

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

COMPARAÇÃO ENTRE PEÇONHAS DE VÍBORAS DO GÊNERO
Bothrops DA REGIÃO MERIDIONAL, COM ESPÉCIES SIMILARES DO
BRASIL CENTRAL, PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE TOXICIDADE
(SERPENTES, VIPERIDAE)

Angelo Laurence Covatti Terra
Orientador Professor Dr. Thales de Lema

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE – RS-BRASIL

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO S
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
LINHA DE PESQUISA EM SISTEMÁTICA E BIODIVERSIDADE**

**COMPARAÇÃO ENTRE PEÇONHAS DE VÍBORAS DO GÊNERO
Bothrops DA REGIÃO MERIDIONAL, COM ESPÉCIES SIMILARES
DO BRASIL CENTRAL, PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE
TOXICIDADE
(REPTILIA, SERPENTES)**

**Angelo Laurence Covatti Terra
Orientador: Prof. Dr. Thales de Lema**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE – RS-BRASIL**

2005

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iii
APRESENTAÇÃO.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
2.1 Venenos.....	3
2.2 Eletroforese.....	3
2.3 Dosagem de Proteína.....	3
2.4 Atividade Fosfolipásica PLA ₂	4
2.5 Atividade Proteínolítica na Caseína.....	5
2.6 Atividade Coagulante no Plasma.....	5
2.7 Letalidade.....	6
3 RESULTADOS.....	7
3.1 Eletroforese.....	7
3.2 Dosagem de Proteína.....	7
3.3 Atividade Fosfolipásica PLA ₂	8
3.4 Atividade Proteínolítica na Caseína.....	8
3.5 Atividade Coagulante no Plasma.....	8
3.6 Letalidade.....	9
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	10
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	16

Agradecimentos

Agradecemos especialmente a Dra. Maria de Fátima Domingos Furtado pela orientação, ajuda e liberação das amostras de veneno referência; ao mestrando André Zelanis, pelo direcionamento e paciência durante os ensaios, pela amizade e, principalmente, pela acolhida quando estive em São Paulo. À Marisa Maria Teixeira da Rocha, pela indicação de bibliografia e ajuda com os equipamentos. Aos demais pesquisadores, estagiários, funcionários e amigos do Instituto Butantã, por me receberem e ajudarem em minhas visitas a São Paulo. Também agradecemos à Moema Leitão de Araújo, NOPA, pela liberação de amostras de veneno do RS. A todos colegas, amigos e professores do Laboratório de Herpetologia da PUCRS, em especial ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Thales de Lema, pela orientação, amizade e por aceitar orientar-me sendo veterinário e não biólogo; ao Prof. Dr. Marcos Di Bernardo, por ser uma das pessoas que sempre acreditou no meu potencial; à Gláucia Maria Funk Pontes, pela ajuda nas coletas de veneno; ao colega e amigo, Nelson Rufino de Albuquerque, pela indicação de bibliografia, formas de redação da dissertação e amizade sempre presente; à querida amiga, Márcia Ferret Renner, que desde o início foi prestativa, motivadora e fundamental para que eu continuasse no mestrado quando tive momentos difíceis; a Felipe Gobbi Graziotin, pela ajuda com o conteúdo do trabalho. A toda equipe do Instituto de Toxicologia da PUCRS, na pessoa da Profa. Flávia Valadão Thiesen, pelo uso dos laboratórios; ao amigo, Fernando Sagebin, responsável pelos laboratórios do Instituto antes citado, pelo companheirismo, amizade e orientação e ajuda na solução de problemas surgidos durante os ensaios; à querida Ariane da Cruz Teixeira, técnica dos laboratórios citados, por manter tudo sempre organizado e funcionando; e aos demais funcionários e estagiários do mesmo que ajudaram na parte laboratorial aqui no RS. À CAPES pela bolsa que possibilitou que eu continuasse cursando o mestrado, num momento que seria impossível pelos meus próprios recursos. Em especial à minha família, minha mãe Marília, pelo exemplo de perseverança e dedicação; a meu pai Eduardo e minha irmã Franciele, pelo amor e paciência, e à minha namorada Cristina, pela dedicação e companheirismo.

Finalmente, resta-me agradecer a Deus, Senhor de nosso destino, por ter me dado a inteligência, determinação e coragem para a realização desta pesquisa e conquista de melhor nível profissional.

RESUMO

Foram analisadas amostras de veneno em forma de “pool”, extraídos de duas espécies de *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. jararaca*). O “pool” regional foi composto de venenos exclusivamente do Rio Grande do Sul coletados de exemplares provenientes de várias partes do estado. O “pool” nacional foi composto de venenos de exemplares provenientes, principalmente, de São Paulo e adjacências (estados de Espírito Santo, Minas Gerais e Paraná) e usado como veneno-referência. Foram analisadas: atividade letal; ação proteolítica sobre caseína; enzimas fosfolipásicas; ação coagulante no plasma humano; dosagem da quantidade de proteínas; e perfil eletroforético. As análises entre as amostras foram feitas comparando-se as ações bioquímicas e a composição protéica entre as espécies que compõe cada “pool”, bem como inter regionalmente, entre os “pools”. Quando comparadas pela eletroforese, as amostras regionais apresentaram particularidades quanto à composição protéica do veneno compartilhando miotoxinas fosfolipásicas com 14 KDa, que são pouco observadas nas amostras do “pool” nacional sugerindo ser esta ação mais “regionalizada” para estas peçonhas. Entretanto, observam-se outras fosfolipases miotóxicas com peso molecular diferente (16KDa) presente em todas as amostras, sugerindo a similaridade bioquímica ainda compartilhada, apesar das diferenças regionais entre as amostras. Também se verificou maior atividade fosfolipásica e teor protéico nas amostras regionais. O “pool” regional teve maior atividade proteolítica e coagulante no plasma quando comparado com o “pool” nacional, reforçando a possibilidade de maior toxicidade no “pool” regional.

PALAVRAS CHAVE: *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, . Análise peçonha, pools de antígenos, atividades dos venenos.

ABSTRACT

Comparison among pitvipers poisons of the genus *Bothrops* (Serpentes: Viperidae) from southern region, with similar species from Central Brazil, for toxicity evaluation.

Were analyzed poison samples as a pool from different proceedings, one from Rio Grande do Sul area, South Brazil (regional pool), and another mainly from São Paulo area, Central Brazil (national pool). The national pool was made by venom samples from Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo and Paraná states. Were analyzed: lethal, proteolytic (on casein), coagulant (on human plasma), and phospholipasic enzyme activities, the quantity of protein and the electrophoretic patterns were analyzed too. The analyses between the samples were made by comparison of biochemical actions and protein composition into a species, and inter-regionally between the pools. The comparison by electrophoresis, regional samples showed particularities in their venom protein composition sharing phospholipasic miotoxinas, with 14 KDa, that were poorly observed in the national pool, suggesting this action been more regionalized for this venom. However, we can observe miotoxic phospholipases, with different molecular weigh (16 KDa), present in all of the samples, suggesting a biochemical similarity still shared although the regional differences between the samples. The major phospholipasic activity and protein quantity were verified in regional samples. The regional pool has more proteolytic and coagulant activities, when we compare with the national pool, that's reinforces the possibility of those actions were more regionalized in *B. alternatus* and *B. jararaca* venoms.

Key words: *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, Venom analysis, antigen pools, venom activities.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho compara os venenos de ofídios do gênero *Bothrops* em forma de “pool”. O “pool” regional (RS) é composto por amostras de veneno seco de animais exclusivamente do Rio Grande do Sul, enquanto o “pool” nacional (BR) é formado por amostras de veneno de animais do Brasil central. Os venenos foram comparados em sua composição protéica, atividade sobre substratos específicos, potencial de letalidade e perfil eletroforético. Sabe-se que no “pool” usado para produzir o antiveneno que vai atuar nacionalmente, não constam amostras de animais do RS. Também se ressalta que a composição deste “pool” é fator determinante na eficácia da soroneutralização esperada do antiveneno. Procurou-se diferenciar as particularidades de cada “pool” e verificar diferenças significativas em suas composições que justificassem a produção de antivenenos com perfis mais regionalizados visando tratar com maior eficácia os acidentes com ofídios deste gênero e conhecer mais sobre a evolução e diferenciação da espécie. Este trabalho será submetido à **Revista Brasileira de Toxicologia**, cujas normas seguem em anexo.

**COMPARAÇÃO ENTRE PEÇONHAS DE VÍBORAS DO GÊNERO
Bothrops DA REGIÃO MERIDIONAL, COM ESPÉCIES SIMILARES
DO BRASIL CENTRAL, PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE
TOXICIDADE
(REPTILIA, SERPENTES)**

Angelo L. C. Terra¹ e Prof. Dr. Thales de Lema²

¹ Programa de Pós-graduação em Biociência, Área Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Campus Central, Av. Ipiranga, 6681 - Porto Alegre, Brasil. Fone/Fax: (051) 3320-3568 ramal: 4411 E-mail: angelolct@terra.com.br

² Laboratório de Herpetologia-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Campus Central, Av. Ipiranga, 6681- Porto Alegre, Brasil. Fone/Fax: (051) 3320-3568 ramal: 4411 E-mail: crothales@pucrs.br

Órgão financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-
CAPES

ABSTRACT

Comparison among pitvipers poisons of the genus *Bothrops* (Serpentes: Viperidae) from southern region, with similar species from Central Brazil, for toxicity evaluation.

Were analyzed poison samples as a pool from different proceedings, one from Rio Grande do Sul area, South Brazil (regional pool), and another mainly from São Paulo area, Central Brazil (national pool). The national pool was made by venom samples from Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo and Paraná states. Were analyzed: lethal, proteolytic (on casein), coagulant (on human plasma), and phospholipasic enzyme activities, the quantity of protein and the electrophoretic patterns were analyzed too. The analyses between the samples were made by comparison of biochemical actions and protein composition into a species, and inter-regionally between the pools. The comparison by electrophoresis, regional samples showed particularities in their venom protein composition sharing phospholipasic miotoxinas, with 14 KDa, that were poorly observed in the national pool, suggesting this action been more regionalized for this venom. However, we can observe miotoxic phospholipases, with different molecular weigh (16 KDa), present in all of the samples, suggesting a biochemical similarity still shared although the regional differences between the samples. The major phospholipasic activity and protein quantity were verified in regional samples. The regional pool has more proteolytic and coagulant activities, when we compare with the national pool, that's reinforces the possibility of those actions were more regionalized in *B. alternatus* and *B. jararaca* venoms.

Key words: *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, Venom analysis, antigen pools, venom activities.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Bothrops* Wagler, 1824 é de ocorrência neotropical e compreende 31 de espécies (CAMPBELL e col., 1989) ocorrentes na parte cisandina do continente sul americano sendo que, as espécies *Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron et Duméril, 1854) e *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), são de ocorrência centro-meridional para oriental, atingindo tanto o Brasil como países vizinhos do Prata (LEMA, 2004). São víboras de fosseta loreal (subfamília Crotalinae) que têm grande importância em saúde pública porque são possuidoras de peçonha muito ativa, sendo as responsáveis por grande número dos acidentes ofídicos ocorrentes no Brasil sul. Ambas são amplamente distribuídas em todo continente americano incluindo ilhas (CAMPBELL e col., 1989). Segundo LEMA, 1994, as serpentes do gênero *B. alternatus*, conhecida vulgarmente como “cruzeira” ou “urutu”, ocorrem em áreas abertas, e *B. jararaca*, conhecida vulgarmente como “jararaca”, ocorre amplamente em áreas florestadas oriental e meridional. Como todo Viperidae, possuem aparelho de inoculação do tipo solenotodonte e cujas presas são retráteis, ao contrário daquelas da família Elapidae, com dentição proteroglifodonte, com presas fixas (HABERMEHL, 1981). Uma função da peçonha é paralisar e matar a presa e outra promover a digestão inicial (HABERMEHL, 1981). Também podem ser citadas ações lubrificantes e antidegradantes nas peçonhas destes animais bem como, nas secreções venenosas de várias espécies de ofídios da família Colubridae com dentição maxilar opistóglifa (RENNER, 1999), ou mesmo áglifa. Os acidentes ofídicos envolvendo estes animais têm importância médica em virtude de sua grande

freqüência e gravidade, sendo o ofidismo o maior causador de intoxicações exógenas por animais na América Latina (CAMPBELL e col., 1989).

No Brasil causaram 600 óbitos entre 1986 e 1999 (RIO DE JANEIRO, 2001). Foram notificados à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, 81.611 acidentes por serpentes peçonhentas, o que representa uma média de 20.000 casos/ano para o país (BRASIL, 2001). Registrou-se entre os anos de 1985 e 1999 um total de 160.256 casos de acidentes (RIO DE JANEIRO, 2001) foram também registrados, 9.524 acidentes só no Rio de Janeiro entre 1990 e 2001 (RIO DE JANEIRO, 2001) e no Rio Grande do Sul, 1.494 casos de acidentes em 2004 (RIO GRANDE SUL, 2004). Considerando-se que as espécies de *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes no Brasil (MELGAREJO e col., 2003) e 66% no estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE SUL, 2004) e, ainda, que no “pool” utilizado para imunizar os cavalos no Instituto Butantan para obtenção de antiveneno botrópico, não estão presentes em amostras de peçonhas coletados de animais oriundos do Rio Grande do Sul (FURTADO, comun. pess., 2005), seria importante uma análise para reconhecer ações específicas destas peçonhas regionais do Rio Grande do Sul. Caracterizando as particularidades de cada peçonha seria possível entender melhor a diferenciação e a evolução das espécies *Bothrops*. Conforme é citado por GRAZZIOTIN (2004), há divergência e diferenciação entre os exemplares de *B. jararaca*, conforme análise biomolecular baseada no DNA mitocondrial, mostrando diferentes características nos genomas de exemplares procedentes de diferentes regiões do Brasil, o que corrobora com a probabilidade de diferenciação nas ações das peçonhas de serpentes procedentes de áreas fisiográficas diferenciadas, proposta neste trabalho. Através dos ensaios realizados, procurou-se mostrar características de cada peçonha. Cada teste tem

uma função nesta caracterização: o perfil eletroforético torna possível visualizar o “tamanho” ou o “peso molecular” das proteínas presentes nas peçonhas comparando-as com um padrão já conhecido. A dosagem de proteínas compara a quantidade de proteínas a mais que a peçonha testada tem em relação ao padrão (albumina) tendo como objetivo quantificar esta diferença já que a quantidade de proteínas e enzimas presentes nas peçonhas está diretamente ligada ao seu potencial tóxico (BALDO, e col., 2003). As enzimas fosfolipásicas são responsáveis por ações miotóxicas (NISENBOM e col.), sua atividade será mostrada ao submeter um substrato específico a ação das peçonhas e verificar qual degradou mais o substrato e, portanto é mais ativa para esta enzima. Ações proteolíticas e coagulantes no plasma são comuns em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* tendo graus de atividade moderadamente presentes (ROCHA, 2005). A determinação de uma dose letal capaz de matar 50% da população testada é a forma de mostrar qual das peçonhas é mais letal, ou seja, qual mata mais indivíduos com uma dose menor. Estes ensaios ajudarão a compreender melhor a diferença que se observou entre as peçonhas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Peçonhas

Foram utilizadas amostras das peçonhas secas a vácuo (“pool” RS) e liofilizadas (“pool” BR) de *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus* do Rio Grande do Sul procedente do serpentário do Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre (NOPA) da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Amostras das peçonhas de espécies equivalentes dos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo, foram cedidas pelo Instituto Butantan, São Paulo. Para a avaliação da DL₅₀ IP aguda, foram utilizados 120 exemplares de *Mus domesticus domesticus* Ruddy, 1772 (Muridae), fornecidos pelo biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre.

2.2 Eletroforese (SDS-PAGE)

Com o objetivo de separar as proteínas, cada amostra de peçonha (20 µl) foi colocada e corrida individualmente em um “spot” no gel de acrilamida, em gradiente de 7,5%, seguindo o método de LAEMMLI (1970). Para comparação utilizou-se o padrão de peso molecular (Pharmacia). As proteínas são: 94 KDa (fosfolipase B), 67 KDa (albumina sérica bovina), 43 KDa (ovoalbumina), 30 KDa (anidrase carbônica), 20,1 KDa (inibidor de tripsina de soja) e 14,4 KDa (lactoalbumina). O corante para revelação usado foi o Silver Staining (corante prata).

2.3 Dosagem de proteína

A quantificação das proteínas presentes nas amostras, foi feita seguindo MARKWELL e col., (1978) e usando como referência, FURTADO e col., (1991). Para o reagente “A” foi usado 20g de carbonato de sódio, 4g de hidróxido de sódio, 1,6g de tartarato de sódio, 10g de dodecil sulfato de sódio, dissolvidos em 1 litro de água destilada. O reagente “B” é o sulfato de cobre. O reagente “C” é uma associação de 1:100 dos reagentes B e A, respectivamente. Feitas em duplicata (n=2), cada amostra de 1ml de peçonha foi adicionado 3 ml do reagente “C”, incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 2 ml de reagente fenólico (reagente de Folin Ciocalteu) e deixado em repouso por 45 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 660 nm. Os valores da dosagem de proteína foram obtidos por regressão linear do resultado médio (n=2) da leitura sobre a concentração de veneno e calculados em escala logarítmica.

2.4 Atividade Fosfolipásica PLA₂

Seguiu-se o método de HOLZER e col., (1996) para comparar quantitativamente a ação das fosfolipases presentes nas amostras. As amostras feitas em triplicata foram diluídas em solução salina a 0,85% para o volume final de 100 µl e adicionados 900 µl de tampão de ensaio (10nM de Tris, 10nM de cloreto de cálcio e 100 nM de cloreto de sódio); adicionou-se 100 µl de substrato cromatogênico para PLA₂ (ácido 4-nitro, 3-octomoioloxi benzóico). Acrescentou-se 47 mg do substrato a 50 ml de acetonitrila na concentração final de 3nM. A dissolução foi feita com a utilização do agitador magnético, incubando-se por 20 min a 37°C; as amostras ficaram acondicionadas em gelo até o uso de Triton X 100 2,5%, 100µl por tubo para bloquear a reação. Após, agitou-se com agitador magnético sendo que,

após 5 a 10 minutos em repouso à temperatura ambiente, foi feita leitura no espectrofotômetro a 425 nm. A atividade foi expressa pela média (n=3) das leituras multiplicada pela constante (25,8) e dividida pela concentração da peçonha (0,3 mg/ml) para cada amostra de peçonha.

2.5 Atividade proteolítica na caseína

Conforme LOMONTE e col., (1983) pode-se quantificar a atividade proteolítica das amostras usando a caseína como substrato. Usou-se, para cada 1 ml de cada amostra de peçonha, na concentração de 100 µg/ml sendo adicionado 1 ml de um substrato composto de uma solução de caseína 1%. Amostras em triplicata (n=3) foram incubadas por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 3ml de TCA 5% (ácido tricloroacético), com repouso por 30 minutos. Seguiu-se centrifugando as amostras com as absorbâncias dos sobrenadantes lidas no espectrofotômetro a 280 nm. A atividade proteolítica foi expressa em U/mg e obtida pela fórmula:

$$\text{U/mg} = \frac{\text{Abs 280 nm}}{\text{mg de veneno}} \times 100$$

Obs: a absorbância lida é uma média entre as três leituras (n=3) em cada amostra.

2.6 Atividade Coagulante no Plasma

Para determinar dose mínima coagulante no plasma (DMC-P), que é a menor quantidade em mg de peçonha seca ou liofilizada/litro de solução teste, capaz de coagular em 60 seg, a 37°C, uma solução padronizada de plasma humano citratado, THEAKSTON e col., (1983) e FURTADO (comum. pess., 2005) sugerem usar 1mg de peçonha seca diluído em 1ml de solução salina a 0,85%. Retiram-se 400 µl dessa

solução inicial e são feitas 6 diluições seriadas (n=6) até chegar a 1:64 de concentração da solução original. No fibrômetro (Fibro SystemTM - modelo 5 marca BBL), a 100 µl de cada amostra diluída foram adicionados 200 µl de plasma a 37°C, sendo uma amostra para cada uma das cubetas, nas diferentes concentrações. Os valores da DMC-P foram obtidos por regressão linear do tempo de coagulação sobre a quantidade de veneno e calculados em escala logarítmica.

2.7 Dose Letal Média

Segundo SILES-VILLARROEL e col., (1978/79), determina-se uma dose mínima capaz de matar metade da população testada e se estabelece um comparativo de toxicidade entre as amostras de peçonha analisadas inoculado 0,5 ml (ROCHA, 2005) de cada peçonha diluída em diversas doses por via intraperitoneal (i.p) em *M. domesticus domesticus*. Inocularam-se grupos de sete camundongos (n=7) por amostra de peçonha. Utilizaram-se doses crescentes (tabela 4) de peçonha diluída em solução salina a 0,85 (tabela 5). Os animais foram observados por 24 e 48h, e contaram-se quantos animais morreram por grupo. Dados foram compilados e cálculos foram feitos com a análise de PROBITOS, conforme FINNEY (1971). Esta metodologia reduziu o número de animais que foram utilizados.

3 RESULTADOS

3.1 Eletroforese

Na primeira zona (Z1) que se situa entre 67 e 43 KDa, observou-se banda fraca na amostra de *B. jararaca* regional e bandas fortes em *B. alternatus* regional e nas demais amostras do “pool” nacional. Na zona seguinte (Z2), entre 40 e 20 KDa, observaram-se bandas fortes em *B. jararaca* de ambos os “pools” e pouco presente em *B. alternatus* de ambas as regiões. Nesta zona também são encontradas geralmente Bothroalternin (27 KDa), esta análise mostrou bandas fortes em todas as amostras. Na zona intermediária (Z Int.), entre a segunda e a terceira zona (20 a 16 KDa), foram observadas bandas fortes nas amostras de *B. alternatus* de ambos os “pools” e fracas em ambas as amostras de *B. jararaca*. Na quarta e última zona (Z 4), 14,4 KDa, bandas fortes em todas as amostras. Conforme figura 1.

3.2 Dosagem de proteínas

Verificaram-se valores mais altos na dosagem proteínas nas peçonhas do “pool” regional. Obtiveram-se valores de 200,5 µg para *B. jararaca* RS e 177,15 µg para *B. jararaca* BR (P= 0, 443, teste t Student). Já para *B. alternatus* RS obteve-se 162,55 µg e para *B. alternatus* BR 136,43µg de proteína (P= 0, 410445, teste t Student). Apesar de ter valores mais altos para o “pool” regional em ambas as espécies de *Bothrops*, estatisticamente não se obteve significativa diferença. Tabela 1.

3.3 Atividade fosfolipásica PLA₂

Foi observada nas amostras regionais ação entre 13,786 e 16,336 nmol/min/mg de veneno, enquanto que nas amostras do "pool" nacional as ações ficaram entre 5,9 e 8,8 nmol/min/mg, Para *B. jararaca* há uma tendência de superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, mas sem atingir significância estatística ($P = 0,055$, teste t Student). Já em *B. alternatus* há uma significativa superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, ($P = 0,0095$, teste t Student). Figura 2.

3.4 Atividade proteolítica na caseína

As amostras regionais precisaram de mais unidades de veneno para degradar a 1 mg de caseína durante o ensaio (128,67 u/mg para *B. jararaca* e 59,13 u/mg para *B. alternatus*), tanto quando comparadas entre as espécies quando entre regiões, com as do "pool" nacional. Para *B. jararaca* observou-se uma tendência de superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, mas sem atingir significância estatística ($P = 0,0588$, teste t Student). Já em *B. alternatus* há uma significativa superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, ($P = 0,011853$, teste t Student). Tabela 2.

3.5 DMC-P: Dose Mínima Coagulante no Plasma

Observou-se que as amostras regionais (RS) precisaram de maior quantidade (em mg) de peçonha seca para coagular uma solução padronizada de plasma humano citratado, quando comparadas entre as espécies e entre as regiões, com as do "pool" nacional (BR). Sugere-se então, que as amostras regionais (RS)

têm menor atividade coagulante sobre o plasma humano citratado quando comparadas às do “pool” nacional (BR). Tabela 3.

3.6 Dose letal média

Observamos DL₅₀ muito próximas, entre as espécies. A amostra de *B. alternatus* BR foi a mais alta (85,49 µg) sugerindo tendência à superioridade de letalidade desta peçonha em relação às demais testadas neste ensaio. Tabela 6.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com os ensaios feitos, observaram-se diferenças nas peçonhas, o que poderá causar ações diferentes no caso de um acidente real. Quando se analisou a quantidade de proteína, os valores foram aparentemente superiores nas amostras do "pool" regional (RS), porém estatisticamente muito próximos; obteve-se para *B. jararaca* ($P = 0,443$, teste t Student) e *B. alternatus* ($P = 0,410445$, teste t Student) não havendo então significativa diferença entre as quantidades de proteínas de ambos os "pools".

Na análise da atividade fosfolipásica para *B. jararaca* observou-se equivalência entre os "pools" ($P = 0,055$, teste t Student) com tendências de superioridade em *B. jararaca* RS. Já em *B. alternatus* há uma significativa superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, ($P = 0,0095$, teste t Student). Sugere-se então, maior atividade fosfolipásica nas peçonhas regionais de *B. alternatus*.

Quando observados os valores do "pool" nacional mostraram menores valores para atividades proteolíticas sobre a caseína, mas analisando estatisticamente em *B. jararaca* observou-se uma tendência de superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, mas sem atingir significância estatística ($P = 0,0588$, teste t Student). Já em *B. alternatus* há uma significativa superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, ($P = 0,011853$, teste t Student). Sugere-se que as enzimas proteolíticas das peçonhas regionais (RS) são mais ativas que as do "pool" nacional para ambas as *Bothrops* sendo intensamente mais ativas em *B. alternatus* RS. Para atividade coagulante no plasma não houve a possibilidade de análise estatística de vários ensaios. Esta análise foi realizada apenas uma vez, pois o equipamento (Fibrômetro) e o substrato (plasma humano citratado), que foram

gentilmente cedidos pelo Instituto Butantã, são de difícil concessão e obtenção junto aos outros locais onde estes foram solicitados. Os valores do “pool” regional foram maiores sugerindo maior atividade coagulante no plasma humano quando comparado aos do “pool” nacional.

Quando comparadas eletroforéticamente, as amostras variaram muito, tendo na primeira zona (Z1) forte presença de proteínas hemorrágicas (Bothropasin e Alternagin, com 55 KDa) no “pool” nacional e em *B. alternatus* do RS, e fraca em *B. jararaca* (RS), sugerindo diferenciação na composição do veneno. Na segunda zona (Z2), onde temos enzimas inibidoras das serioproteinases da cascata de coagulação e proteolíticas (Botrocetin, Bothrojaracin, e Brothronbin com 28 KDa), conforme citado em ROCHA (2005), foram observadas bandas fortes em *B. jararaca* de ambos os “pools” e pouco presente em *B. alternatus* de ambas as regiões sugerindo esta ação ser intra-específica para *B. jararaca*. Nesta zona também são encontradas Bothroalternin (inibidor de trombina com 27 KDa), (Rocha, 2005), mostrou bandas fortes em todas as amostras, sugerindo esta ação ser ainda compartilhada por ambas as espécies de *Bothrops* em várias regiões do país. Na zona intermediária (Z Int.), composta por fosfolipases com atividades miotóxicas (NISENBOM e col), foram observadas bandas fortes nas amostras de *B. alternatus* de ambos os “pools” e fracas em ambas as amostras de *B. jararaca*, sugerindo esta ação intra-específica para *B. alternatus* em todas as regiões. Na última zona (Z 4), onde encontra-se fosfolipases A2 com ação miotóxica (NISENBOM e col.), foram encontradas bandas fortes em todas as amostras, mostrando que há o compartilhamento destas enzimas em ambas as espécies de todos os “pools”. A dose letal para matar metade da população inoculada de *M. domesticus domesticus* demonstrou que apesar dos valores mais elevados do “pool” nacional de *B. alternatus* em relação aos demais, as

amostras de *B. jararaca* e de *B. alternatus* não mostraram grandes diferenças nos valores sugerindo apenas tendência de superioridade na letalidade de *B. alternatus* BR em relação ao “pool” regional. Sugere-se então, que a letalidade das peçonhas não foi significativa para diferenciar o grau de toxicidade entre as amostras. Quando comparamos os dados, concluiu-se que, apesar de compartilharem algumas ações, os venenos de *B. jararaca* e *B. alternatus* tem particularidades nas suas composições. Isso implicaria em manifestações clínicas diferenciadas (quanto ao grau de danos ao organismo no caso de acidente) para cada espécie dentro das regiões testadas. As hemorraginas presentes nas peçonhas dos viperídeos são as responsáveis pelas ações hemorrágicas, estas ações foram mencionadas por HATTI e col., 1999, como sendo um dos efeitos mais letais nos casos de acidentes. Reações inflamatórias intensas são características do gênero *Bothrops* como citado por FARSKY e col., 2000, onde é relatado que as fosfolipases e as metaloproteinases típicas destas peçonhas juntamente com outros componentes ainda não identificados ativam intensamente o sistema de complemento e aumentam a migração de células inflamatórias para o local da picada complicando o quadro em caso de acidente. É descrito por PETRICEVICH e col., 2000, alterações nos padrões normais de citocinas e óxido nítrico sérico aumentando consideravelmente os níveis de TNF-alpha, IL-1, IL-6, IL-10 and IFN-gamma em camundongos inoculados intraperitonealmente com peçonha de *B. jararaca* e outras do mesmo gênero. Também é importante ressaltar que a capacidade de neutralização dos antivenenos está diretamente associada à composição destes (FURTADO, 2005, comum. pess), logo, teoricamente, um soro que não contemplasse amostras provenientes das regiões onde ocorreu o acidente seria “menos eficaz”. Também é citado em RATANABANANGKON, K, 2003 que a produção de anti-venenos polivalentes

contemplando uma gama maior de espécies seria mais eficaz quando não é possível determinar o ofídio causador ou existem inúmeras espécies que poderiam ter causado o acidente. A terapia com corticóides e anti-histamínicos (inibidores de H1 e H2) como auxiliares na recuperação de pacientes que sofreram acidente por ofídio peçonhento e receberam o anti-veneno, também é citada por CUPO, P e col, 1991. É relatado por ROCHA 2005, não haver variações significativas nas ações das peçonhas de *B. alternatus* quando comparadas pelas diferenças nas procedências geográficas. Sugere-se então, ser possível que um antiveneno feito a partir de um “pool” composto por peçonhas de regiões limitadas aja com total eficácia em qualquer local do país. Seria possível, o tratamento de acidentes que ocorreram em outras regiões geograficamente diferentes daquela em que os animais que foram usados para fazer o antiveneno viviam, porém, quando analisamos as amostras de *B. jararaca* e também de *B. alternatus* testadas sob a forma de “pool” regional e “pool” nacional, pareceu que as variações individuais seriam amenizadas, ou seja, particularidades de cada indivíduo coletado (tais como idade, sexo, período reprodutivo e localização ambiental dentro da região), não interferissem na ação total final do “pool” testado. Foram verificadas diferenças em composição e possivelmente nas prováveis ações das peçonhas. Sugere-se então, que o anti-veneno tivesse um perfil “mais regionalizado”, ou seja, fossem acrescentados ao “pool” de peçonha que será utilizado para fabricação do anti-veneno de distribuição nacional, amostras de peçonhas provenientes de regiões mais próximas e afins, onde o anti-veneno será utilizado. O ideal seria que fossem incluídas amostras de peçonhas de animais de toda a área de ocorrência das espécies, mas devido à dificuldade de obter estas amostras pela grande extensão territorial, pela impossibilidade de envio dos animais e/ ou venenos aos órgãos que fazem os anti-venenos, e com o alto custo de uma

produção regional, contamos com a soroneutralização cruzada que é obtida pela maioria dos “pools” de veneno botrópico, agindo com eficácias diferentes, porém vitais no tratamento de acidentes com estes animais nas diversas regiões do país. Neste trabalho foram utilizados ensaios que tiveram como objetivo caracterizar as diferenças nos perfis bioquímicos e de toxicidade entre as peçonhas testadas. Sugerem-se para complementar o estudo outros testes tais como: a cromatografia de troca iônica tal como sugerido por BALDO e col., 2000 e a quantificação dos níveis séricos da enzima creatina-quinase (CK) conforme proposto por GUTIÉRREZ e col., 1980, para uma melhor caracterização das peçonhas do gênero *Bothrops*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDO, C., COSTA, J. O., HAMAGUCHI, A., BRANDEBURGO, M. I. H., OLIVEIRA, F. **Fracionamento da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* por cromatografia de troca iônica.** In: XVII Semana Científica De Estudos Biológicos, Uberlândia. Livro de Resumos. v.1. p. 27-2, 2000.

BALDO, C., HAMAGUCHI, A., OLIVEIRA, F., BRANDEBURGO, M. I. H. **Fracionamento da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* e determinação das atividades Proteolítica e Fosfolipásica A2.** 2003. www.propp.ufu.br/revistaeletronica/vida2003/Fracionamento.pdf. Acesso em: 19/01/2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, p. 9-36. 2001.

CAMPBELL, J. A., LAMAR, W. **The venomous reptiles of Latin America.** Cornell Univ. Press, Ithaca: 1989.

CUPO, P., AZEVEDO-MARQUES, M. M., MENEZES, J. B., HERING, S. E. **Immediate hypersensitivity reactions after intravenous use of antivenin sera: prognostic value of intradermal sensitivity tests].** 1991. Mar-Apr; 33(2):115-22 PMID: 1844380 [PubMed - indexed for MEDLINE] www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi. Acesso em: 17/01/2006.

FINNEY, D. J. **Probit analysis.** 3. ed. Local: Cambridge University Press, 333p. 1971.

FURTADO, M.F.D, COLLETO, G.M., DIAS-DA-SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I - Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v.53, n. 2, p.149-159, 1991.

GRAZZIOTIN, F.G. **Estudo filogeográfico de *B. jararaca* (Wied, 1824) baseado no DNA mitocondrial (Squamata: Serpentes: Viperidae)**. Dissertação. (Mestrado em Zoologia)-Instituto de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GUTIÉRREZ, J.M., O. ARROYO & BOLAÑOS. **Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* em ratón blanco**. *Toxicon*, London, 18: 603-610. 1980.

HABERMEHL, G. G. **Venomous animals and their toxins**. New York: Springer-Verlag, 1981.

HATI, R., MITRA P, SARKER, S, BHATTACHATTRYA, K. K. **Snake venom hemorrhagins**. *Critical Reviews Toxinology* 29: 1-19.1999. www.scielo.br/scielo.php. acesso em: 16/01/2006.

HOLZER, M., MACKESSEY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1149-1155, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOMONTE, B, GUTIÉRREZ, J. M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev. Biol. Tropical*. V. 31, n.1, p. 37-40, 1983.

MARKWELL, M, HASS, S. M., BIEBER, L. L., TOLBERT, N. E. A modification of the Lowry procedures to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, v. 87, p. 206-210, 1978.

MELGAREJO, A.R. **Serpentes peçonhentas do Brasil**. In: CARDOSO, J. L. C., MELGAREJO, A. R., ARAÚJO, F. A. A, *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica de acidentes*. São Paulo: SARVIER, p. 33-61. 2003.

NISENBOM, H. E., PERAZZO, J. C., MONSERRAT A.J. & VIDAL, J. C. **Contribution of Phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom**. *Toxicon*, London, 24(8): 807-817.

PETRICEVICH, V. L, TEIXEIRA, C. F. P, TAMBOURGI, D. V, GUTIERRES, J. M. **Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms.** *Toxicon*, 2000, 38, 1253-66. www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302002000100006. Acesso em: 17/01/2006.

RATANABANANGKOON, K. **Merit and demerit of polyvalent snake antivenoms.** *J Toxicol Toxin Rev* 2003; 22: 77-89. www.sc.mahidol.ac.th/scmi/kavi.html. Acesso em: 16/01/2006.

RENNER, M. F. **Caracterização enzimática do veneno e estudo histológico da glândula de Duvernoy de *Clelia plumbea* (Wied,1820) (Serpentes: Colubridae: Xenodontine.).** 1999. Dissertação. (Mestrado em Zoologia). Instituto de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RIO DE JANEIRO, 2001. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro SES-RJ, 2001. www.saude.rj.gov.br/animaispeconhentos/estatisticas.html acesso em: 13 de janeiro de 2006.

RIO DE JANEIRO, 2001. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. SINITOX, 1999. www.saude.rj.gov.br/animaispeconhentos/estatisticas.html acesso em: 13 de janeiro de 2006.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. **Relatório de atendimento 2003.** Porto Alegre, 2002. 27p.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. **Dados de atendimento 2004.** Porto Alegre, 2003. 1 p.

ROCHA, M. M. T., FURTADO, M. F. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil. **Rev. Bras. de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 383-393, jun., 2005.

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., ROLIM, R. R., FURLANETTO, R. S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42-43, p. 311-323, 1978-79.

THEAKSTON, R. D. G, Reid, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 949-956, 1983.

LISTA DE FIGURAS

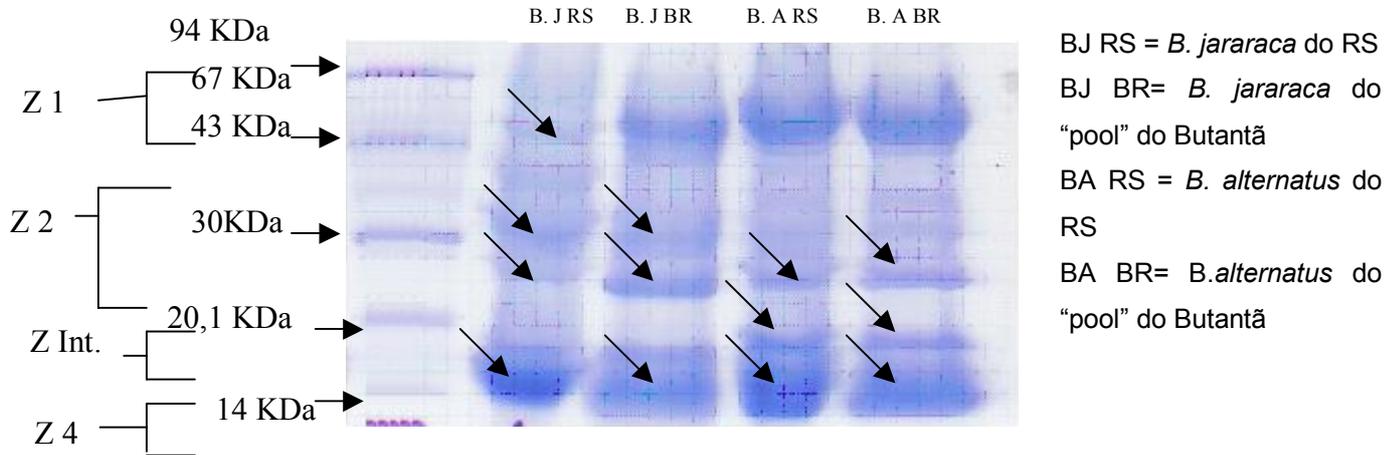
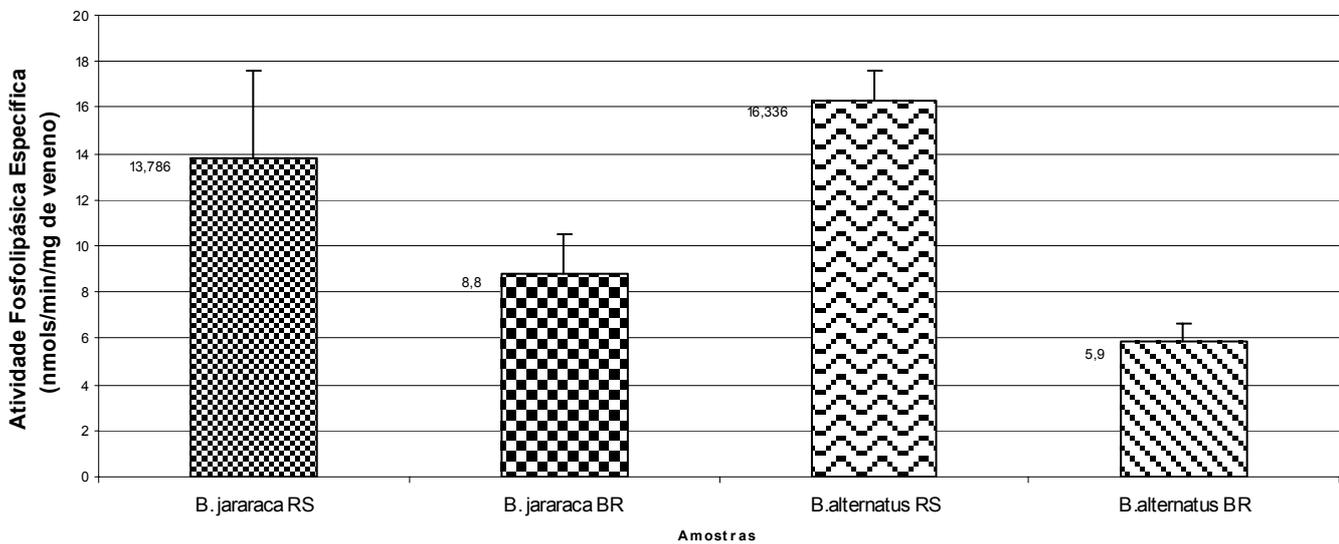


Figura 1: Perfil eletroforético mostrando as bandas presentes em cada zona do gel, dividido por pesos moleculares determinados. As setas indicam onde se localizam as bandas dentro de cada zona.

Atividade Fosfolipásica



B. jararaca ($p= 0,054958$)

B. alternatus ($p= 0,009487$)

Figura 2: Quantidade de substrato formado pela interação da enzima PLA2 com o substrato cromatogênico fornecido, foi expressa em nmol/min/mg de peçonha.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Expressa diretamente a relação entre os anéis aromáticos da albumina sérica bovina (BSA) usada para calibração da curva padrão de análise com 100 µg (padrão BSA) e a quantidade de anéis aromáticos presentes nas peçonhas.

Espécie	Dosagem de Proteína	Desvio
<i>Bothrops jararaca</i> RS	200,05 µg	74,45
<i>Bothrops jararaca</i> BR	177,15 µg	66,3
<i>Bothrops alternatus</i> RS	162,55 µg	22,15
<i>Bothrops alternatus</i> BR	136,43 µg	5,62

B. jararaca (p= 0,443)

B. alternatus (p= 0,41044)

Tabela 2: Relação entre a quantidade de unidades de peçonha (U) em cada amostra necessária para degradar 01 mg de caseína, presente na solução usada no ensaio. BR, amostra nacional; RS, amostra regional.

Espécie	Atividade caseínolítica	Desvio
B. jararaca RS	128,7 u/mg	3,3201
B. jararaca BR	119,8 u/mg	2,8160
B. alternatus RS	59,1 u/mg	3,0501
B. alternatus BR	38,9 u/mg	2,5482

B. jararaca (p= 0,05688)

B. alternatus (p= 0,011853)

Tabela 3: Quantidade de peçonha seco ou liofilizada/litro necessário para coagular 01 litro de solução teste, em 60 seg, a 37°C, para cada amostra que compões os “pools” regional (RS) e nacional (BR).

Espécie	Atividade Coagulante no Plasma
<i>B. jararaca</i> RS	19,3 mg/litro
<i>B. jararaca</i> BR	12,06 mg/litro
<i>B. alternatus</i> RS	37,5 mg/litro
<i>B. alternatus</i> BR	17,6 mg/litro

Tabela 4: Doses de peçonha inoculada nos camundongos (*M. d. domesticus*) nos diferentes “pools” para determinação da DL₅₀.

B. jararaca RS	B. jararaca BR	B. alternatus RS	B. alternatus BR
35 µg	43,2µg	60µg	75µg
69µg	51,84µg	72µg	94µg
96µg	62,82µg	86µg	117µg

Tabela 5: Quantidades de peçonha total diluída, quantidade de sol. Salina para diluição da peçonha, Fd = fatores de diluição para determinação da DL₅₀.

B. jararaca RS	B. jararaca BR	B. alternatus RS	B. alternatus BR
3mg totais	2mg totais	3mg totais	4mg totais
Fd: 1,4	Fd: 1,2	Fd: 1,2	Fd: 1,25
3ml sol. salina	4ml sol. salina	3ml sol. salina	4ml sol. salina

Tabela 6: Dose mínima em µg de peçonha necessária para matar 50% da população de *M. domesticus domesticus* para cada amostra inoculada no ensaio.

Espécie	Letalidade (DL 50)	Limite Superior de Confiança 95%	Limite inferior de confiança 95%
<i>B. jararaca</i> RS	52, 40µg	66, 28	41, 42
<i>B. jararaca</i> BR	50, 84 µg	59, 38	43, 54
<i>B. alternatus</i> RS	68, 38µg	80, 39	58, 17
<i>B. alternatus</i> BR	85, 49 µg	103, 52	70, 61

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A **Revista Brasileira de Toxicologia** é editada pela Sociedade Brasileira de Toxicologia, com periodicidade semestral, e tem por finalidade publicar artigos originais e inéditos que contribuam para o conhecimento e subsequente desenvolvimento da Toxicologia e ciências afins. Publica também artigos de revisão, comunicações, pontos de vista e cartas. A Comissão Editorial é responsável pelo estabelecimento da política editorial da Revista. Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RBT, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico.

■ Critérios para a seleção de trabalhos

O manuscrito é apreciado pela Comissão Editorial, que indica dois relatores para a revisão do trabalho. Os pareceres são julgados pela Comissão, que decide pela sua aceitação, reformulação ou rejeição. Cópias dos pareceres são encaminhados aos autores. A publicação dos manuscritos dependerá da observância das normas da Revista e de sua aprovação pela Comissão Editorial. Os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade do(s) autor(es), não refletindo a opinião da Comissão Editorial ou da Sociedade Brasileira de Toxicologia. Os manuscritos não aceitos ficam à disposição do(s) autor(es) por um ano.

Os manuscritos publicados são de propriedade da Revista, ficando proibida tanto a reprodução, mesmo que parcial em outros periódicos como a tradução para outro idioma, sem a autorização da Comissão Editorial. Desta forma, todos os trabalhos quando submetidos à publicação, devem ser acompanhados de documento de cessão de direitos autorais, contendo a assinatura de cada um dos autores, cujo modelo está a seguir apresentado:

Eu/nós....., autor(es) do trabalho intitulado....., o qual submeto(emos) à apreciação da Revista Brasileira de Toxicologia para nela ser publicado, por meio deste suficiente instrumento declaro(amos) que o trabalho está sendo submetido exclusivamente à Revista Brasileira de Toxicologia e, em caso de aceitação do referido artigo por parte desta revista, concordo(amos) que os direitos autorais a ele referentes se tornarão propriedade exclusiva da Sociedade Brasileira de Toxicologia, vedada qualquer reprodução, total ou parcial, em qualquer outro meio de divulgação impressa, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e obtida, devendo, neste último caso, constar o competente agradecimento à Sociedade Brasileira de Toxicologia. DataAssinatura(s).....

■ Instrução para o preparo do manuscrito

Os manuscritos podem ser escritos em português, espanhol ou, de preferência, em inglês. Os autores devem encaminhar o original e duas cópias, utilizando espaço duplo. Posteriormente, se o trabalho for aceito para publicação, será solicitado o disquete em Word for Windows ou programas compatíveis. O número de páginas deve se limitar a 20 para artigos originais, podendo ser maior para artigos de revisão. A estrutura do trabalho deve ser composta dos seguintes itens:

▶ Página de rosto - deverá conter: a) Título do artigo conciso e completo descrevendo o assunto com termos que possam ser adequadamente indexados pelos serviços de recuperação da informação. Palavras supérfluas devem ser omitidas; b) Primeiro nome e último sobrenome de cada autor (nomes intermediários devem ser indicados pelas respectivas iniciais, respeitando-se aqueles já conhecidos na literatura e formato diverso ao exigido); c) Indicação da instituição em que cada autor está filiado, acompanhada do respectivo endereço; d) Indicação do autor responsável para correspondência, incluindo telefone e fax; e) Se foi subvencionado, indicar o nome da agência de fomento que concedeu o auxílio; f) Se foi baseado em tese, indicar o título, ano e instituição onde foi apresentada; g) Se foi apresentado em reunião científica, indicar o nome do evento, data e local de realização. Atenção: visando guardar o anonimato dos autores frente aos relatores, os itens b), c), d), e), f) e g) deverão apenas constar da página de rosto do original, o qual será mantido pela Comissão Editorial.

▶ Resumos e unitermos - os manuscritos devem ter dois resumos: um em português, com no máximo 150 palavras e outro em inglês, recomendando-se, neste caso, que o resumo seja ampliado para 300 palavras. O resumo em inglês deve incluir o título. Quando escrito em espanhol, deverá ser acrescentado resumo nesta língua. Os resumos devem ter informações sucintas referentes a: objetivo, procedimentos básicos, resultados mais importantes e principais conclusões, enfatizando os aspectos novos e que merecem destaque. Unitermos (keywords) devem representar o conteúdo do artigo, até o máximo de 10 palavras.

▶ Estrutura do texto - Os artigos de investigação científica devem, na medida do possível, ser organizados segundo a estrutura formal: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões.

▶ Introdução - deve apresentar e discutir o problema à luz da bibliografia pertinente e atualizada, sem pretender incluir extensa revisão do assunto. Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho, que justifique sua

elaboração e importância. Não devem ser incluídos dados ou conclusões do trabalho que está sendo apresentado.

▶ **Material e Métodos** - a descrição do material utilizado deve ser objetiva, disposta em forma de texto corrido (evitar a forma de ítems) e deverá incluir entre parênteses, o nome e a origem do fabricante de materiais e equipamentos. A descrição dos métodos deverá ser breve porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processo e técnicas já publicados devem ser apenas referidos por citação. Modificações de métodos e técnicas introduzidas pelo(s) autor(es) devem ser devidamente descritas.

▶ **Resultados** - devem ser apresentados em seqüência lógica, com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado. Não devem ser repetidas no texto as informações das tabelas e figuras, apenas destacando-se aquelas mais importantes. Sempre que necessário, os dados numéricos devem ser submetidos à análise estatística.

▶ **Discussão** - deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, sendo evitadas hipóteses não baseadas nos mesmos. Deverão ser enfatizados os novos e importantes aspectos observados e discutidas as concordâncias e divergências com outros achados já publicados.

▶ **Conclusões** - devem ser fundamentadas no texto, retomando os objetivos do trabalho. Poderão ser apresentadas propostas que visem contribuir para a solução dos problemas detectados. As conclusões podem ser incluídas no item "Discussão", porém neste caso, não devem ser repetidas em item a parte.

▶ **Agradecimentos** - devem ser breves, diretos e dirigidos apenas a pessoas ou instituições que contribuíram substancialmente para a elaboração do trabalho.

▶ **Referências Bibliográficas** - devem ser dispostas em ordem alfabética, sem numeração. Alguns exemplos: a) artigos de periódicos - ROMBERG, R.W., LIEWEN, L. - Comparison of the hydrolyses rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and beta-glucuronidase. *J.Anal.Toxicol.*, Niles v.19, n.3, p.157-162, 1995.; b) livros e outras monografias - YEHL, S.Y. - Report of the committee on problems on drug dependence. New York. New York Academy of Science, 1973.; c) capítulo de livro - TOBIN, T. Horses, heroes and other athletes: how the current medication situation developed. In: TOBIN, T. ed. Charles C. Thomas: 1981. Springfield, p.21-39.; d) tese - OHARA, M.T. Aplicação do cloreto de trifenoiltetrazólio no teste de limite microbiano em medicamentos e cosméticos. São Paulo.1992. [Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]; e) trabalhos de congresso ou similar (desde que publicado) - CUNHA, R. Víruses neotrópicas. In: Congresso Brasileiro de Veterinária, 5º, São Paulo, 1960. Anais. São Paulo, 1961. p.197-220. As citações no texto devem ser indicadas pelo sobrenome do primeiro autor, seguido do ano de publicação entre parênteses. No caso de dois autores, citar os dois e no caso de vários autores, citar o primeiro seguido de e col. Exemplos: (SILVA, 1977); (SILVA e MARTINS, 1977); (SILVA e col., 1977). A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade do(s) autor(es).

▶ **Tabelas e figuras** (gráficos, fórmulas químicas, fotografias, esquema, etc..) - devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. As tabelas devem ser digitadas em espaço duplo e devem ser encabeçadas por um título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. O título das figuras deve ser colocado na parte inferior da mesma. Tanto as tabelas como as figuras, devem ser apresentadas em folhas separadas e as palavras Tabela e Figura devem aparecer por extenso, com apenas a primeira letra maiúscula, seguidas do respectivo número em algarismos arábicos. As notas de rodapé das tabelas devem ser restritas a menor número possível. Se houver tabelas extraídas de outros trabalhos previamente publicados, o(s) autor(es) devem providenciar permissão, por escrito, para a reprodução das mesmas. Esta autorização deve acompanhar os manuscritos submetidos a publicação.

As figuras devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução em clichês reduzidos. Os desenhos devem ser feitos em tinta nanquim preta, não excedendo o tamanho equivalente da página. As fotografias devem ser em papel brilhante.

▶ **Abreviaturas** - deve ser utilizada a forma padronizada. Quando não padronizadas devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez. Quando aparecem nas tabelas e nas figuras devem ser acompanhadas de explicação, caso seu significado não seja conhecido. Não devem ser utilizadas abreviaturas no título e no resumo.

■ **Envio do manuscrito**

Enviar o manuscrito para:

Revista Brasileira de Toxicologia - Comissão Editorial
Sociedade Brasileira de Toxicologia

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - CEP 05508-900 - São Paulo - Brasil
Telefax.: (55 11) 3031-1857

Os manuscritos devem ser apresentados na seqüência: página de rosto, resumos em português e inglês, unitermos, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas e figuras. As tabelas e figuras devem ser enviadas em folhas separadas. Os documentos de cessão de direitos autorais e de permissão para eventuais citações de tabelas e/ou ilustrações já publicadas em outros periódicos devem acompanhar o trabalho. A Comissão Editorial não se responsabiliza pela perda dos manuscritos durante o envio, recomendando-se aos autores reter em seu poder uma cópia do trabalho.