

PREDIÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DO EFEITO COAGULANTE DA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis* PELO EXTRATO AQUOSO DE *Hedychium coronarium* (ZINGEBERACEAE) ATRAVÉS DE MODELOS DE REGRESSÃO

PREDICTION OF NEUTRALIZATION OF CLOTTING EFFECT OF VENOM *Bothrops pauloensis* BY AQUEOUS EXTRACT OF *Hedychium coronarium* (ZINGEBERACEAE) THROUGH OF REGRESSION MODELS

Janser Moura PEREIRA²; Quintiliano Siqueira Schroden NOMELINI³;
Luiz Fernando Moreira IZIDORO⁶; Suelen Xavier OLIVEIRA¹;
Veridiana Melo RODRIGUES⁴; Maria Inês HOMSI-BRANDEBURGO⁴;
Amélia HAMAGUCHI⁴; Mirian Machado MENDES⁵; Livia Maria ALVES¹

1. Graduanda em Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Integradas do Pontal – FACIP, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Ituiutaba, MG, Brasil; 2. Professor, Doutor, Faculdade de Matemática, FAMAT - UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 3. Professor, Mestre, Faculdade de Matemática, FAMAT - UFU, Uberlândia, MG, Brasil, quintiliano@famat.ufu.br; 4. Professoras, Doutoradas, Instituto de Genética e Bioquímica – INGEB - UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 5. Doutoranda em Genética e Bioquímica, INGEB – UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 6. Professor, Doutor, FACIP – UFU, Ituiutaba, MG, Brasil.

RESUMO: Envenenamentos com serpentes do gênero *Bothrops* podem causar sequelas no local da picada, que não são revertidas mesmo após o tratamento com soro antiofídico. A incubação do extrato aquoso de *Hedychium coronarium* (Zingiberaceae) com a peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* em diferentes concentrações foi capaz de inibir a atividade coagulante. No presente trabalho ajustou-se um modelo de regressão entre níveis de concentração de extrato e tempo de coagulação (segundos). O modelo ajustado conseguiu captar cerca 96 % da variação total do tempo de coagulação.

PALAVRAS-CHAVE: *Bothrops pauloensis*. Extrato aquoso. Inibição. Modelos de regressão.

INTRODUÇÃO

Há atualmente cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil estão representadas as famílias de 75 gêneros e 321 espécies correspondentes a 10% do total de espécies conhecidas (CARDOSO et al., 2003). O gênero *Bothrops* possui mais de 30 espécies e subespécies que estão distribuídas do sul do México a Argentina e em algumas ilhas do Caribe (GREENE, 2000).

Estima-se que acidentes ofídicos afetam mais que 2,5 milhões de pessoas anualmente no mundo, dos quais 100 mil resultam em morte (WRITE, 2005). As peçonhas de serpentes são provavelmente as mais complexas de todas as peçonhas animais. De acordo com características estruturais e funcionais, as proteínas tóxicas presentes na peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* podem ser divididas em várias classes, tais como: metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, etc; agindo sempre de forma isolada ou sinérgica no organismo das vítimas (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As PLA₂s (E. C. 3.1.1.4) são enzimas que tem como substrato os fosfolipídeos que são constituintes da membrana plasmática celular e podem estar associadas com hemólise (KIHARA et al, 1992), miotoxidade (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995), edema (LLORET; MORENO, 1993), agregação plaquetária (RODRIGUES et al., 2007), hemólise indireta (CONDREA et al, 1981), hipotensão (HUANG, 1984), cardiotoxicidade (FLETCHER et al, 1981), citotoxicidade (COSTA et al., 2008), e efeito antitumoral (GEBRIM et al., 2009). Outras manifestações clínicas produzidas pelo envenenamento com esta espécie, *Bothrops pauloensis*, são caracterizadas por quadros de inflamação, hemorragia local e sistêmica, necrose tecidual e neurotoxicidade (FRANCO, 2003; TSETLIN; HUCHO, 2004). Entretanto, o distúrbio da homeostasia é a principal manifestação clínica. Algumas proteínas presentes na peçonha são capazes de ativar fatores presentes na cascata de coagulação, enquanto que outros podem interagir com plaquetas induzindo sua agregação. Tais efeitos são atribuídos, principalmente a duas classes de toxinas: metaloproteases (MPs) e serinoproteases (SPs) (COMINETTI et al., 2004; GUTIÉRREZ et al., 2005).

As metaloproteases denominadas fatores hemorrágicos (hemorraginas) são enzimas dependentes Zn^{++} , e apresentam grande diversidade em relação à massa molecular (20 a 100 kDa). Elas são responsáveis pela maioria dos efeitos sistêmicos, tais como, hemorragia, mionecrose, lesões na pele, inflamação, influxo celular inflamatório dependente de citocinas, ativação do sistema complemento e ativação de metaloproteases endógenas de matriz (MMPs) (BJNARSON; FOX, 1994). O mecanismo de ação destas toxinas consiste na degradação das proteínas da matriz extracelular e pelo efeito citotóxico direto nas células endoteliais, sua ação ocorre quase que exclusivamente na membrana basal dos vasos capilares (BARRAVIEIRA, 1994), promovendo sua dissolução. Observa-se nas vítimas quadros hemorrágicos como: equimoses, sangramentos gengivais e até viscerais. Dentre as proteases existem as enzimas fibrinogenolíticas que atuam sobre o fibrinogênio, podendo hidrolisar suas cadeias ($A\alpha$, $B\beta$ e γ), levando a incoagulabilidade sangüínea (MATSUI et al., 2000).

Outro grupo de proteases são as enzimas "Thrombin-like", que são serinoproteases. Estas enzimas convertem o fibrinogênio em fibrina liberando os fibrinopeptídeos A e B, formando, portanto o microcoágulo de fibrina, porém as "Thrombi-like" não ativam o fator XIIIa, responsável por unir de forma cruzada os monômeros de fibrina, tornando o coágulo mais denso. Deste modo o coágulo fica mais suscetível à degradação pela plasmina, induzindo assim um estado de desfibrinogrnção *in vivo* (FAN et al, 1999). As serino proteases também são capazes, de ativar o fator V da coagulação e a proteína C plasmática e clivar o componente C3 do sistema complemento (PETRETSKI et al, 2000).

A quantidade de acidentes ofídicos notificados no Brasil central, apesar de baixa é considerada como um problema de saúde pública, pois quando o paciente é tratado com soro antiofídico de forma efetiva, os efeitos sistêmicos são neutralizados, enquanto os locais não são revertidos, havendo uma possibilidade real de surgirem sequelas (ANAI et al, 2002). Diante disso, muitos pesquisadores vêm buscando as plantas medicinais como terapia alternativa, devido ao seu papel antiofídico (IZIDORO et al., 2003; SOARES et al., 2005; VALE et al., 2008; MENDES et al., 2008; MENDES et al., 2010). Segundo Matsuda et al. (2002) e Chimnoi et al. (2009) da planta *Hedychium coronarium* já foi isolado alguns tipos de diterpenos que baseado na literatura, estas

moléculas são caracterizadas como antiofídicas (MORS et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de modelos de regressão linear o grau de eficiência da neutralização da peçonha de *Bothrops pauloensis* pelo extrato aquoso de *Hedychium coronarium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a preparação do extrato aquoso de *Hedychium coronarium*, raízes da planta foram levadas em H_2O deionizada e as partes secas desprezadas. Em seguida o material foi macerado com H_2O deionizada, filtrado em peneira comum e centrifugado durante 27 minutos a $4^\circ C$ com rotação de 5000 *xg*. O sobrenadante resultante foi congelado a $-80^\circ C$, liofilizado e armazenado a $-20^\circ C$ até o momento do uso.

A atividade coagulante foi realizada utilizando-se como substrato plasma bovino citratado, conforme descrito por Assakura et al. (1992). Foi utilizado para cada ensaio um volume de 100 μl de plasma bovino previamente incubado a $37^\circ C$. A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação no aparelho coagulômetro Quick Timer II (DRAKE LTDA) ao primeiro sinal de formação da rede de fibrina, após adição de 25 μg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* incubada ou não com extrato aquoso de *Hedychium coronarium* nas proporções de 1:5, 1:10 e 1:50 (m/m; peçonha/extrato). O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi medido em segundos, sendo que a inibição da atividade foi observada de acordo com aumento médio do tempo da coagulação em relação aos controles contendo apenas peçonha e extrato vegetal, respectivamente.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições. Foram utilizados 4 tratamentos: T₁: peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*; T₂: peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* incubada durante 30 minutos com extrato aquoso de *Hedychium coronarium* na proporção de 1:5 (m/m; peçonha/extrato); T₃: peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* incubada por 30 minutos com extrato aquoso de *Hedychium coronarium* na proporção de 1:10 (m/m; peçonha/extrato); T₄: peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* incubada por 30 minutos com extrato aquoso de *Hedychium coronarium* na proporção de 1:50 (m/m; peçonha/extrato).

No presente trabalho ajustou-se um modelo de regressão entre níveis de concentração de extrato e tempo de coagulação (segundos). A regressão tem

por objetivo estudar a relação entre níveis de concentração de extrato e tempo de coagulação visando descobrir uma curva que a descreva, utilizando-se esta para fins de estimativa ou predição do tempo de coagulação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inibição da coagulação do plasma bovino citratado pelo extrato aquoso de *Hedychium coronarium* foi dose dependente, conforme a Tabela 1. Para os testes realizados como controles, contendo somente tampão fosfato e extrato vegetal não houve coagulação. Resultados semelhantes foram obtidos por Izidoro et al. (2003).

Tabela 1. Inibição da atividade coagulante plasma bovino citratado pelo extrato aquoso de *H. coronarium*.

Tratamentos (Peçonha/extrato)	(*) $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
(1:0; m/m)	73,87±0,82
(1:5; m/m)	85,60±1,53
(1:10; m/m)	94,67±1,77
(1:50; m/m)	110,67±1,76

(*) \bar{X} : média do tempo de coagulação; $S_{\bar{X}}$: erro padrão da média do tempo de coagulação.

Os três graus de liberdade referentes a tratamentos (concentrações de extrato) foram decompostos em componentes individuais a fim de estudar separadamente os efeitos de 1º grau ou

linear, de 2º grau ou quadrático e de 3º grau ou cúbico. Na Tabela 2 é apresentada a análise de variância para a variável “tempo de coagulação”.

Tabela 2. Análise de variância para a variável “tempo de coagulação” (em segundos).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F _c	p-valor
Tratamento	3	2168,32	722,773	104,184	<0,000**
Erro	8	55,50	6,937		
Total	11	2223,82			

** Significativo a 1 % de probabilidade

Ao nível de significância de 1%, os tratamentos são significativos, ou seja, existe uma diferença significativa entre níveis de concentração de extrato e tempo de coagulação. Portanto, os resultados permitem concluir que o nível de

concentração de extrato influencia no tempo de coagulação.

Na Tabela 3 é apresentada a decomposição em componentes linear, quadrático e cúbico referente à soma de quadrados de tratamentos (concentrações de extrato).

Tabela 3. Análise de Variância referente à decomposição da soma de quadrado de tratamentos.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F _c	p-valor
Regressão linear	1	1836,62	1836,62	264,74	<0,000**
Regressão Quadrática	1	331,22	331,22	47,74	<0,000**
Regressão Cúbica	1	0,48	0,48	0,069	0,799
Erro	8	55,50	6,937		
Total	11	2223,82			

** Significativo a 1 % de probabilidade

Cada um dos quadrados médios é testado por meio do erro e a hipótese de nulidade é a de que a média de população para a comparação é zero. Se somente o efeito linear é significativo, conclui-se que o aumento na resposta para níveis sucessivos do fator (concentração de extratos) é constante. Um efeito quadrático significativo indica que uma equação de regressão de 2º grau ajusta melhor os dados, isto é, o aumento ou decréscimo para cada

aumento de nível do fator não é constante, mas muda progressivamente. Portanto, a análise mostra que o efeito linear (ou 1º grau) e efeito quadrático são altamente significativos para as concentrações de extrato. O componente de 3º não significativo indica que não trariam melhora alguma ao ajustamento.

Para escolher qual modelo se ajusta melhor ao conjunto de dados foi realizado um teste para

falta de ajuste dos modelos: linear (1° grau) e quadrático (2° grau). O teste para a falta de ajuste (*Lack of fit*) baseia-se nas seguintes hipóteses: H_0 -

não há falta de ajuste e H_a - há falta de ajuste. Os resultados do teste são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Análise de Variância referente ao teste para falta de ajuste para o modelo de regressão de 2° grau.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F _c	p-valor
Regressão Quadrática	2	2167,8	1083,9	174,26	<0,000**
Erro	9	56,0	6,2		
<i>Lack of fit</i>	1	0,5	0,5	0,07	0,799
Erro	8	55,5	6,9		
Total	11	2223,8			

Ao nível de significância de 5%, o modelo de regressão quadrático não apresenta falta de ajuste, pois o p-valor da falta de ajuste mostrado na

Tabela 4 de análise de variância é maior que 0,05 (0,799).

Tabela 5. Análise de Variância referente ao teste para falta de ajuste para o modelo de regressão de 1° grau.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F _c	p-valor
Regressão Linear	1	1836,6	1836,6	47,43	<0,000**
Erro	10	387,2	38,72		
<i>Lack of fit</i>	2	331,7	165,8	23,91	<0,000**
Erro	8	55,5	6,9		
Total	11	2223,8			

Ao nível de significância de 5% rejeita-se H_0 , ou seja, o modelo de regressão de 1° grau ajustado apresenta falta de ajuste, pois o p-valor da falta de ajuste mostrado na Tabela 5 de análise de

variância é menor que 0,05 (<0,000**). Portanto, ajustou-se uma equação de 2° grau conforme Tabela 6.

Tabela 6. Estatísticas referentes a composição do modelo de regressão de 2° grau estimado.

Parâmetros	Estimativas	95% de confiança		⁽¹⁾ R ²	⁽²⁾ R ² _{Ajustado}
		LI	LS		
β_0	74,0128	70,98037	77,04525	0,9748	0,9623
β_1 (X*)	24,2132	18,58325	29,84311		
β_2 (X ²)	-3,3766	-4,42341	-2,32988		

(*)X: nível ou dose de concentração de extrato; ⁽¹⁾R²: coeficiente de determinação e ⁽²⁾R²_{Ajustado}: Coeficiente de determinação ajustado.

De acordo com a Tabela 6, todos os parâmetros do modelo são significativos, ao nível de 5% de significância. Segundo Anderson et al., (2007), para dados na área de ciências biológicas, valores de R² iguais ou maiores a 0,60 frequentemente são considerados úteis. Portanto, o modelo quadrático pode ser indicado para predição do tempo de coagulação em função do nível (ou dose) de concentração de extrato aquoso de *Hedychium coronarium*. Com base no coeficiente de determinação ajustado pode-se dizer que o modelo estimado (2° grau) consegue captar cerca 96% da variação total do tempo de coagulação.

Na Figura 1 é apresentado o gráfico de dispersão referente aos níveis de concentração de extrato (em µl) versus tempo de coagulação (em segundos) para o modelo de 2° grau.

Para verificar as pressuposições de normalidade, independência e homogeneidade dos resíduos foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, de Durbin-Watson e de Bartlett, respectivamente. Os resultados dos testes estão apresentados na Tabela 7.

A partir da Tabela 7 tem-se que o p-valor da estatística de Shapiro-Wilk é maior que 5%, o que indica a não rejeição de H_0 , ou seja, é admissível a hipótese de normalidade dos resíduos para o modelo de 2° grau (ROYSTON, 1983). Analogamente, tem-se que o p-valor da estatística do teste de Bartlett é maior que 5%, o que indica a não rejeição de H_0 , ou seja, é admissível a hipótese de variância constante para todos os níveis de concentração dos extratos (MINITAB Inc., 2006).

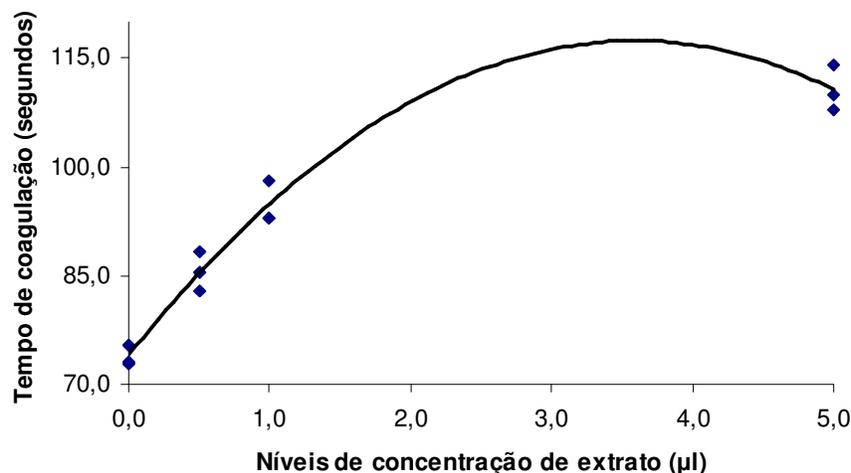


Figura 1. Gráfico de dispersão de níveis de concentração de extrato versus tempo de coagulação para o modelo de 2º grau.

Tabela 7. Resultados dos testes de Shapiro-Wilk, Durbin-Watson e Bartlett para o resíduo do modelo de regressão de 2º grau com $n = 12$.

Teste	Estatística	p-valor	Teste Durbin-Watson	
			Estatística - D	3,0313
Shapiro-Wilk	0,8751	0,0759	Di	du
Bartlett	1,03	0,794	0,812	1,579

⁽¹⁾ D: valor da estatística de Durbin-Watson; ⁽²⁾ di: Limite inferior do teste ⁽³⁾ du: Limite superior do teste.

O teste de Durbin-Watson determina se existe ou não a correlação entre os resíduos. A regra de decisão é: Se $D > du$ (limite superior), não existe correlação nos resíduos; Se $D < di$ (limite inferior), existe uma correlação positiva; Se $di < D < du$, o teste é inconclusivo (MINITAB Inc., 2006). Portanto, o modelo de 2º grau estimado possui resíduos independentes. Logo, o modelo escolhido para prever o tempo de coagulação em função do nível (ou dose) de concentração de extrato aquoso de *Hedychium coronarium* é: $\text{Tempo} = 74,0128 + 24,2132 \text{ Dose} - 3,3766 \text{ Dose}^2$.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que o extrato aquoso da raiz *Hedychium coronarium* possui compostos

com a capacidade de inibir alguns dos efeitos tóxicos induzidos pela peçonha de *B. pauloensis*.

O modelo quadrático estimado apresentou um bom ajuste, pois conseguiu captar cerca 96 % da variação total do tempo de coagulação. Porém, em estudos futuros, pretende-se estudar a relação entre níveis de concentração de extratos aquoso de *Hedychium coronarium* nas proporções de 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:50 (m/m; peçonha/extrato), a fim de determinar se esta relação quadrática é mantida.

Dessa forma, fica evidente que uma possível purificação desses inibidores pode ser útil na complementação dos antivenenos utilizados no tratamento contra os danos causados por picadas de serpentes.

ABSTRACT: Envenomations with snakes *Bothrops* genus can cause dependency at the sting site, which are not reversed even after treatment with snake antivenoms. Incubation of the aqueous extract of *Hedychium coronarium* (Zingiberaceae) with snake venom *Bothrops pauloensis* in different concentrations was able to inhibit some enzymatic activities. This work has set a model of regression between concentrations of extract and clotting time (seconds). The adjusted model has captured about 96% of the total variation of clotting time.

KEYWORDS: *Bothrops pauloensis*. Aqueous extract. Inhibition. Regression models.

REFERÊNCIAS

- ANAI, K; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, n. 1, p. 63-68, jan. 2002.
- ANDERSON, David R.; SWEENEY, Dennis J.; WILLIAMS, Thomas A. **Estatística aplicada à administração e economia**. 2. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007. 597 p.
- ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAUM, F. R. Biochemical and Biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 102B, n. 4, p. 727-732, ago. 1992.
- BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: Uma visão integrada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas LTDA, 1994. 411 p.
- BJNARSON, J. W.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Pharmacol. Therapeutics**. v. 62, p. 325-372, 1994.
- CARDOSO, João Luiz Costa; FRANCA, Francisco Oscar de Siqueira; WEN, Fan Hui. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 468 p.
- CHIMNOI, N.; SARASUK, C.; KHUNNAWUTMANOTHAM, N.; INTACHOTE, P.; SEANGSAI, S.; SAIMANEE, B.; PISUTJAROENPONG, S.; MAHIDOL, C.; TECHASAKUL, S. Phytochemical reinvestigation of labdane-type diterpenes and their cytotoxicity from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 184-187, nov. 2009.
- COMINETTI M. R.; TERRUGGI, C. H.; RAMOS, O. H.; FOX, J. W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDO, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation *in vitro*. **Journal of Biological Chemistry** v. 18, p. 18247-18255, abr. 2004.
- CONDREA, E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Lack correlation between the anticoagulant activity and phosphatidylserine hydrolysis by snake venom phospholipase A₂. **Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, p. 82-89, 1981.
- COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STABELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645 – 1656, 2008.
- FAN, C. Y.; QIAN, Y. C.; YANG, S. L.; et al. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the cDNA of Thrombi-like enzyme (Pallabin) from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 47, p. 217-25, 1999.
- FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipase A₂ from elapid snake venoms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 59, p. 375- 382, 1981.
- FRANCO, L. F. **Origem e diversidade das serpentes**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo, Editora Sarvier, p. 13-32, 2003.

GEBRIM, L. C.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D. L.; MENEZES, C. S. R.; NOMIZO, A.; HAMAGUCHI, A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A₂-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, v. 37, p. 222-229, 2009.

GREENE, Harry W. Snakes: the evolution of mystery in nature. 1. ed. Berkeley: University of California Press, 2000. 351 p.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-24, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCARLANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1077, 2005.

HUANG, H. C. Realese of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A₂ of *Viperidae russelli* snake venom. **Toxicon**, v. 22, p. 359-65, 1984.

IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V. HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and 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, p. 669-675, 2003.

KIHARA, H.; UCHIKAWA, R.; HATTORI, S.; OHNO, M. Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂. **Biochem Int**, v. 28, p. 895-903, 1992.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 949-956, 1993.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; SAKAMOTO, Y.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Labdane-type Diterpenes with Inhibitory Effects on Increase in Vascular Permeability and Nitric Oxide Production from *Hedychium coronarium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2527-2534, 2002.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Casealpinaceae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 859-866, 2008.

MENDES, M. M.; VALE, L.H. F.; IZIDORO, L. F. M.; LUCENA, M. N.; OLIVEIRA JUNIOR, R. O.; VIEIRA, S. A. P. B.; SOARES, A. M.; ALCÂNTARA, T. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M. Acute toxicity of *Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 459-462, 2010.

MINITAB Inc. (2006). Minitab Statistical Software, Release 15 for Windows, State College, Pennsylvania. Minitab® is a registered trademark of Minitab Inc. Copyright © 2000-2006 Minitab Inc. All rights reserved.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. P.; PEREIRA, N. A. Plant natural product active against snake bite- the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627- 642, 2004.

PETRESTSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P. et al. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1293-1300, 2000.

RAMOS, O.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 142, p. 328-346, 2006.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, v. 50, p. 153-165, 2007.

ROYSTON, J. B. Some techniques for assessing multivariate based on the Shapiro-Wilk W. *Applied Statistics*, London, v. 32, n. 2, p. 121-133, 1983.

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

TSETLIN, V. I.; HUCHO, F. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *Febs Letters*, v. 557, p. 9-13, 2004.

VALE, L.H.F.; MENDES, M.M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. *Basic Clinical Pharmacological Toxicological*, v. 103, p. 104-107, 2008.

WRITE, J., Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, v. 45, p. 951-967, 2005.