

Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae)

Marisa M. T. da Rocha & Maria de F. D. Furtado

Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan. Avenida Vital Brasil 1500, Butantan, 05503-900 São Paulo, São Paulo, Brasil. E-mail: bahrocha@uol.com.br; fatifurtado@butantan.gov.br

ABSTRACT. Analysis of biological activities from *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) and *P. patagoniensis* (Girard) venoms (Serpentes, Colubridae). *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) and *P. patagoniensis* (Girard, 1857) are species of colubrid snakes of the opisthoglyphous series restricted to South America. Several accidents caused by these snakes have been reported and they are mainly characterized by marked effects at the site of bite, such as pain, swelling and hemorrhage. Such accidents are similar to those caused by snakes of the genus *Bothrops*, and thereby patients bitten by *Philodryas* sp. are frequently treated with *Bothrops* antivenom. Since few studies have dealt with the characterization of these venoms, our aim was to study the venoms of *P. olfersii* and *P. patagoniensis*. They presented protein contents between 75 and 90%. No defibrinogenating activity could be detected when tested in mice. Experimental envenomation induced by *P. olfersii* or *P. patagoniensis* evoked intense pain symptoms in mice, but the venom of *P. patagoniensis* was more active. Both venoms presented minimum edematogenic doses around 1 µg/mouse, peaking at 30 mm. The onset of hemorrhagic activity was rapid, and their minimum hemorrhagic doses were alike. The toxic activity of both venoms was similar, showing values around 60.0 µg/mouse, which are comparable to those of *Bothrops* Wagler, 1824 venoms.

KEY WORDS. Local and systemic activities; toxic secretions; Xenodontinae.

RESUMO. *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) e *P. patagoniensis* (Girard, 1857) são serpentes colubrídeas da série opistóglifa, restritas à América do Sul. Vários acidentes ocasionados por estas serpentes têm sido relatados, caracterizando-se por ação local importante: dor, edema e hemorragia. É um acidente muito semelhante àquele causado por serpentes do gênero *Bothrops* Wagler, 1824 e muitas vezes os pacientes são tratados com soro antibotrópico. Poucos estudos tratam da caracterização destes venenos, assim tivemos como objetivo de trabalho o estudo dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*. Os venenos apresentaram teor de proteínas entre 75 e 90%. A atividade desfibrinante não foi detectada quando testada em camundongos. O quadro de dor causado pelo envenenamento experimental, em camundongos, mostrou que os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* causaram intensa reatividade, sendo que o veneno de *P. patagoniensis* foi o mais ativo. Ambos os venenos apresentaram dose mínima edematogênica em torno de 1 µg/camundongo com ação máxima em 30 minutos. A ação hemorrágica se instalou rapidamente, com doses mínimas semelhantes. As atividades tóxicas foram semelhantes, com valores em torno de 60,0 µg/camundongo, comparáveis aos venenos botrópicos.

PALAVRAS-CHAVE. Atividades locais e sistêmicas; secreções tóxicas; Xenodontinae.

Atualmente são descritas cerca de 2900 espécies de serpentes sendo que as da família Colubridae compreendem a mais de 65% de todas as serpentes existentes no mundo (FRANCO 2003).

A filogenia da família Colubridae proposta por KARDONG (2002) mostra uma relação próxima dos Xenodontinae com Elapidae, sendo este resultado corroborado por estudos de sequência de DNA mitocondrial e RNA ribossomal (KNIGHT & MINDELL 1994, LAWSON *et al.* 2005), dados de estrutura molecular de toxinas (FRY *et al.* 2003 a,b) e morfológicos (JACKSON 2003).

Cerca de 30 a 40% dos colubrídeos apresentam glândula de Duvernoy, homóloga às verdadeiras glândulas de veneno das serpentes proteróglifas e solenóglifas (KOCHVA 1963, GYGAX 1971, OVADIA 1984), as quais produzem secreções que consistem de enzimas, várias toxinas e outros compostos (MACKESSY 2002, FRY *et al.* 2003b).

Os acidentes ofídicos constituem um dos maiores problemas de saúde pública na América Latina (CAMPBELL & LAMAR 1989, GUTIÉRREZ & LOMONTE 2003, WARRELL 2004), e as serpentes peçonhentas são consideradas os principais agentes etiológicos

destes. Contudo, levantamentos recentes têm demonstrado que cerca de 20 a 40% dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por serpentes colubrídeas (ROSENFELD 1971, SILVEIRA & NISHIOKA 1992, CARVALHO & NOGUEIRA 1998, SANTOS-COSTA *et al.* 2001, SALOMÃO *et al.* 2003), sendo os principais gêneros *Helicops* Wagler, 1830, *Oxyrhopus* Wagler, 1830, *Thamnodynastes* Wagler, 1830 e *Philodryas* Wagler, 1830 (SANTOS-COSTA *et al.* 2001, PUERTO & FRANÇA 2003).

Embora a maioria dos registros não declare sérias consequências nos acidentes causados por serpentes opistóglifas, vários relatos ressaltam a importância de suas toxinas. Casos descrevendo a gravidade dos acidentes causados pelas xenodontíneas *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) e *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) em humanos têm sido descritos (AMARAL 1921, NICKERSON & HENDERSON 1976, SILVA & BUONONATO 1983, NISHIOKA & SILEIRA 1994, ARAÚJO & SANTOS 1997, ROCHA *et al.* 2003), assim como a ocorrência de óbito (SALOMÃO & DI BERNARDO 1995).

Os envenenamentos causados por espécies de *Philodryas* caracterizam-se por manifestações locais como dor, edema, eritema, equimose e linfadenopatia regional, com coagulação normal (RIBEIRO *et al.* 1999).

Devido às semelhanças dos quadros fisiopatológicos, estes acidentes podem ser identificados como sendo envenenamentos botrópicos (FAN & CARDOSO 1995, FRANÇA & MÁLAQUE 2003) e muitas vezes soro antibotrópico tem sido administrado (NISHIOKA & SILVEIRA 1994, RIBEIRO *et al.* 1994, 1999, ARAÚJO & SANTOS 1997).

Os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* contêm enzimas com diferentes atividades biológicas, entre elas, proteolítica, fibrin(ogen)olítica, hemorrágica e edematogênica, sendo desprovidos de enzimas do tipo-trombina, procoagulantes, fosfolipase A₂ e agregação plaquetária (ASSAKURA *et al.* 1992, PRADO-FRANCESCHI *et al.* 1996, ACOSTA *et al.* 2003a, b, PEICHOTO *et al.* 2004, 2005).

ASSAKURA *et al.* (1994) isolaram cinco diferentes proteinases fibrin(ogen)olíticas de veneno de *P. olfersii*, sendo elas as Pofibc₁, C₂, C₃, H e S. Além disto, PRADO-FRANCESCHI *et al.* (1998) isolaram e caracterizaram uma fração miotóxica com peso molecular de 20 kDa, sem ação fosfolipásica do veneno desta espécie.

A despeito da grande diversidade de serpentes opistóglifas brasileiras é escasso o conhecimento das propriedades bioquímicas e farmacológicas de seus venenos, e considerando a importância dos acidentes ofídicos causados pelas serpentes do gênero *Philodryas* tivemos como objetivo de trabalho, estudar as ações biológicas dos venenos das espécies em questão. *Philodryas olfersii* com distribuição abrangendo os países da América Cisandina (Colômbia, Venezuela, Guiana, Brasil, Uruguai e norte da Argentina). No Brasil, esta espécie é encontrada em partes da região Nordeste e Centro-Oeste e em toda região Sudeste e Sul (PETER & OREJAS-MIRANDA 1970, VANZOLINI 1986). *Philodryas patagoniensis* restrita a latitudes mais elevadas, ocorrem na Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai e no Brasil nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e em toda região Sudeste e Sul (PETER & OREJAS-MIRANDA 1970).

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos

Serpentes adultas da subespécie *Philodryas olfersii olfersii* (Fig. 1) e da espécie *Philodryas patagoniensis* (Fig. 2), medindo de 300 a 1200 mm, foram mantidas em cativeiro, nos Biotérios de manutenção do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, em gaiolas individuais, recebendo água à vontade e alimentação constituída de camundongos, a cada 30 dias. Três semanas após a alimentação, as serpentes foram inoculadas via intraperitoneal (i.p.) com solução de pilocarpina diluída em solução salina 0,85%, na concentração de 10 mg/kg (ROSENBERG *et al.* 1985) e o veneno extraído por meio da introdução de suas presas em micropipetas de 100 µl (FERLAN *et al.* 1983). As amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Animais

Camundongos Swiss, machos, pesando de 18 a 22 g e ratos Wistar, machos pesando de 230 a 250 g provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan foram utilizados. Todos os ensaios foram realizados segundo as normas da Comissão de Ética de Utilização de Animais Experimentais do Instituto Butantan e sob as condições estabelecidas no processo de número 009/2000.

Determinação do teor de Proteínas

A dosagem de proteínas foi determinada através do teor de proteínas totais segundo o método de LOWRY *et al.* (1951), modificado por MARKWELL *et al.* (1978). Albumina bovina foi utilizada como padrão. A leitura das D.O. (660 nm) foi realizada em espectrofotômetro Micronal-Modelo B383 utilizando-se como "branco" a amostra a qual o veneno não foi adicionado. A quantidade de proteínas foi expressa em microgramas de proteína por miligrama de veneno. Foram realizados testes em triplicata.

Atividade desfibrinante

Para a atividade desfibrinante dos venenos foi utilizado o método de GENÉ *et al.* (1989), onde grupos de 04 camundongos albinos, não isogênicos, pesando de 18 a 22 g, foram injetados pela via intravenosa (i.v.), na cauda, com 100 µl das soluções de venenos, diluídos em salina 0,85% estéril, nas concentrações de 10 e 20 µg. Após uma hora, os animais foram sangrados via plexo orbital, o material incubado a 37°C e observado o tempo de coagulação do sangue.

Atividade Nociceptiva

Para a determinação da atividade nociceptiva (dor) dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* camundongos (n = 10) foram injetados na região intraplantar (s.c) da pata posterior direita com 1,0 µg/50 µl de solução salina estéril; como controle animais foram injetados somente com salina 0,85% estéril. Os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro, localizados sobre uma superfície refletora para facilitar a observação. Em seguida, foi medida a reatividade dos animais, considerada como o tempo gasto, em segundos, em que os animais,



Figuras 1-2. (1) *Philodryas olfersii* exemplar adulto; (2) *P. patagoniensis* exemplar adulto. Fotos de Sílvia R. Travaglia-Cardoso.

lambiam ou mordiam a pata injetada, durante 30 minutos de avaliação experimental (HUNSKAAR *et al.* 1985). Os resultados foram expressos como médias dos tempos de reatividade dos animais \pm erro padrão, em dois diferentes experimentos.

Atividade edematogênica

Para a determinação da atividade edematogênica dos venenos foi utilizado o método de YAMAKAWA *et al.* (1976), com modificações. Inicialmente foi estabelecida a cinética da atividade edematogênica, onde grupos de 06 camundongos albinos, não isogênicos, pesando de 18 a 22 g, foram injetados, s.c., no coxim da pata direita (experimental), com 50 μ l da solução de veneno diluído em salina estéril 0,85% e a pata contralateral (controle) injetada somente com salina estéril. As espessuras dos coxins foram medidas com espessímetro (Mitutoyo – precisão 0,01 mm) nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3, 6 e 24 horas. O edema foi expresso pela diferença entre os aumentos de espessura nos coxins das patas experimental e controle, dividida pelos valores das espessuras das patas controle, multiplicado por 100. Para a determinação da Dose Mínima Edematogênica (DME), que é definida como a menor quantidade de veneno necessária para induzir 30% de aumento máximo da espessura da pata “experimental”, os animais foram tratados como descrito acima se utilizando soluções dos venenos em concentrações variadas e medindo-se as espessuras dos coxins 30 minutos após a inoculação (tempo determinado pela cinética de ação).

Atividade hemorrágica

Na atividade hemorrágica utilizou-se o método descrito por KONDO *et al.* (1960), modificado por THEAKSTON & REID (1983). Para a determinação do tempo de ação (cinética) dos venenos quanto ao desenvolvimento da atividade hemorrágica, alíquotas de 0,1 ml de uma solução de 20 μ g dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* foram injetadas, i.d., na pele previamente depilada do dorso de ratos machos adultos, pesando de 230 a 250 g, sob

anestesia leve de CO₂. Após os tempos de 30 minutos, 1, 2, 3, 6 e 16 horas, os animais foram sacrificados, e a pele do dorso removida para a determinação da área de lesão hemorrágica, através do cálculo dos diâmetros médios para cada tempo.

Para a determinação da Dose Mínima hemorrágica (DMH), que é definida como a menor quantidade de veneno em microgramas que, quando injetada na pele do dorso de ratos, produz uma lesão hemorrágica de 10 mm de diâmetro, grupos de seis ratos foram tratados como descrito acima, com soluções dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* nas concentrações de 15 a 25 μ g e de 15 a 31 μ g sendo os animais sacrificados 2 e 4 horas, respectivamente (tempo determinado pela cinética de ação).

Atividade Miotóxica

Para a avaliação da atividade miotóxica foi utilizado o método de quantificação dos níveis séricos da enzima creatinquinase (CK), que é liberada após lesão muscular, conforme descrito por GUTIÉRREZ *et al.* (1980). Grupos de cinco camundongos foram injetados com 50 μ l de soluções dos venenos, na concentração de 30 μ g, pela via intramuscular (i.m.), no músculo gastrocnêmio, e os animais controle foram inoculados somente com salina 0,85% estéril. Os animais foram sangrados via plexo ocular nos tempos de 1, 3, 6, 12 e 24h. O soro, obtido por centrifugação, foi testado utilizando-se o “kit da Sigma Diagnostics (USA) – Creatine Phosphokinase (CK) – Quantitative Colorimetric Determination in Serum or Plasma.

Atividade Necrosante

Foi utilizado o método descrito por KONDO *et al.* (1960), onde estipula-se a Dose Mínima Necrosante, que é definida como a menor quantidade de veneno, em microgramas que, quando injetada i.d. na pele do dorso de ratos, produz, em 24 h, uma lesão necrótica de 5 mm de diâmetro. Grupos de seis ratos foram injetados (conforme descrito na atividade hemorrágica), com soluções dos venenos de *P. olfersii* e *P.*

patagoniensis, nas concentrações de 40, 50, 60, 70, 80 e 90 µg e avaliadas as áreas de lesões.

Dose Letal (DL50)

Grupos de seis camundongos foram injetados com diferentes concentrações dos venenos de cada uma das espécies de serpentes. O número de animais mortos para cada dose foi observado em 48 horas. O cálculo foi baseado no número total de camundongos mortos por dose de veneno durante os experimentos (VILLARROEL *et al.* 1978) e analisados através do método "Full Probit Analysis" (FINNEY 1971).

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) das amostras analisadas. As comparações entre os grupos amostrais foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) e o teste *t* de Student para a comparação entre as espécies.

Para a análise estatística das DL50% foi utilizada a metodologia descrita por LITCHFIELD & WILCOXON (1949), utilizando-se o programa estatístico STATA™, versão 8.0.

RESULTADOS

A análise do teor de proteínas dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* demonstrou uma variação entre 75 e 90%, respectivamente.

A atividade desfibrinante, testada nas doses de 10 e 20 µg/camundongo, para os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, injetados via intravenosa, não causou alteração do tempo de coagulação do sangue dos animais (n = 4).

Na avaliação do efeito edematogênico foi observado que os venenos têm ação muito rápida, entre cinco e dez minutos após a injeção o edema evolui, sendo que sua ação máxima ocorre em 30 minutos, mantendo-se estável até a quarta hora (Fig. 3). As Doses Mínimas Edematogênicas foram semelhantes com valores de 1,1 ± 0,07 µg para o veneno de *P. olfersii* e 0,9 ± 0,08 µg para o veneno de *P. patagoniensis* (médias ± E.P.M.; n = 6; p > 0,05; F: 1.306) (Fig. 4).

A inoculação intradérmica em dorso de ratos, com os venenos *P. olfersii* e *P. patagoniensis* produziu hemorragia, com pico de ação em quatro e duas horas (Fig. 5), com Doses Mínimas Hemorrágicas iguais e valores de 24,1 ± 2,8 µg/rato e 26,9 ± 2,5 µg/rato respectivamente (média ± E.P.M.; n = 6; p > 0,05; F: 1.254) (Fig. 6).

Para a avaliação da atividade nociceptiva, camundongos (n = 10) foram injetados na região intraplantar com 1µg dos venenos, com os animais observados por um período de 30 minutos. Os resultados mostraram que os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* apresentaram valores quanto à nocicepção, de 53,9 ± 10,4 seg. e 99,7 ± 13,5 seg. (média ± E.P.M.; n = 10; p < 0,05; F: 1.735), sendo que o veneno de *P. patagoniensis* foi o mais ativo (Fig. 7).

Os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* nas doses de 50, 60, 70, 80 e 90 µg, quando injetados i.d. em dorso de ratos,

provocaram lesão necrótica em 24 horas. As Doses Mínimas Necrosantes (DMN) foram significativamente diferentes, sendo que o veneno de *P. olfersii* apresentou DMN de 79,1 ± 3,9 µg/rato e *P. patagoniensis* = 63,5 ± 4,6 µg/rato (média ± E.P.M.; n = 6; p < 0,05; F: 1.391) (Fig. 8).

A atividade miotóxica dos venenos foi avaliada através da injeção intramuscular (i.m.) (30 µg/camundongo) e a determinação da liberação de Cretino-quinase (CK) plasmática, enzima liberada após lesão muscular. Como apresentado na figura 9, os animais injetados com os venenos não mostraram alterações significativas dos níveis de CK plasmática quando comparados com o grupo controle (injetados com salina). O pico de ação ocorreu três horas após a injeção e retornando aos níveis basais a partir da 12ª hora, e os valores para a liberação de CK foram de 25,8 ± 5,1 U/ml (*P. olfersii*), 22,4 ± 3,2 U/ml (*P. patagoniensis*) e 17,9 ± 2,5 (grupo controle) em 180 minutos (média ± E.P.M.; n = 5; p > 0,05; 2.540).

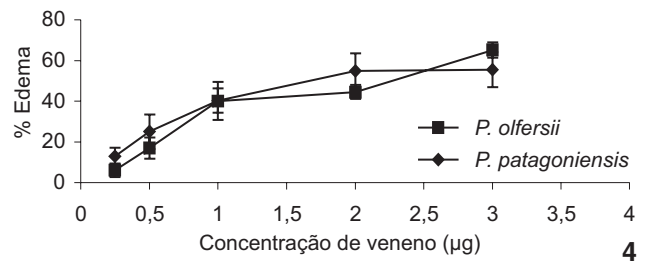
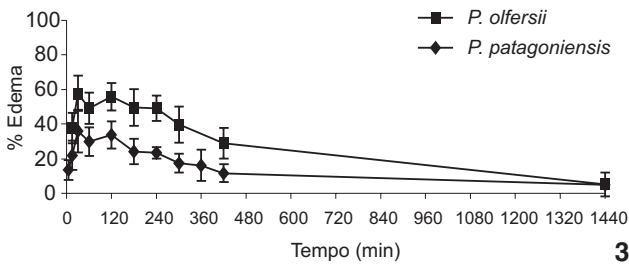
A atividade letal foi semelhante nos venenos de ambas as espécies. *P. olfersii* apresentou a Dose Letal 50% de 62,43 µg/camundongo e *P. patagoniensis* de 58,85 µg/camundongo, com limite de confiança 95% (Fig. 10).

DISCUSSÃO

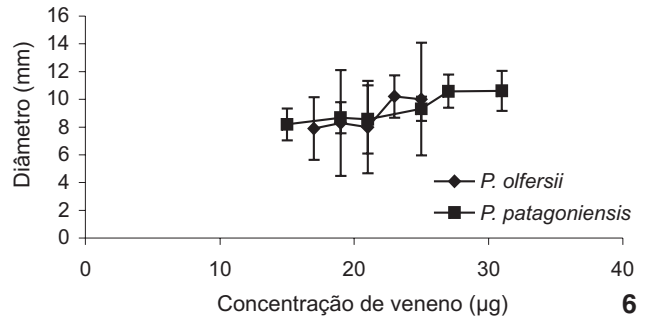
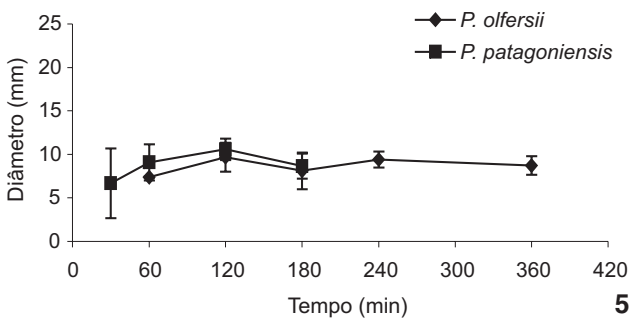
Diferentes métodos para obtenção dos venenos de colubrídeos têm sido utilizados (WEINSTEIN & KARDONG 1994, MACKESSY 2002), após cerca de 1000 extrações, concluímos que a técnica comum de extração, como realizada em serpentes proteróglifas e solenóglifas, com a simples compressão da glândula de veneno, não é eficiente devido à natureza do aparato inoculador das serpentes opistóglifas. Nas glândulas Duvernoy os grânulos de secreção estão estocados na região interna das células, sendo liberados somente no momento do estímulo (KOCHVA 1987), desta forma a extração direta com capilares introduzidos nas presas (FERLAN *et al.* 1983) é o método mais eficaz, uma vez que a secreção estará livre de agentes contaminantes (MACKESSY 2002).

Os venenos de serpentes são misturas contendo múltiplos componentes, sendo que 90% são proteínas. Segundo WEINSTEIN & KARDONG (1994), HILL & MACKESSY (2000) e MACKESSY (2002), o conteúdo proteico dos venenos de colubrídeos é bastante variável podendo apresentar baixos níveis de proteínas e o material liofilizado contendo altas concentrações de componentes não proteicos (VEST *et al.* 1991, WEINSTEIN *et al.* 1991). De modo geral existe uma variação entre 15 e 100% dentre os venenos já estudados (MACKESSY 2002). Os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* apresentaram conteúdo de proteínas totais entre 75 e 90% respectivamente.

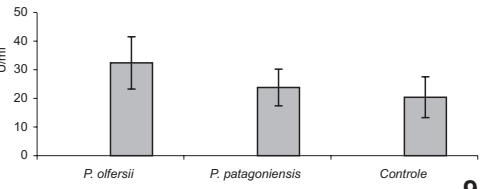
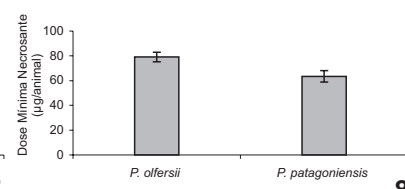
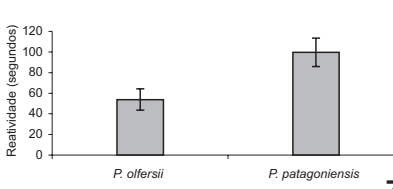
As proeminentes atividades edematogênica e hiperalgésica, características nestes acidentes, e seus rápidos desenvolvimentos são típicos sinais do processo inflamatório agudo, decorrente da ação de substâncias endógenas que são liberadas após o estímulo lesivo (OHSAKA 1979, CHACUR *et al.* 2001, PRADO-FRANCESCHI & HYSLOP 2002). Os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* apresentaram, em camundongos, respostas hiper-



Figuras 3-4. (3) Cinética do edema após a injeção intraplantar de 3 µg dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*; (4) Curva dose-resposta da ação edematogênica dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 6).



Figuras 5-6. (5) A cinética da atividade hemorrágica dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* foi avaliada após a injeção intradérmica de 20 µg dos venenos. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 6 por tempo); (6) determinação da Dose Mínima Hemorrágica dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*.



Figuras 7-9. (7) Atividade nociceptiva dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* na dose de 1 µg; (8) comparação das Doses Mínimas Necrosantes dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*; (9) comparação dos níveis plasmáticos de Cretino-quinase (CK) após a inoculação i.m. (30 µg/50 µl) dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*. Os dados representam a média ± E.P.M. de: (7) dez animais; (8) quatro animais; cinco animais.

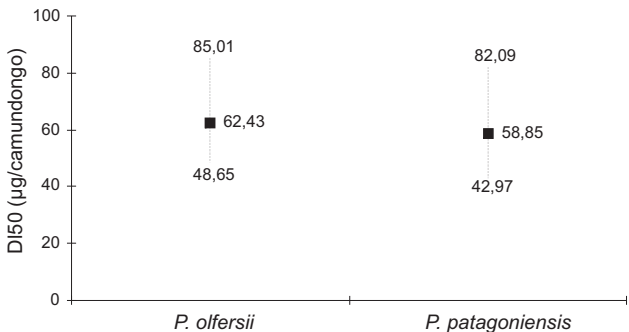


Figura 10. Representação gráfica das Doses Letais 50% dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*. As DL₅₀ *P. olfersii* e *P. patagoniensis* foram estatisticamente iguais (limite de confiança 95% e p > 0,05).

algégicas importantes, sendo que o veneno de *P. patagoniensis* foi mais ativo que o veneno de *P. olfersii*.

ASSAKURA *et al.* (1992), ACOSTA *et al.* (2003 a, b) e PEICHOTO *et al.* (2004) determinaram Doses Mínimas Edematogênicas para os venenos de *P. olfersii* (0,25 e 0,31 µg) e *P. patagoniensis* (0,26 µg), sendo mais edematogênico que alguns venenos botrópicos. Os resultados aqui apresentados mostraram que ambos os venenos apresentaram ação máxima em 30 minutos após a inoculação e as Doses mínimas foram mais elevadas, com valores de 1,1 µg/camundongo para o veneno de *P. olfersii* e 0,86 µg/camundongo para o veneno de *P. patagoniensis*, sendo que estas diferenças poderiam estar ligadas à variação geográfica (CHIPPAUX *et al.* 1991).

A atividade hemorrágica dos venenos de viperídeos (SANCHEZ *et al.* 1992, BJARNASON & FOX 1994, GUTIÉRREZ & RUCAVADO

2000) e colubrídeos (ASSAKURA *et al.* 1992, MANDELBAUM *et al.* 1998, ACOSTA *et al.* 2003b) é atribuída, principalmente à atuação de metaloproteinases, enzimas proteolíticas com atividade dependente do íon zinco.

Assim como nos viperídeos, as hemorraginas presentes nos venenos de colubrídeos podem ter um papel semelhante com relação aos processos digestivos e a presença de atividade hemorrágica tem sido largamente indicada em várias espécies de colubrídeos (KORNALIK *et al.* 1978, VEST 1988, NAVARRETE *et al.* 1999, LEMOINE & RODRIGUES-ACOSTA 2003, LEMOINE *et al.* 2004a, b, ROCHA *et al.* 2006).

TANJONI *et al.* (2003) utilizando um anticorpo monoclonal anti-jararagina que reconhece um epítipo presente na região C-terminal do domínio desintegrina-like, uma metaloproteinase do veneno de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), demonstraram pela técnica de Dot Blot que estes anticorpos reagiram com os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, sugerindo que as metaloproteinases destes venenos apresentam epítipos comuns aos de *B. jararaca*. Corroborando tais achados, ROCHA *et al.* (2006) demonstraram que o soro antibotrópico comercial apresentou reatividade cruzada sendo capaz de neutralizar a ação hemorrágica, e eficientemente a atividade tóxica dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, com títulos de potência similares aos obtidos com o veneno de *B. jararaca*.

Os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* apresentaram Doses Mínimas Hemorrágicas de 24,1 e 26,9 µg/rato, respectivamente. Observa-se ainda que, estes são menos hemorrágicos do que aqueles de serpentes do gênero *Bothrops* Wagler, 1824 tais como: *B. jararaca* (15,6 µg/rato), *B. cotiara* (Gomes, 1913) (20,2 µg/rato) e *B. alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854 (14,4 µg/rato) (FURTADO *et al.* 1991), analisados em 24 horas, sendo os de *Philodryas* avaliados nos tempos de 2 e 4 horas, com ação mais rápida.

As miotoxinas são toxinas responsáveis pelo dano muscular, podendo estar ligadas a uma ação fosfolipásica. Pouco se conhece sobre as miotoxinas dos venenos de colubrídeos e na maioria dos estudos estas toxinas têm sido parcialmente purificadas (JANSEN 1987, PRADO-FRANCESCHI *et al.* 1996, 1998). Segundo ASSAKURA *et al.* (1992, 1994) o veneno de *P. olfersii* apresenta baixa atividade fosfolipásica. Os resultados mostraram baixos níveis de liberação de creatino-quinase nos vários tempos testados, com pico de ação três horas após a inoculação e retornando aos níveis basais a partir da 12ª hora. Entretanto, ACOSTA *et al.* (2003a, b) e PEICHOTO *et al.* (2004) utilizando serpentes deste mesmo gênero do nordeste da Argentina, determinaram altos níveis desta enzima tardiamente entre 10 e 16 horas.

A atividade necrosante decorrente dos envenenamentos de serpentes viperídeas originam-se da ação de enzimas proteolíticas causando a destruição dos tecidos moles próximos ao local da picada (ROSENFELD 1971). Entre os envenenamentos causados por colubrídeos não tem sido descrita a atividade necrosante. Entretanto, PEICHOTO *et al.* (2004) determinaram esta atividade em veneno de *P. patagoniensis* o qual apre-

sentou DMN igual a 180,5 mg/rato. Os resultados aqui apresentados mostraram que os venenos de *P. olfersii* (DMN = 79,1 µg/rato ± 3,9) e *P. patagoniensis* (DMN = 63,5 µg/rato ± 4,6) são capazes de causar pronunciada dermonecrose, sendo o veneno de *P. patagoniensis* o mais ativo.

As doses letais das espécies *P. olfersii* e *P. patagoniensis* foram determinadas em 62,4 µg/camundongo (Limites de confiança 95% = 85,01-48,65) e 58,8 µg/camundongo (Limites de confiança 95% = 82,09-42,97), respectivamente e, consideradas estatisticamente semelhantes, com nível de significância de 95%. Apesar de menos tóxicos do que o veneno de *B. jararaca* (24,7 µg/camundongo e Limites de confiança 95% = 23-26 µg/camundongo) seus valores podem ser equiparados aos venenos de *B. jararacussu* Lacerda, 1884 (58,8 µg/camundongo e Limites de confiança = 52-67 µg/camundongo) e *B. alternatus* (67,5 µg/camundongo e Limites de confiança = 59-76 µg/camundongo) (FURTADO *et al.* 1991).

Os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* apresentam atividades biológicas semelhantes aos venenos botrópicos, sendo as ações locais menos intensas embora os tempos de desenvolvimento dos efeitos mais rápidos.

AGRADECIMENTOS

A Silvia R. Travaglia-Cardoso e Valdir Germano e aos biólogos Henrique Braz, Laura Narvaes, André Zelanis e Mônica F. Lopes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, O.; L.C. LEIVA; M.E. PEICHOTO; S. MAKUÑAK; P.T. RUÍZ; C. GAY & L. REY. 2003a. Edematogenic and myotoxic activities of the Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* from the north-east region of Argentina. **BIOCEL** 27 (3): 363-370.
- ACOSTA, O.; L.C. LEIVA; M.E. PEICHOTO; S. MARUÑAK; P. TEBLER & L. REY. 2003b. Hemorrhagic activity of the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. **Toxicon** 41: 1007-1012.
- AMARAL, A. 1921. Últimos trabalhos inéditos de J. Florencio Gomes: Duas novas espécies de Colubrídeos opisthoglyphos brasileiros (*Philodryas oligolepis* e *Apostolepis longicaudata*). **Anais Paulista de Medicina e Cirurgia** 9 (7/8): 157-221.
- ARAÚJO, M.E. & A.C.M.C.A. SANTOS. 1997. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 30 (6): 517-519.
- ASSAKURA, M.T.; A.P.N. REICHL & F.R. MANDELBAUM. 1994. Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon** 32 (7): 819-831.
- ASSAKURA, M.T.; M.G. SALOMÃO; G. PUERTO & F.R. MANDELBAUM. 1992. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green

- snake). *Toxicon* 30 (4): 427-438.
- BJARNASON, J. & J.W. FOX. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology & Therapeutics* 62: 325-372.
- CAMPBELL, J.A. & W.W. LAMAR. 1989. *The Venomous Reptiles of Latin America*. London, Comstock, 6th ed., 425p.
- CARVALHO, M.A & F. NOGUEIRA. 1998. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. *Cadernos de Saúde Pública* 14: 753-763.
- CHACUR, M.; G. PICOLO; J.M. GUTIÉRREZ; C.F.P. TEIXEIRA & Y. CURY. 2001. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 39: 1173-1181.
- CHIPPAUX, J. P.; V. WILLIAMS AND J. WHITE. 1991. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29: 1279-1303.
- FAN, H.W. & J.L. CARDOSO. 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America, p. 667-688. *In: J. MEIER & J. WHITE* (Eds). *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton, CRC Press, 752p.
- FERLAN, I.; A. FERLAN; T. KING & F.E. RUSSELL. 1983. Preliminary studies on the venom of the colubrid snake *Rhabdophis subminiatus* (red-necked keelback). *Toxicon* 21 (4): 570-574.
- FINNEY, P.J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge, Cambridge University Press, 3rd ed., 333p.
- FRANÇA, F.O.S. & C.M.S. MÁLAQUE. 2003. Acidente botrópico p. 72-86. *In: J.L.C. CARDOSO; F.O.S. FRANÇA; F.H. WEN; C.M.S. MÁLAQUE & V. HADDAD JR* (Eds). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Sarvier, FAPESP, 468p.
- FRANCO, F.L. 2003. Origem e diversidade das serpentes, p. 13-32. *In: J.L.C. CARDOSO; F.O.S. FRANÇA; F.H. WEN; C.M.S. MÁLAQUE; V. HADDAD JR* (Eds). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Sarvier, FAPESP, 468p.
- FRY, B.G.; N.G. LUMSDEN; W. WUSTER; J.C. WICKRAMARATNA; W.C. HODGSON & R.M. KINI. 2003a. Isolation of neurotoxin (α -colubritoxin) from a nonvenomous Colubrid: evidence for early origin of venom in snakes. *Journal of Molecular Evolution* 57: 446-452.
- FRY, B.G.; W. WUSTER; S.F.R. RAMJAN; T. JACKSON; P. MARTELLI & M. KINI. 2003b. ANALYSIS OF COLUBROIDEA snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxicological implications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: 2047-2062.
- FURTADO, M.F.D.; W. DIAS DA SILVA & G.M.D.D. COLLETO. 1991. 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. *Memórias do Instituto Butantan* 53 (2): 149-159.
- GENÉ, J.A.; A. ROY; G. ROJAS; J.M. GUTIÉRREZ & L. CERDAS. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27 (8): 841-848.
- GUTIÉRREZ, J.M. & A. RUCAVADO. 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850.
- GUTIÉRREZ, J.M. & B. LOMONTE. 2003. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina, p. 310-323. *In: J.L.C. CARDOSO; F.O.S. FRANÇA; F.H. WEN; C.M.S. MÁLAQUE; V. HADDAD JR* (Eds). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Sarvier, FAPESP, 468p.
- GUTIÉRREZ, J.M.; O. ARROYO & R. BOLAÑOS. 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en raton blanco. *Toxicon* 18: 603-610.
- GYGAX, P. 1971. Development, morphology and function of the venom gland (Duvernoy's gland) of *Natrix tessellata*. *Acta Tropica* 28 (3): 226-274.
- HILL, R.E. & S.P. MACKESSY. 2000. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon* 38: 1663-1687.
- HUNSKAAR, S.; O.B. FASMER & K. HOLE. 1985. Formain test in mice, a useful technic for evaluation mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 769-785.
- JACKSON, K. 2003. The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 137: 337-354.
- JANSEN, D.W. 1987. The myonecrotic effect of Duvernoy's gland secretion of the *Thamnophis elegans vagrans*. *Journal of Herpetology* 21: 81-83.
- KARDONG, K.V. 2002. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 21: 1-19.
- KNIGHT, A. & D. MINDELL. 1994. On the phylogenetic relationship of Colubrinae, Elapidae, and Viperidae and the evolution of front-fanged venom systems in snakes. *Copeia* 1994 (1): 1-9.
- KOCHVA, E. 1963. The development of the venom gland in the opisthoglyph snake *Telescopus fallax* with remarks on *Thamnophis sirtalis* (Colubridae, Reptilia). *Copeia* 1963 (2): 147-154.
- KOCHVA, E. 1987. The origin of snake and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* 25 (1): 65-106.
- KONDO, H.; S. KONDO; I. IKESAWA; R. MURATA; A. OHSAKA. 1960. Studies of the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 13: 43-51.
- KORNALIK, F.; E. TÁBORKÁ & D. MEBS. 1978. Pharmacological and biological properties of a venom gland extract from the snake *Thelotornis kirtlandi*. *Toxicon* 16: 535-542.
- LAWSON, R.; J.B. SLOWINSKI; B.I. CROTHER & F.T. BURBRINK. 2005.

- Phylogeny of Colubroidea (Serpentes): New evidence from mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 37: 581-601.
- LEMOINE, K. & A. RODRÍGUEZ-ACOSTA. 2003. Haemorrhagic, proteolytic and neurotoxic activities produced by Duvernoy's gland secretion from the false coral snake (*Erythrolamprus bizona* Jan, 1863) (Serpentes: Viperidae). **Revista Científica FCV-LUZ** 13 (5): 371-377.
- LEMOINE, K.; M.E. GIRÓN; I. AGUILAR; L.F. NAVARRETE & A. RODRÍGUEZ-ACOSTA. 2004a. Proteolytic, Hemorrhagic, and Neurotoxic Activities Caused by *Leptodeira annulata ashmeadii* (Serpentes:Colubridae) Duvernoy's Gland Secretion. **Wilderness & Environmental Medicine** 15: 82-89.
- LEMOINE, K.; L.M. SALGUEIRO & A. RODRÍGUEZ-ACOSTA. 2004b. Neurotoxic, Hemorrhagic and Proteolytic Activities of Duvernoy's Gland Secretion from Venezuelan Ophistoglyphous Colubrid Snakes in Mice. **Veterinary and Human Toxicology** 46 (1): 10-14.
- LITCHFIELD, J.T. & F. WILCOXON. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 96: 99-113.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSEBROUGH; A.L. FARR and R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193: 265-275.
- MACKESSY, S.P. 2002. Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. **Journal Toxicology-Toxin Reviews** 21: 43-83.
- MANDELBAUM, F.R.; M.T. ASSAKURA; A.P. REICHL & S.M.T. SERRANO. 1998. *Philodryas* venom metalloproteinases, p.1-2. In: A.J. BARRETT; N.D. RAWLINGS & J.F. WOESSNER (Eds). **Handbook of proteolytic enzymes**. New York, Academic Press, XXX+1666p.
- MARKEWELL, M.; S.M. HASS; L.L. BIEBER & N.E. TOLBERT. 1978. A modification of the Lowry procedures to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical biochemistry** 87: 206-210.
- NAVARRETE, L.F.; K. LEMOINE; A. RODRÍGUEZ-ACOSTA. 1999. Is the Opistoglyph *Clelia clelia* Duvernoy's Gland Secretion Haemorrhagic in Human? **Acta Biologica Venezuelana** 19 (3): 19-23.
- NICKERSON, A.M. & R.W. HENDERSON 1976. A case of envenomation by the South American colubrid *Philodryas olfersii*. **Herpetologica** 32 (2): 197-198.
- NISHIOKA, S.A. & P.V.P. SILVEIRA. 1994. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 36 (3): 279-281.
- OHSAKA, A. 1979. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snakesvenoms, p. 481-546. In: C.Y. LEE (Ed.). **Snake venoms, handbook of experimental pharmacology**. Berlin, Springer, 1129p.
- OVADIA, M. 1984. Embryonic development of Duvernoy's gland in the snake *Natrix tessellata* (Colubridae). **Copeia** 1984: 516-521.
- PEICHOTO, M.E.; L.C. LEIVA; L.E. GUAIMÁS MOYA; L. REY & O. ACOSTA. 2005. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: effects on blood coagulation. **Toxicon** 45: 527-534.
- PEICHOTO, M.E.; O. ACOSTA; L. LEIVA; P. TEIBLER; S. MARUÑAK & R. RUÍZ. 2004. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. **Toxicon** 44: 589-596.
- PETERS, J.A. & OREJAS-MIRANDA, B. 1970. Catalogue of the Neotropical Squamata: Part I. Snakes. **Bulletin of United States National Museum** 297: 1-347.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & S. HYSLOPY. 2002. South American colubrid envenomations. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews** 21: 117-158.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; S. HYSLOPY; J.C. COGO; A.L. ANDRADE; M.T. ASSAKURA; M.A. CRUZ-HÖFLING & L. RODRIGUES-SIMIONI. 1996. The effects of Duvernoy's gland secretion from the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* on striated muscle and the neuromuscular junction: partial characterization of a neuromuscular fraction. **Toxicon** 34 (4): 459-466.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; S. HYSLOPY; J.C. COGO; A.L. ANDRADE; M.T. ASSAKURA; A.P. REICHL; M.A. CRUZ-HÖFLING & L. RODRIGUES-SIMIONI. 1998. Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontinae colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. **Toxicon** 36 (10): 1407-1421.
- PUERTO, G. & F.O.S. FRANÇA. 2003. Serpentes não peçonhentas e aspectos clínicos dos acidentes, p. 108-114. In: J.L.C. CARDOSO; F.O.S. FRANÇA; F.H. WEN; C.M.S. MÁLAQUE; V. HADDAD JR (Eds). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier, FAPESP, 468p.
- RIBEIRO, L. A.; G. PUERTO & M.T. JORGE. 1994. Acidentes por serpentes do gênero *Philodryas*: avaliação de 132 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 27 (Supl. 1): 87.
- RIBEIRO, L.A.; G. PUERTO & M.T. JORGE. 1999. Bites by colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. **Toxicon** 37 (1999): 943-948.
- ROCHA, M.M.T.; S.R. TRAVAGLIA-CARDOSO & C. SATO. 2003. Reports of Human Snake Accidents Caused by *Philodryas olfersii*. **Memórias do Instituto Butantan** 60: 142.
- ROCHA, M.M.T.; D. PAIXÃO-CAVALCANTE; D.V. TAMBOURGI & M.F.D. FURTADO. 2006. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). **Toxicon** 47: 95-103.
- ROSENBERG, H.I.; A. BDOLAH & E. KOCHVA. 1985. Lethal factors and enzymes in the secretion from Duvernoy's gland of three colubrid snakes. **The Journal of Experimental Zoology** 233: 5-14.
- ROSENFELD, G. 1971. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America, p. 345-384. In: W. BUCHERI;

- E.E. BUCKLEY & V. DEULOFEU (Eds). **Venomous animals and their venoms**. New York, Academic Press, vol. 2, 687p.
- SALOMÃO, M.G.; A.B.P. ALBOLEA & S.M. ALMEIDA-SANTOS. 2003. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpetological Review** 34 (4): 307-312.
- SALOMÃO, M.G. & M. DI BERNARDO. 1995. *Philodryas olfersii*: uma cobra comum que mata. Caso registrado na área da 8ª Delegacia Regional de Saúde. **Arquivos da Sociedade de Zoológicos do Brasil** (14-16): 21.
- SANCHEZ, E.F.; T.V. FREITAS; D.L. FERREIRA-ALVES; D.T. VELARDE; M.R. DINIZ; M.N. CORDEIRO; G. AGOSTINI-COTTA & C.R. DINIZ. 1992. Biological activities of venoms from south american snakes. **Toxicon**, Oxford, 30(1): 95-103.
- SANTOS-COSTA, M.C.; A.B. OUTEIRAL; F. D'AGOSTINI & L. CAPPELLARI. 2001. Frequência de acidentes ofídicos na região da grande Porto Alegre e cidades próximas, RGS, Brasil. **Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, 14 (1): 89-93.
- SILVA, M. V. & M. A. BUONONATO. 1983. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. **Memórias do Instituto Butantan** 47/48: 121-126. [1984]
- SILVEIRA, P.V.P. & S.A. NISHIOKA. 1992. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in a brazilian teaching Hospital. Analysis of 91 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 34: 499-503.
- TANJONI, I.; D. BUTERA; P.J. SPENCER; A.H. TAKEHARA; I. FERNANDES & A.M. MOURA-DA-SILVA. 2003. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon** 42: 809-816.
- THEAKSTON, R.D.G. & H.A. REID. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization** 61: 949-956.
- VANZOLINI, P. 1986. **Levantamento herpetológico da área do estado de Rondônia sob influência da rodovia BR 364**. Brasília, CNPq, Relatório de pesquisa, 50p.
- VEST, D.K. 1988. Some effects and properties of Duvernoy's gland secretion from *Hypsiglena torquata texana* (Texas night snake). **Toxicon** 26 (4): 417-419.
- VEST, D.K.; S.P. MACKESSY & K.V. KARDONG. 1991. The unique Duvernoy's secretion of the brown tree snake (*Boiga irregularis*). **Toxicon** 29 (4/5): 532-535.
- VILLARROEL, M.S.; F. ZELANTE; R. ROLIM ROSA & R.S. FURLANETTO. 1978. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Memórias do Instituto Butantan** 42/43: 311-323. [1979]
- WARRELL, D.A. 2004. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, Clinical Features, and Clinical Management, p. 709-761. *In*: J.A. CAMPBELL & W.W. LAMAR (Eds). **The Venomous reptiles of the western hemisphere**. London, Comstock, vol. 2, 6th ed., 425p.
- WEINSTEIN, S.A.; D. CHISZAR; R.C. BELL & L.A. SAMITH. 1991. Lethal potency and fractionation of Duvernoy's secretion from the brown tree snake, *Boiga irregularis*. **Toxicon** 29 (4/5): 401-407.
- WEINSTEIN, S.A. & K.V. KARDONG. 1994. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. **Toxicon** 32 (10): 1161-1185.
- YAMAKAWA, S.A.; M. NOZAKI & Z. HOKAWA. 1976. Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-formin activities of the fractins, p. 97-109. *In*: A. OHSAKA; K. HAYASHI; Q.Y. SAWAY (Eds). **Animal, plant and microbial toxins**. New York, Plenum, vol. 1, XXV+555p.

Recebido em 28.IX.2006; aceito em 10.V.2007.