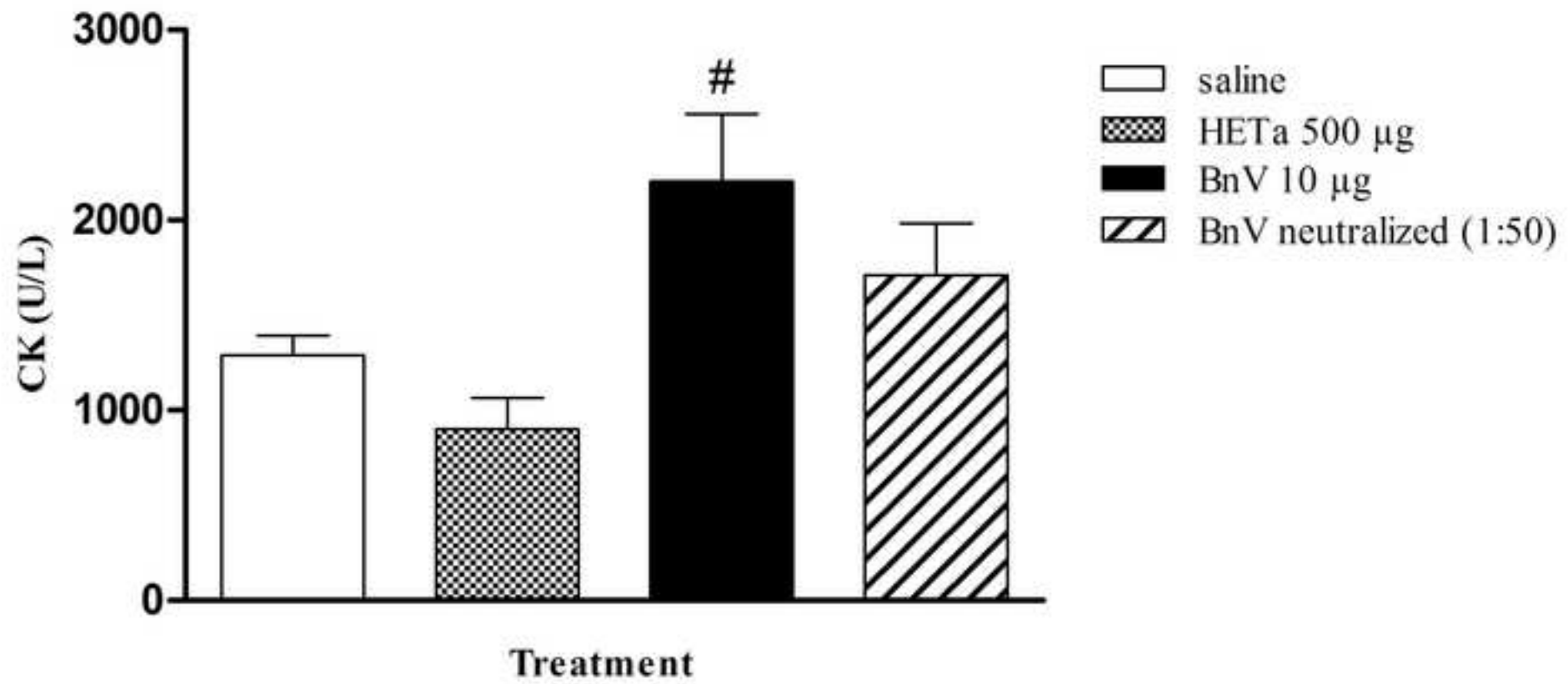


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)





**Figure 4**  
[Click here to download high resolution image](#)

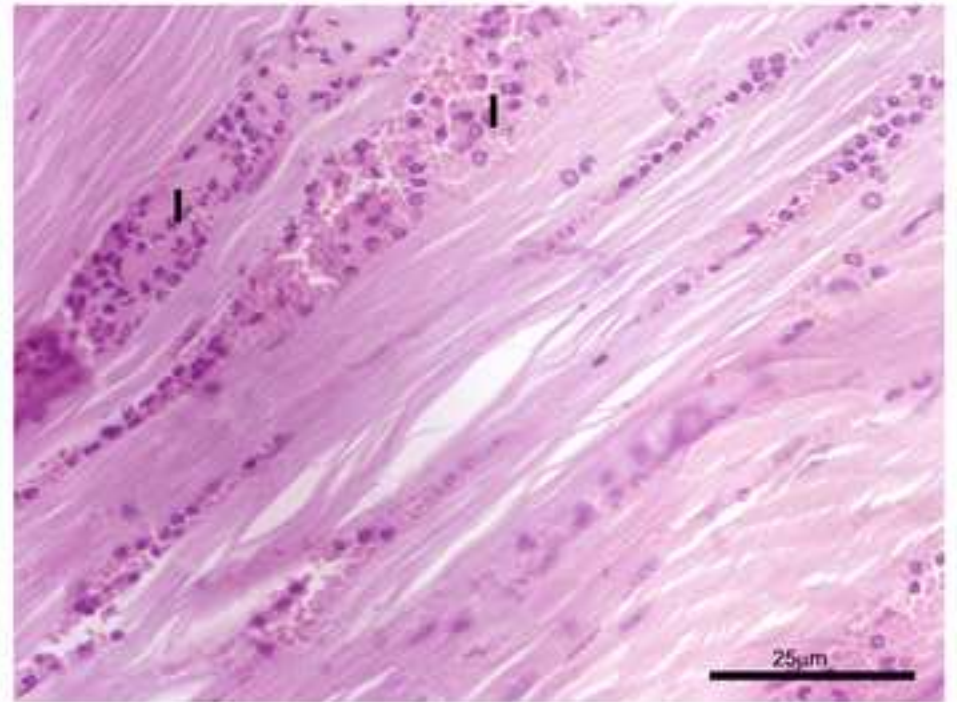
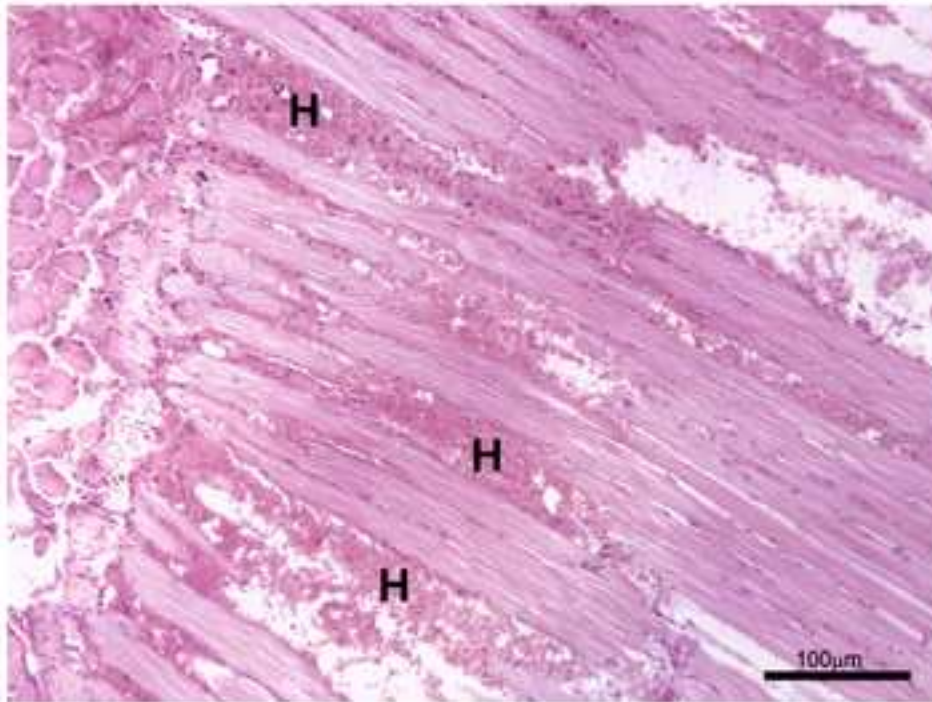


Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)

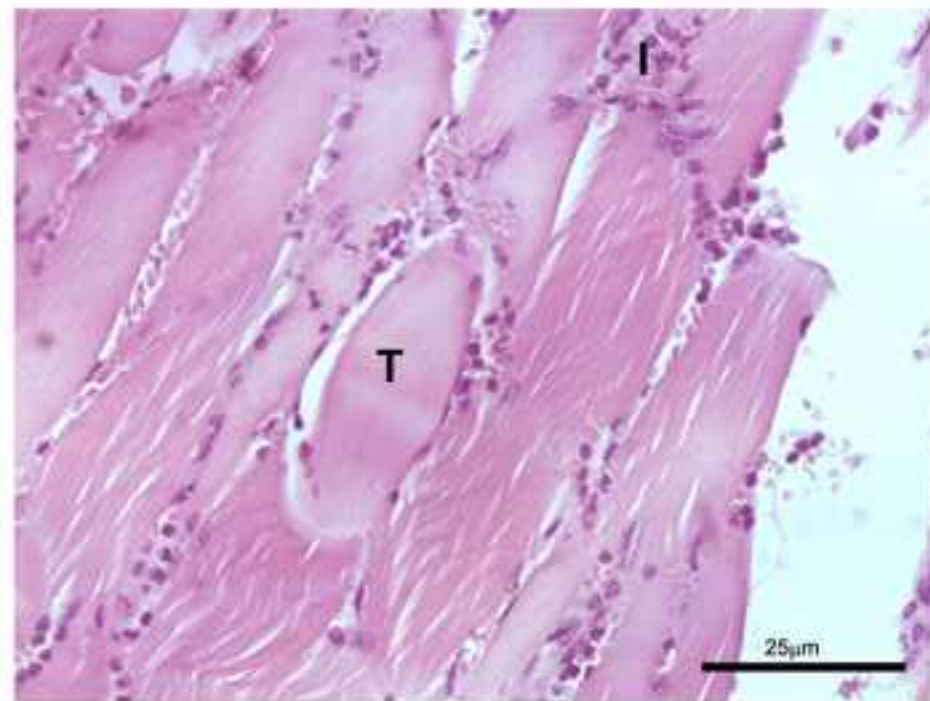
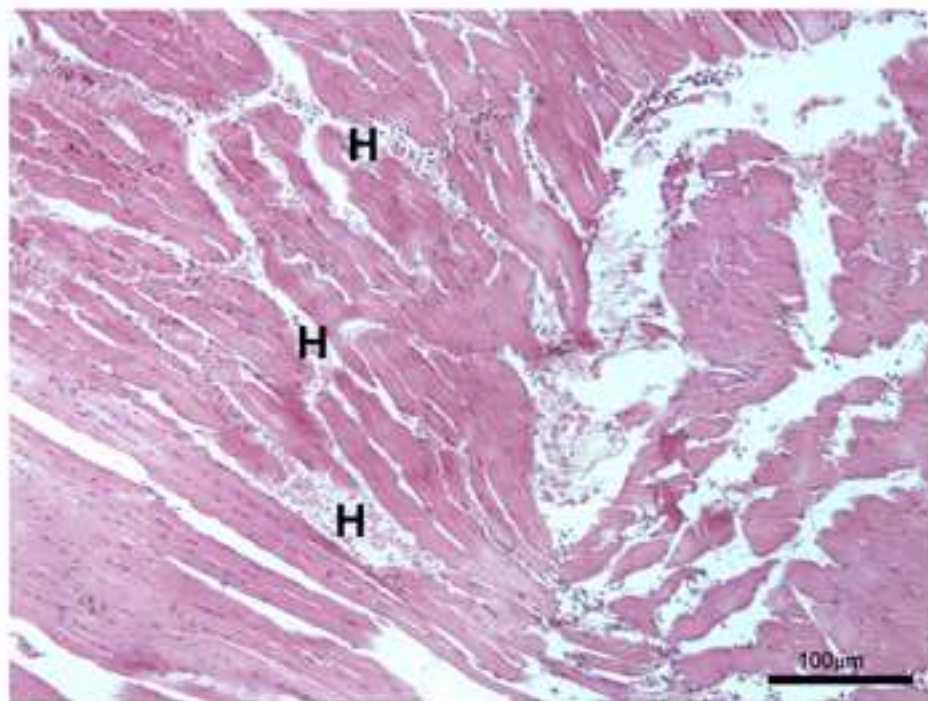
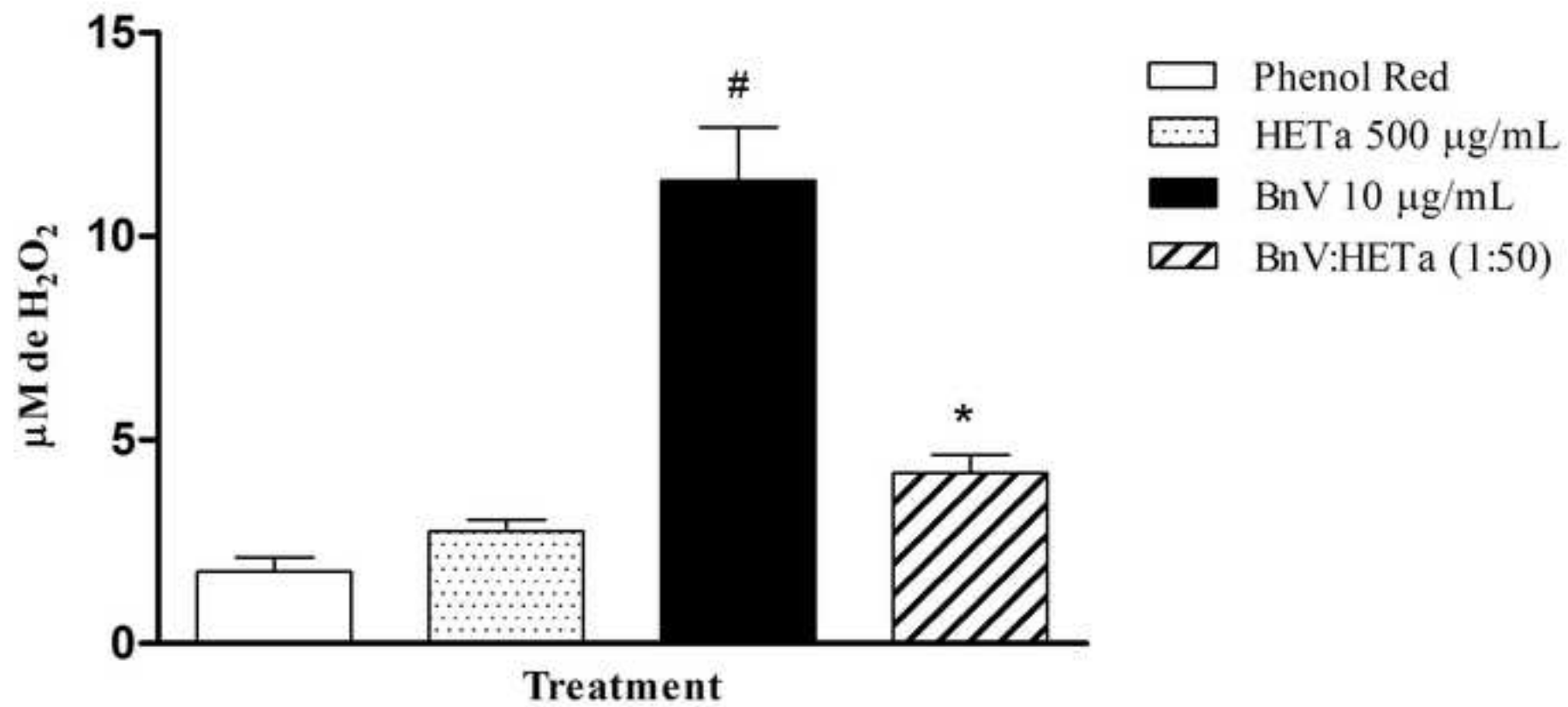


Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)



**Colin Edward Knaggs**  
**17a Oval Way, Ferring,**  
**BN12 5RA, West Sussex, UK**  
**btcolin@terra.com.br**  
**+44 1903 507400**

16<sup>th</sup> July 2014

To whom it may concern,

**Editing and correction of English**

I confirm that the manuscript detailed below has undergone English language review, editing and correction.

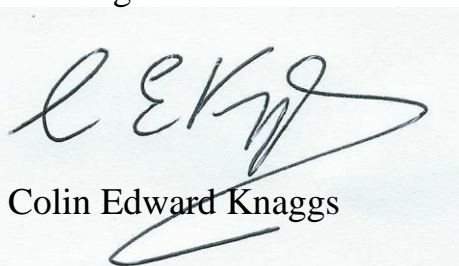
**Manuscript Title:** Hydroethanolic *Tabebuia aurea* extract decreases inflammatory, myotoxic, and hemorrhagic activities induced by *Bothrops neuwiedi* venom

**Author/s:** Profa Dra Mônica Cristina Toffoli Kadri

**Date of editing:** 16<sup>th</sup> July 2014

A copy of the said manuscript is available on request with the author's permission.

Best regards



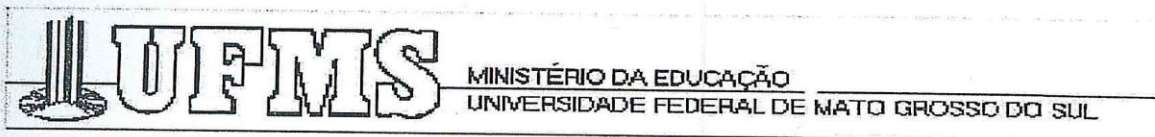
Colin Edward Knaggs

Native British speaker and professional Portuguese to English translator and English language editor conversant with scientific language and methodology

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* inibiu a infiltração de leucócitos e o edema de pata, exibindo sua ação anti-inflamatória; também reduziu hemorragia, miotoxicidade, e a produção de peróxido de hidrogênio induzida pelo veneno de *Bothrops neuwiedi*. Os resultados confirmaram o potencial do extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* em neutralizar o efeito local induzido pelo veneno.

## 7 ANEXO



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 303 da Pesquisadora Mônica Cristina Toffoli Kadri, “Investigação sobre as atividades antiofídicas do extrato hidroetanólico de *Tabebuia áurea* em camundongos estimulados com o veneno de serpentes botrópicas da região Centro-Oeste: *Bothrops moojeni*, *Bothrops newviedi* e *Bothrops jararaca* – estudos *in vivo* e *in vitro*”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 14 de abril de 2011.

Campo Grande (MS), 14 de abril de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Stein', is written over a faint, illegible stamp or watermark.

Dra. Joice Stein  
Coordenadora da CEUA